

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19770198  
 研究課題名 (和文) Importin13 遺伝子の減数分裂期生殖細胞分化を制御する分子機構の解明  
 研究課題名 (英文) Studies of the role on dominant negative form Importin13 upon mouse meiotic germ cell development  
 研究代表者  
 山口 泰華 (YAMAGUCHI YASUKA)  
 熊本大学・発生医学研究センター・研究員  
 研究者番号：90448522

研究成果の概要:細胞分化等を誘導する分子の細胞内局在変化の引き金となる Importin ファミリーの一つ、Ipo13 遺伝子の減数分裂期生殖細胞細胞分化における役割について研究を進めた。全長 (long) の Ipo13 (L-Ipo13) は標的タンパク質カーゴ分子であり核内で活性を示す ubiquitin-conjugating enzyme 9 (UBC9) の核局在を誘導する。しかし、精巣特異的発現を示す、核移行領域欠損型の Testis specific (TS)-Ipo13 は UBC9 の核への局在化を誘導しなかった。さらに両者の共発現では L-Ipo13 の UBC9 の輸送活性が阻害されることを観察した。また、UBC9 が核局在を示さない条件下では、生殖細胞の減数分裂の進行が遅れる様子を観察した。以上の観察から、転写開始点の使い分けによって得られると推測される TS-IP013 は、Ipo13 遺伝子の全長産物である L-IP013 の細胞質核間輸送活性を低下させ、UBC9 などの標的カーゴ分子の核蓄積を阻害して、減数分裂期の生殖細胞の分化を制御していると結論づけた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	360,000	3,760,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

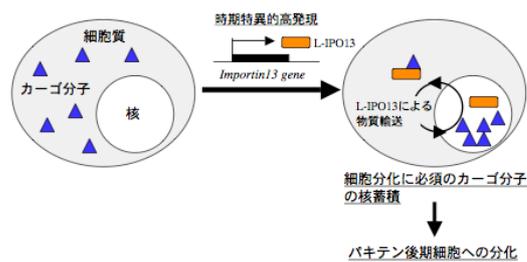
キーワード：生殖細胞、減数分裂、Ipo13、マウス、組織培養

## 1. 研究開始当初の背景

幾つかの分子の細胞内局在の変化が、細胞

分化等を誘導することよりその生命現象を制御していることはよく知られているが、そ

の細胞内局在変化の引き金となる Importin などの分子自体の発現特異性やその発現制御機構、そしてその物質輸送活性の制御機構、さらには細胞分化に着目した研究は、これまで殆どされていなかった。Ipo13 遺伝子は、細胞質核間の物質輸送を担う Importin-beta ファミリーに属するが、他の Importin-beta とは異なり、Importin-alpha と複合体を形成せず、単独で物質輸送を行なう非常にユニークな分子であり、すでに標的となる物質分子が幾つか同定されていた。マウスでは、減数分裂期の生殖細胞にダイナミックな発現様式を示し、全長(long)の Ipo13(L-Ipo13) 遺伝子産物の発現低下解析から、標的カーゴ分子のひとつである ubiquitin-conjugating enzyme 9(UBC9)の核への局在化が阻害されること、およびパキテン後期へと分化した生殖細胞の細胞数の減少を引き起こすことの二つの結果を得て、L-Ipo13 の生殖細胞での時期特異的な高発現が、減数分裂の進行において重要な役割を果たすと考えられる分子群の細胞内局在を変化させ、細胞分化を起すトリガーになっていると結論づけた(図1)。しかし、L-IP013 の物質輸送活性の制御機構や細胞分化制御については不明のままであった。



(図1 L-IP013 の高発現によるカーゴ分子の細胞内局在化)

## 2. 研究の目的

マウス減数分裂期生殖細胞において、ダイナミックな発現様式を示す Ipo13 遺伝子の標的カーゴ分子のひとつである ubiquitin conjugating enzyme 9(UBC9) の核への局在

化及び減数分裂の進行に着目して解析を進め、Ipo13 遺伝子の物質輸送活性の制御機構や細胞分化における働きを明らかにすることを試みた。

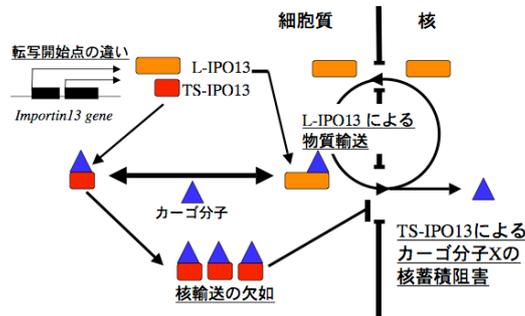
## 3. 研究の方法

マウス生殖細胞由来の培養細胞にリポフェクション法により遺伝子発現ベクターや siRNA を導入後、免疫染色法や核染色法によって染色し、標的カーゴ分子である UBC9 の核局在変化によって遺伝子の過剰発現やノックダウンによる影響を評価した。また、マウス減数分裂期生殖巣(胎仔卵巢)に顕微鏡下で手術をおこない、上記と同様の遺伝子導入をおこなった後、in vitro での組織培養系を用いて培養した。培養後の組織は、免疫染色法や核染色法により生殖細胞の核を染色し、減数分裂期の段階別に分類して遺伝子の過剰発現やノックダウンによる影響を評価した。

## 4. 研究成果

転写開始点の使い分けによって得られると推測される TS-IP013 は、Ipo13 遺伝子の全長産物である L-IP013 の細胞質核間のシャトリングに必要と考えられる領域を欠損しているが、カーゴ分子の結合領域を保持している。培養細胞において、L-IP013 の強制発現は標的カーゴ分子である UBC9 の核局在を誘導するのに対して、TS-IP013 の強制発現では UBC9 の核への局在化を誘導しなかった。これは TS-IP013 が標的分子を結合したまま細胞質に留まるためと考えられた。そこで L-IP013 と TS-IP013 の共発現をおこなったところ、TS-IP013 が L-IP013 の UBC9 の輸送を阻害することが観察された。また、組織培養した生殖巣では、UBC9 が核局在を示さない条件で減数分裂期生殖巣を培養した場合に、パキテン期後期へ分化した細胞数の減少する様子が観察された。以上の結果から、転写開始点の使い分けによって得られると推測される TS-IP013 は、Ipo13 遺伝子の全長産物である L-IP013 の細胞質核間輸送活性を低下さ

せ、減数分裂期の生殖細胞の分化を制御している」と結論づけた (図 2)。



(図 2 *Ipo13*遺伝子によるカージョ分子輸送活性制御機構)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Yasuka L. Yamaguchi, Satomi S. Tanaka, Ryuichi Nishinakamura, *Sall4* is required for mouse primordial germ cell development. COE Mini Symposium, February 19<sup>th</sup> 2009, Kumamoto Univ., Kumamoto. \* oral presenter.
- ② Yasuka L. Yamaguchi et al., *Sall4* is essential for development of mouse primordial germ cells. The 23<sup>rd</sup> Naito Conference, Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells [III], 11<sup>th</sup>-14<sup>th</sup> November, 2008, Shonan Village Center, Kanagawa, Japan
- ③ Satomi S. Tanaka, Yuka Fujimoto, Yasuka L. Yamaguchi, Hiroki Kobayashi and Ryuichi Nishinakamura, *Six1* and *Six4* Homeoproteins are required for Sex Determination in Mice. International symposium for gonad and brain sex differentiation, September 14<sup>th</sup>-16<sup>th</sup>, 2008, LAL resort Sea Hawk hotel Fukuoka,

Fukuoka

- ④ Satomi S. Tanaka, Akihiro Nakane, Yasuka Y. Yamaguchi, Sayoko Fujimura, Makoto Asashima, Ryuichi Nishinakamura, *Dullard* is essential for primordial germ cell formation and posterior extraembryonic mesoderm differentiation in the gastrulating mouse embryo. Annual meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (jointly sponsored by International Society of Developmental Biologists) May 28<sup>th</sup>-30<sup>th</sup>, 2008, Tokushima Arts Foundation for Culture, Tokushima
- ⑤ Yasuka L. Yamaguchi et al., Stage-specific Importin13 activity regulates meiosis of germ cells in the mouse. Annual meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (jointly sponsored by International Society of Developmental Biologists) May 28<sup>th</sup>-30<sup>th</sup>, 2008, Tokushima Arts Foundation for Culture, Tokushima
- ⑥ Yasuka L. Yamaguchi et al., マウス生殖細胞発生における *Sall4* 遺伝子の分子機構の解析、80<sup>th</sup> Annual Meeting for the Japanese Biochemical Society (Biochemistry and Molecular Biology 2007, BMB2007), December 11<sup>th</sup>-15<sup>th</sup>, 2007, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan
- ⑦ Yasuka L. Yamaguchi et al., マウス生殖細胞形成・分化における *Sall4* 遺伝子の分子機構の解析、40<sup>th</sup> Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists 2007 (JSDB2007)、May 28<sup>th</sup>-30<sup>th</sup>, 2007、Fukuoka Dome, Fukuoka, Japan

〔図書〕（計1件）

- ① Satomi S. Tanaka, Yasuka L. Yamaguchi,  
Vanessa J. Jones and Patrick P. L. Tam.  
Analyzing gene function in whole mouse  
embryo and fetal organ *in vitro*. *In*  
Methods in Molecular Biology (M.  
Lewandoski ed.), Humana Press. (in  
press) 著書 (Chapter の一つを担当) のた  
め査読なし。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山口 泰華 (YAMAGUCHI YASUKA)

熊本大学・発生医学研究センター・研究員

研究者番号：90448522

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：