

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791159

研究課題名 (和文) 染色体異常による不妊に関する研究

研究課題名 (英文) Study on infertility by chromosomal aberration

研究代表者

吉田 佳世 (YOSHIDA KAYO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30311921

研究成果の概要： 減数分裂期の染色体動態の解明は、不妊の原因究明や胎児の染色体異常において重要な課題である。我々は減数分裂の染色体分配に関与するシュゴシン遺伝子 (Sgo1, Sgo2) のノックアウトマウスを作製したが、胚性致死であった。また、マウスにおいて Sgo1, Sgo2 遺伝子は胸腺・脾臓・小腸・子宮・卵巣・精巣などに発現し、両遺伝子は、細胞の増殖に関連していることが明らかとなった。さらに、その発現量は Sgo2 遺伝子が精巣において極端に高いなど特徴が見られたことから、両遺伝子は異なる機能を果たし連携していると考えられた。

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	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：産婦人科学

科研費の分科・細目：生殖医学

キーワード：遺伝子、細胞・組織、発現制御、発生・分化

1. 研究開始当初の背景

わが国にとって少子化は重要な問題であり、晩婚化や不妊による影響も大きいと考えられる。近年、晩婚化が進む中、母体の年齢上昇に伴う胎児の染色体異常の発生率が高まることは、出産を希望する女性にとって重大な不安要因である。また、年齢に関わらず健康な夫婦の15%に見られる不妊症も、深刻な問題である。現在は、体外受精・胚移植 (IVF-ET) や卵細胞質内精子注入法 (ICSI) な

どの補助生殖医療技術 (ART) の技術が確立し、わが国でも年間10,000人以上の新生児が出生するようになったが、反面、ARTに用いられる未受精卵は減数分裂過程にあり、染色体分配は体外受精と同時に進行することから、胎児の染色体異常 (異数性) の危険性が懸念される。染色体の異数性は、胎性致死となることが多く、無事生まれることができて、21番染色体がトリソミー (3本) になるダウン症候群、性染色体数に異常が見られる

クラインフェルター症候群などの疾患を伴うことがある。このような染色体異常は、減数分裂期における染色体分配の異常と密接に関わると予想される。最近、東京大学分子細胞生物学研究所渡辺 嘉典教授によって、酵母において染色体の分離を動原体で保護しているシュゴシンタンパク (Sgo1, Sgo2) が発見された (Nature. 427 (6974):510-517, 2004.)。哺乳動物個体におけるSgo1, Sgo2遺伝子による染色体分配のメカニズムを解明することにより、不妊と染色体異常(異数性)の関連の解明につながることを期待できる。さらに、将来、より安全な妊娠・出産及び効果的な不妊治療の開発への貢献が期待できる。

2. 研究の目的

哺乳動物個体におけるSgo1, Sgo2遺伝子の染色体分配のメカニズムを解明することにより、不妊と染色体異常(異数性)の関連の解明につなげる。

3. 研究の方法

(1) マウスについて Sgo1, Sgo2 遺伝子の組織での発現を解析する。

- ① 各臓器における mRNA の発現をノーザンブロットで解析する。
- ② 各臓器におけるタンパク質の発現及び局在を免疫染色で解析する。

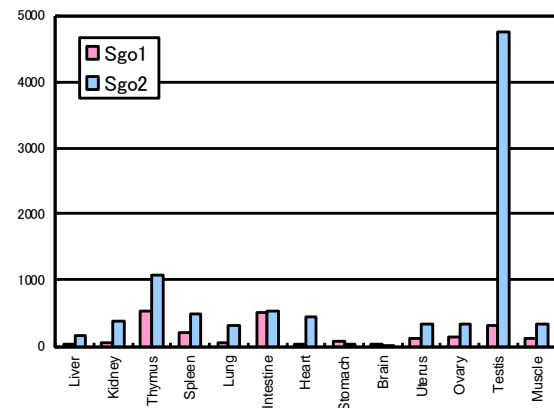
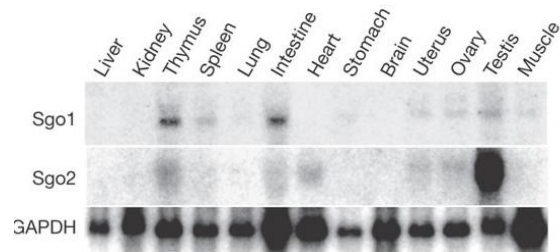
(2) 減数分裂特異的に発現する Cre-loxP システムを確立し、Cre によって Sgo1, Sgo2 遺伝子を欠損できるマウスを作製し、哺乳動物における染色体分配のメカニズムと解析をする。

- ① Sgo1, Sgo2 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスを作製する。
- ② 減数分裂特異的に Cre を発現するトランスジェニックマウスを作製する。
- ③ ①と②のマウスを交配し減数分裂特異的に Sgo1, Sgo2 遺伝子を発現抑制したマウスを作製する。
- ④ ③のマウスについて、卵子と精子における染色体の動態及び染色体異常の有無等を解析する。さらに、減数分裂関連遺伝子への影響について解析し、減数分裂全体の中での相互関係を解析する。

4. 研究成果

(1) マウス組織における Sgo1, Sgo2 遺伝子の発現

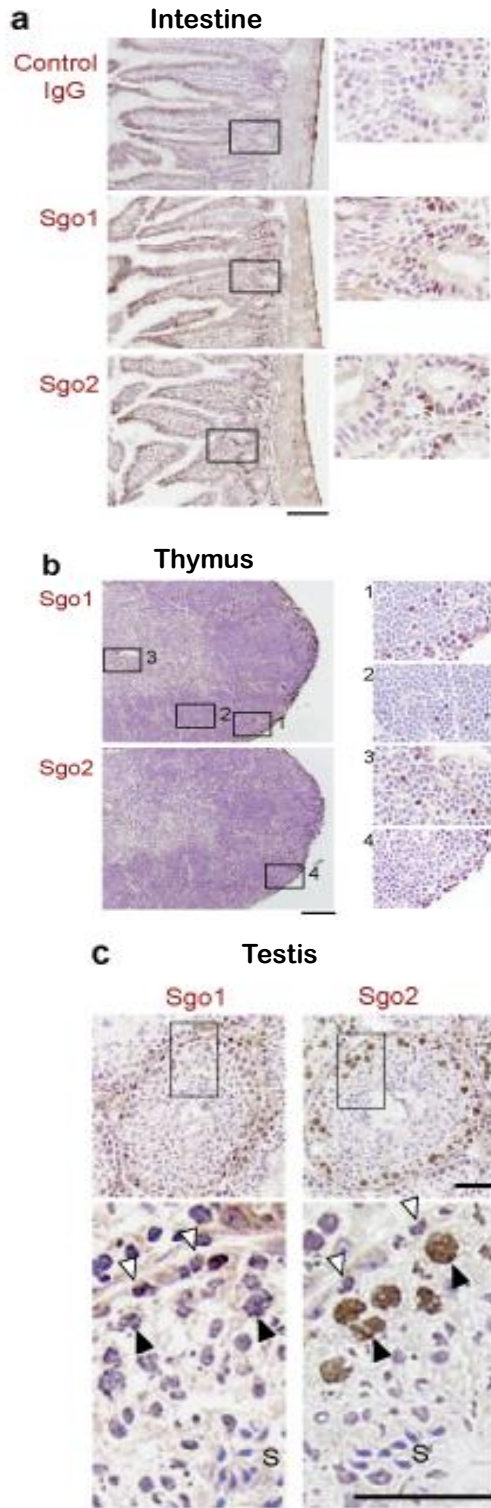
マウスについて、減数分裂における染色体の分配に関連するSgo1, Sgo2 遺伝子のmRNA の発現をノーザンブロットで解析した(図1)。その結果、Sgo1, Sgo2 遺伝子は胸腺・脾臓・小腸・子宮・卵巣・精巣などに発現していた。特に、Sgo2 遺伝子が精巣において極端に高いなど特徴が見られたことから、両遺伝子の機能は異なると考えられる。



(図1) マウスにおけるSgo1, Sgo2遺伝子の mRNA の発現

両遺伝子のタンパク質の発現を免疫染色により解析した(図2)。小腸では、Sgo1とSgo2タンパク質の両方が有糸分裂の盛んな幹細胞を含む絨毛の基底部に発現していた(図2-a)。また胸腺では、Sgo1とSgo2タンパク質の両方が外側の外皮の幼若なT細胞及び胸腺内部の細胞で発現していた(図2-b)。これらのことから、体細胞において、Sgo1, Sgo2 遺伝子が増殖の盛んな臓器の体細胞分裂に密接に関連していることが明らかとなり、Sgo1, Sgo2遺伝子のノックアウトマウスが胚性致死になることの原因と考えられた。さらに精巣においては、Sgo1タンパクが精原細胞

に局在するのに対し、Sgo2タンパクが減数分裂の前期のパキテン期に局在していたことから、減数分裂において両遺伝子は異なる役割を果たし連携していると考えられた(図2-c)。

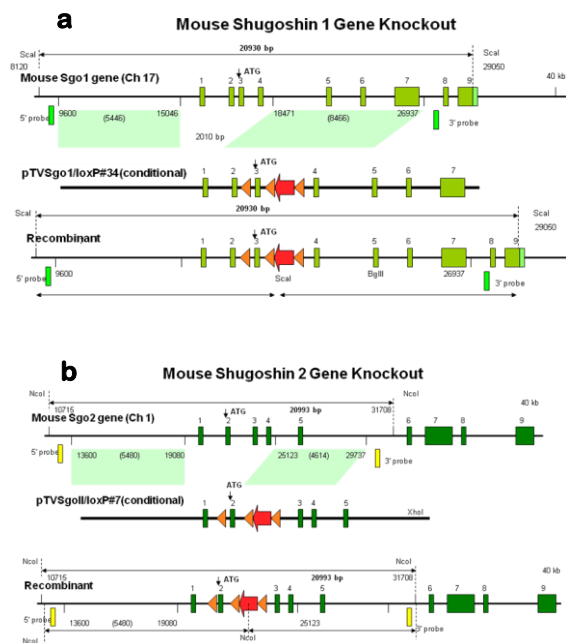


(図2) マウスにおけるSgo1, Sgo2タンパクの発現

(2) 減数分裂特異的に発現する Cre-loxP システムを用いた Sgo1, Sgo2 遺伝子欠損マウスの作製。

Sgo1, Sgo2 遺伝子の欠損と卵子と精子における染色体の動態及び染色体異常の有無等を解析するために、Sgo1, Sgo2 遺伝子のノックアウトマウス作製したが、胚性致死になった。

そこで、減数分裂特異的に発現する Cre によって Sgo1, Sgo2 遺伝子を抑制するマウスを作製するためのターゲティングベクターを構築し(図3)、ES細胞に導入し、得られたヘテロの細胞をマウスの受精卵と凝集させキメラマウスを得た。このキメラマウスよりヘテロマウスを得た。



(図3) Sgo1, Sgo2遺伝子のコンディショナルノックアウトのためのターゲティングベクター

また、減数分裂特異的に発現している Rec8 遺伝子の下流に Cre 遺伝子を融合させた発現ベクターを構築し、トランスジェニックマウスを作製したが、Rec8 が胎児期にも発現していたことから、Sgo1, Sgo2 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスとの交配に使用できなかった。

そこで、現在、減数分裂期に特徴的に発現しシナプトネマ構造を作成する遺伝子(SCP

遺伝子)のプロモーターの下流に Cre 遺伝子を融合させたトランストランスジェニックマウスを購入し、コンディショナルノックアウトマウスと交配している。

今後、これらのマウスの卵子と精子における染色体の異常を解析する。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Sun J., Yomogida K., Sakao S., Yamamoto H., Yoshida K., Watanabe K., Morita T., Araki K., Yamamura K. and Tateishi S.

Rad18 is required for long-term maintenance of spermatogenesis in mouse testes.

Mechnisms. Dev. 126, 173-183 (2009)

査読有

- ② Lee J., Kitajima T., Tanno Y., Yoshida K., Morita T., Miyano T., Miyake M., Watanabe Y.

Unified mode of centromeric protein by shugoshin in mammalian oocyte and somatic cells.

Nature cell biology. 10, 42-52,

(2008) 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Yoshida K., Yoshida S., Morita T.
Effects of X-radiation to development of mammalian embryos.
19th Annual NASA Space Radiation Investigators' Workshop
2008年7月1日米国・フィラデルフィア

- ② 吉田佳世、吉田周平、森田 隆
宇宙放射線が哺乳動物の生殖細胞に及ぼす影響の研究
日本宇宙生物科学会第 22 回大会
2008年9月26日奈良県立医科大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 佳世 (YOSHIDA KAYO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30311921

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし