

機関番号：82612

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 年度～2010 年度

課題番号：20570210

研究課題名（和文） 性決定、性分化における microRNA の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of microRNAs on sex determination and differentiation

研究代表者

高田 修治（TAKADA SHUJI）

独立行政法人国立成育医療研究センター ゲノム機能研究室・室長

研究者番号：20382856

研究成果の概要（和文）：

マウス胎児期生殖腺支持細胞の発生や性分化に於いて、microRNA が関与しているのかを検討するため、セルソーティングをして精製した雌雄の細胞を用いて高感度 microRNA プロファイリング法である mRAP 法により解析した。TaqMan 法によっても再検討した結果、胎児期 12.5 日の支持細胞で mir-199a-5p が雌で雄より強く発現していることを見いだした。この結果からマウスの生殖腺支持細胞の発生では microRNA の発現に雌雄差があり、性分化や生殖腺発生に microRNA が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To examine if microRNA plays a role in gonad formation and sexual differentiation, microRNA profiles were determined by high-sensitive microRNA profiling method, mRAP, using mouse embryonic supporting cells purified from male and female gonads. The profiles obtained were further verified by TaqMan method. The results shows that mir-199a-5p is preferentially expressed in female supporting cells, suggesting that microRNA is associated with gonad formation and sexual differentiation in supporting cells in mouse embryonic gonad.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：器官形成

キーワード：マウス、microRNA、生殖腺、性決定、性分化

1. 研究開始当初の背景

哺乳類では胎児期の生殖腺は卵巣へと分化し、雌の個体になる。しかし、Y 染色体上の雄決定遺伝子 *Sry* が胎生期に生殖隆起中で発現すると精巣へと分化し、精巣から作られる

ホルモン（テストステロン）により雄の個体になる。また、*Sry* は生殖腺の未分化支持細胞で発現し、セルトリ細胞への細胞の分化を引き起こすため、セルトリ細胞の分化が個体の雄への決定を意味する。*Sry* 遺伝子が雄決

定遺伝子であると分かってからすでに 16 年が経過しているが、その標的や機能などほとんど未解明なままである。一つの仮説として 10 年程前に提唱された説では、Sry は転写を抑制するタンパク質であり、性決定に関して生殖腺が雄に分化することを抑制している因子（仮定の Z factor と呼ばれている）を抑制することにより機能している可能性がある。一方 Sry 以外にも雌雄生殖腺で片方のみしか発現しない遺伝子は見つかつてきているが、そのほとんどはどのような分子機構により働いているのか不明である。そのため、性決定、性分化および個体全体が雌雄へと形作られるメカニズムを理解するためには生殖腺において雌雄で発現に差のある分子のさらなる同定とそれらの分子ネットワークの解明が必要である。現在も世界中で雌雄差のある遺伝子の同定が試みられている。しかし分子ネットワークの解明には雌雄の胎児期の生殖腺で発現に差のある microRNA (miRNA) の同定が必要不可欠であるが、発生段階の生殖腺は小さく、発現に雌雄差のある miRNA の同定は困難であった。

miRNA は約 22 塩基長の non-coding RNA であり、標的とする mRNA の 3' 非翻訳領域 (UTR) に結合し、その翻訳をブロックする新たな蛋白質発現制御因子として現在注目を浴びている。タンパク質をコードする mRNA 全体の約 30% は miRNA の制御を受けているとの報告もある。近年 transcriptome 解析や proteomics 解析が次々と報告されてきているが、真核生物における両データの相関は一般に低く、遺伝子の転写と翻訳の間にはそれを直接的に制御している分子の存在が予想されてきた。近年発見された miRNA がそのミッシングリンクではないかと考えられている。miRNA は個体の発生・細胞分化、細胞の癌化に関与する事が示唆されているが、その機能はほとんど未解明なままである。miRNA の機能解析があまり進んでいないのは、RNA としては小さく扱いが困難であること、高効率なクローニング法が存在しないこと、未同定の miRNA が多数存在すること、高発現系が存在しないこと、微量サンプルから microRNA の発現プロファイリングが難しかったこと等があげられる。申請者はこれまで、これらの問題点を解決すべく miRNA の実験系を開発してきた。申請者はわずか 1×10^4 の細胞があれば miRNA の発現プロファイリングが可能な miRNA amplification profiling (mRAP) 法を近年開発した (Takada et al., Nucleic Acids Research 34:e115, 2006)。この mRAP 法を用いることで高効率かつ大量に miRNA を

クローニング可能であり、それを大規模にシークエンスすることで、クローン出現頻度から miRNA の発現プロファイリングも決定可能である。私は胎生 13.5 日マウスの性分化が始まって初期の胎生 13.5 日の生殖腺全体を用いて mRAP 法により miRNA の発現プロファイルを同定し、雌雄で差のある miRNA を複数同定し、ノーザン解析により確認してきた。これらの研究から miRNA は生殖腺での細胞分化に関与していることが示唆されている。

2. 研究の目的

性決定、性分化に於いて直接的に関与する miRNA の同定を目指して、本研究計画で申請者は性決定、性分化に最も重要なセルトリ細胞にしぼり、まずこの細胞での miRNA のプロファイリングを行う。そのため、性分化初期の支持細胞 (セルトリ細胞と卵胞細胞、共に同一起原の細胞) で Green fluorescent protein (GFP) を発現するトランスジェニックマウス (Tgマウス) を用いて胎児期生殖腺から雌雄でそれぞれ支持細胞をセルソーターにより分取し、我々が開発した mRAP 法を応用し性決定時期特異的あるいは性分化特異的に発現する miRNA を網羅的にスクリーニングする。この研究によって得られるデータはまだ未解明な miRNA の性分化への影響を評価でき、また生殖腺発生・分化を理解するための重要な情報となる。本研究のように胎児の一種類の細胞種のみから miRNA をプロファイルした研究は他に類がなく、また、未同定の miRNA を含む網羅的な解析が可能な研究室はまだ世界にもあまり存在しない。

さらに、個々の miRNA が性決定、性分化にどの様に関与しているのかを評価することも重要であると考えられるため、上記の支持細胞の miRNA のプロファイリングにより得られた「雌雄で発現に差のある miRNA」に関して、gain-of-function (GOF) と loss-of-function (LOF) の実験により性決定、性分化における機能を解析する。GOF または LOF により性決定、性分化で機能していることが明らかになった miRNA に関しては、さらにその標的 mRNA を同定する予定である。この一連の研究により、性決定、性分化に関与している mRNA と miRNA のネットワークを解明していきたく。

また、miRNA は抑制系の分子である事から上述の Z factor の候補とも考えられるため、雌に於いて雄より高く発現している miRNA に関しては Sry 遺伝子産物の存在により発現が低下するかを評価し、Z factor である可能性を検討したい。

3. 研究の方法

(1) 性決定、性分化において miRNA による制御が必須のものであるのか、または関連遺伝子産物の翻訳を調整しているものであるのかを検討する。

まず生殖腺の分化における miRNA の影響を検討する。ここで得られる結果は以後の実験系を考える上で重要である。miRNA の生合成に必須の Dicer 遺伝子に loxP 配列を導入したマウス (Dicer^{fllox}、既に申請者らが入手し繁殖中) から胎児期生殖腺を取り出し、そこに in vivo electroporation 法により Cre 遺伝子を導入し、cre-lox システムにより生殖腺での Dicer 遺伝子ノックアウトを作成後、生殖腺培養法により生殖腺分化を進行させ、性分化関連遺伝子の Wholemount in situ hybridization (WmISH) を実行する。もし、性決定、性分化において miRNA による制御が必須のものであれば、正常の生殖腺とは異なった形態や性分化関連遺伝子の発現様式を示すと予想される。

(2) 胎児期生殖腺支持細胞 (セルトリ細胞、卵胞細胞) での miRNA の発現プロファイルを明らかにする。

Eicher らにより作成された Sry プロモーターに GFP を繋いだ Tg マウス (Albrecht & Eicher, Dev. Biol. 240:92-107, 2001, Jackson Institute から購入可能) では胎児期では恒常的に支持細胞 (セルトリ細胞、卵胞細胞) 特異的に GFP が発現している。この Tg マウスでは支持細胞で GFP が発現するものと期待される。本研究ではこのマウスを用いて胎児期の支持細胞 (セルトリ細胞、卵胞細胞) を GFP を指標にセルソーターにより分取し (精製度の確認は既知の生殖腺細胞特異的遺伝子の発現により行う)、高感度 miRNA プロファイリング法である mRAP により胎児期セルトリ細胞と卵胞細胞の miRNA 発現プロファイルを得る。この際、illumina 社の超大量シーケンサーにより行い、一度に大量の配列を回収し、コンピュータにより miRNA 発現プロファイルを同定する、これにより、性決定、性分化に関与する miRNA が網羅的に明らかになるとともに、多数の新規 miRNA が同定されるものと期待される。得られた miRNA 発現プロファイルは分取した細胞の real-time RT-PCR により確認する。

(3) 性分化に関与している miRNA のスクリーニング。

GOF による解析：2 の項目により得られた雌雄で発現に差のある miRNA の強制発現ベクターを申請者の作成した発現ベクターライブラリーから選び、雄で高く発現しているもの

は雌の生殖腺に、雌で高く発現しているものは雄の生殖腺に in vivo electroporation により導入し、生殖腺培養法と性分化関連遺伝子の WmISH 法により検討する。どの性分化関連遺伝子をマーカーとして用いるのかは 1 の項目の実験結果により決定する。単独の miRNA により表現形があらわれない場合には複数個の miRNA を組み合わせての解析も実行する必要があると考えている。

LOF による解析：市販の各 miRNA に対する miRNA 阻害用のオリゴマーを同様に生殖腺に導入し、LOF による解析を GOF による解析と同様に実行する。

レスキューによる解析

強制発現ベクターと cre 発現プラスミドを Dicer^{fllox} の生殖腺に導入し、Dicer KO の表現形をレスキューできるのかを検討する。この際、項目 1 の結果に基づき、適切なアッセイ系を選択する。たとえば、Dicer KO により性転換が起こるのであれば性転換のレスキューを試み、性分化のある段階またはあるマーカー遺伝子の発現を抑制するならば、その部分のレスキューを試みる。

(4) 雌雄で発現に差のある miRNA の標的 mRNA の同定。

胎児期生殖腺の分化を分子レベルで理解するには、miRNA の発現プロファイルだけではなく、mRNA の発現プロファイルとの比較と、miRNA と mRNA の相互作用の理解が必須である。このため、2 の項目により同定された雌雄で発現に差のある miRNA の標的 mRNA を公的な miRNA 標的予測プログラムを用いて抽出し、標的候補 mRNA の 3' UTR をプラスミド中の luciferase 遺伝子に繋ぎ、luciferase 活性が miRNA 強制発現により変化するかを検討することにより同定を試みる。これにより標的が同定されれば、さらに市販の抗体を用いてウエスタン解析により miRNA の存在により翻訳が抑制されていることを確認する。また、現在申請者は miRNA と mRNA が細胞内で認識しあう RISC と呼ばれる構造を免疫沈降することにより miRNA の標的 mRNA を同定する手法を開発中であり、この手法が使えるようなら本研究にも応用する。

4. 研究成果

(1) 胎児期生殖腺支持細胞に於いて、miRNA の発現に雌雄差があるのかを検討した。胎児期生殖腺支持細胞特異的に EGFP を発現するマウスを得るため、Jackson Institute から Sry 周辺の 14.6kb のゲノム断片中の Sry を EGFP に置き換えた配列をトランスジーンと

して持つ Tg マウス (Sry-EGFP) を導入した。Sry-EGFP では胎児期生殖腺支持細胞特異的に EGFP を発現するため、EGFP を指標にセルソーターにより胎児期 11.5 日、12.5 日、13.5 日の支持細胞を回収し total RNA と small RNA を分取後、total RNA から RT-PCR により細胞の純度を検討した。その結果胎児期 13.5 日雌の細胞以外は純度が高く回収されていた。胎児期 13.5 日の雌以外の各支持細胞の small RNA を用いて mRAP 法と illumina 社 Genome Analyzer にて塩基配列の決定を行った。各サンプルからそれぞれ 20 万個以上の高精度の塩基配列情報を収集し、microRNA のプロファイリングを行った。塩基配列情報を microRNA のデータベースである miRBase に BLAST により同源性検索し、既知の microRNA に完全一致したものを抽出した。多量に存在する microRNA は塩基配列を決定する際により多数回配列が出現するものと考えられるため、配列の出現回数を発現頻度としている。雌雄での発現の差を検討するためには、内在性のコントロールとなる microRNA が知られていないため、塩基配列の際に同定されたすべての microRNA の数の総和を分母にし、個々の microRNA の出現数を分子にし、発現頻度は割合で計算した。雌雄で発現に差のある microRNA と、差の無い microRNA の存在が示唆される結果を得た。発現の高い microRNA について雌雄差のあるものとないものを TaqMan 法により microRNA の発現量の雌雄差を再検討したが、その約半分のもので mRAP 法と TaqMan 法で一致する結果であったが、残りの半分は不一致であった。解析に用いた細胞数が数千個と少なかったため、安定した結果が得られなかった可能性が考えられる。今後解析のための細胞数を増やし、mRAP 法により再検討するため、Sry-EGFP から胎児期生殖腺支持細胞を回収した。この細胞を用いての microRNA プロファイルを得るには時間的に進めることができなかったが、今後解析する必要があると考えている。また、昨年度得た microRNA 発現プロファイルから miR-199a-5p が mRAP 法、TaqMan 法で共に雌の発現が胎児期指示細胞では雌特異的であることが確認できた。今後 miR-199a-5p の機能を解析することにより、雌の生殖腺の発生や性分化に於ける microRNA の機能が明らかになる可能性がある。

以上の結果からマウスの生殖腺支持細胞の発生では miRNA の発現に雌雄差があり、性分化や生殖腺発生に miRNA が関与していることが示唆された。

表1 マウス胎児期生殖腺でのmicroRNAの発現プロファイル (発現量の上位 10 microRNA)

% miRNA	E11.5 Male	E12.5 Male	E11.5 Female	E12.5 Female
mmu-miR-142-5p	13.14	0.03	13.79	18.13
mmu-miR-191	10.25	0.02	3.85	16.23
mmu-miR-146a	10.07	0.00	0.00	0.00
mmu-miR-24	8.98	0.02	2.86	3.66
mmu-miR-199a-5p	7.19	0.00	0.00	2.15
mmu-miR-143	6.27	20.72	4.10	10.49
mmu-miR-29c	5.41	0.00	0.00	0.00
mmu-miR-16	5.27	0.00	0.00	0.00
mmu-miR-1	5.00	1.86	0.07	0.52
mmu-miR-1-2-as	3.83	1.86	0.07	0.52

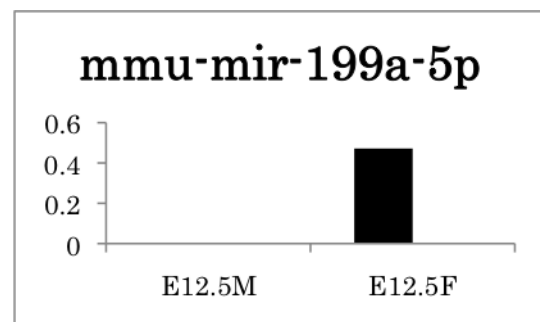


図1 TaqMan 法による mmu-mir-199a-5p の発現定量。サンプルには雌雄胎児期 12.5 日の生殖腺支持細胞を使用。縦軸の単位は arbitrarily。RNA の input 量の normalization には U6 を使用した。

(2) 性決定、性分化への miRNA の関与を検討するため、Dicer 遺伝子に loxP 配列を導入したマウスの生殖腺に cre 発現ベクターを in vivo electroporation で導入し、その後培養することにより生殖腺での Dicer 遺伝子のノックアウトを試みが、安定した結果を得ることができなかった。そのため、方法 (3) 及び (4) の実験まで解析することができなかった。今後別の遺伝子導入システムを利用して解析する必要がある。

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 1 件)

- ① Takada S, Berezikov E, Choi YL, Yamashita Y, Mano H. Potential role of miR-29b in modulation of *Dnmt3a* and *Dnmt3b* expression in primordial germ cells of female mouse embryos. *RNA* 15:1507-1514 (2009). (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 高田修治、上野敏秀、間野博行 雄のマウス胎児期生殖巣では始原生殖細胞で ribosomal RNA から microRNA が生合成されている. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会合同大会、神戸、2008 年 12 月 9-12 日
- ② Shuji Takada, Yoshihiro Yamashita, Hiroshi Asahara, Hiroyuki Mano Comprehensive analysis of microRNA expression. 第 68 回日本癌学会 Symposium on microRNA and cancer、横浜、2009 年 10 月 2 日
- ③ 高田修治 次世代シーケンサーとマイクロ RNA 研究. 第 11 回運動器科学研究会 特別講演 最先端の研究技術による生物学シリーズ、軽井沢、2010 年 9 月 10-11 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 修治 (TAKADA SHUJI)
独立行政法人国立成育医療研究センター
・ゲノム機能研究室・室長
研究者番号：20382856

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：