

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659715

研究課題名(和文) 雄性減数分裂期のXYボディ形成におけるY染色体の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the Y chromosome in the XY body formation of male meiotic

研究代表者

盛 真友 (SAKARI, Matomo)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・特任助教

研究者番号：90466772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はRNAスプライシングを介した減数分裂制御機構の解明に向けて1) 減数分裂特異的、XY body特異的スプライシング標的hnRNAの取得を試み、Rbmyに結合するmRNA前駆体であるヘテロ核RNA群を探索した。精原細胞由来細胞株NEC14においてRbmyを用いたRNA-タンパク質免疫共沈降法の詳細な条件検討を行い、Rbmy結合hnRNA群の一部の同定に成功した。2) Rbmyを標的としたshRNA発現ノックダウンマウスの作出を試み、ノックダウン型ベクターを構築し細胞レベルでの条件を検討した。さらに組織特異的なノックダウンを制御するためにpol IIで制御されるベクターの構築を行った。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted toward the elucidation of meiotic control mechanism via RNA splicing. 1) I was searching for a group of heterogeneous nuclear RNA is an mRNA precursor attempts to get meiosis-specific, the XY body-specific splicing target hnRNA, binds to Rbmy. To perform a detailed examination of conditions RNA-protein co-immunoprecipitation method using Rbmy in spermatogonia-derived cell lines NEC14, were successfully identified some of hnRNA Rbmy join group. 2) Attempts to produce the shRNA expression knockdown mice targeting Rbmy, was investigated conditions at the cellular level by building a knock-down vector. It was constructed in the vector to be controlled by the pol II to control knockdown tissue-specific manner.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：Y染色体 スプライシング

1. 研究開始当初の背景

減数分裂において常染色体では減数分裂開始に二重鎖切断の機能をもつ Spo11 が鍵分子として知られている。近年、アメリカのグループによって XY ボディの形成には Spo11 の雄性特異的なスプライシングアイソフォームが重要であるという報告がなされた (Kauppi L et al., Science 2011)。しかしながら Spo11 のスプライシングアイソフォーム調節機構は未解明である。一方、申請者は独自に Y 染色体上の RNA 結合モチーフタンパク質 Rbmy に着目し解析を行った結果、いくつかの雄性特異的なスプライシングアイソフォームを見出した。その解析の過程において XY ボディ形成にかかわる Spo11 を見出し、Rbmy による XY ボディ調節機構の解析を推進しようと考えた。

XY ボディ形成における重要な問題のひとつは、DNA 複製と遺伝子組み換え開始に関わる遺伝子群のいくつかは雄性特異的なアイソフォームを持つが、その生成機構が不明なことである。これを踏まえて本研究では RNA スプライシングを介した減数分裂制御機構を明らかにしたい。

2. 研究の目的

哺乳類の Y 染色体は常染色体とは大きく異なり、減数分裂時に X 染色体と相同組み換えを起こさない非相同領域が大部分を占める。したがって、Y 染色体は男性特異的な固有の機能が保持できるものと考えられている。しかし、実際の減数分裂の過程では、Y 染色体は X 染色体と対合し、XY ボディと呼ばれる特化したクロマチン構造体を形成する。この XY ボディの形成が転写サイレンシングを誘導し、一連のヘテロクロマチン関連蛋白質がリクルートされる。しかしながら、XY ボディ形成の調節機構、及び転写サイレンシングと相同組換の制限に関する情報は極めて乏しいのが現状である。そこで、本研究では、Y 染

色体自身から転写される RNA 結合タンパク質がスプライシング調節を通じて XY ボディ形成を誘導するという仮説に基づき研究を推進することで、哺乳類における性染色体対合及び組み換え制御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 減数分裂特異的、XY ボディ特異的なスプライシング機構の解析

Rbmy を発現している精原細胞由来細胞株を用いて Rbmy を標的とした shRNA を安定的に導入し、shRNA を構成的に発現する細胞株を樹立する。この細胞株を用いてマイクロアレイ解析を行い変動する標的エクソンを含む mRNA 前駆体(hnRNA)を同定する。また標的として同定された hnRNA は RT-PCR および Mini-gene 解析により確認する。さらに Rbmy タンパク質複合体を取得し、男性特異的 Rbmy 複合体構成因子群を明らかにする。

(2) Rbmy を標的とした shRNA 発現ノックダウンマウスの作出と表現型解析

shRNA 発現ベクターを用いて、Rbmy を標的とする shRNA を全身性に発現するマウスを作出する。表現型解析とともにエクソンアレイ解析を連携させ、標的 hnRNA を同定する。バイオインフォマティクス解析とエクソンアレイ解析を組み合わせることで、Rbmy によって制御される標的 hnRNA を探索する。

4. 研究成果

(1) 減数分裂特異的、XY body 特異的なスプライシング標的 hnRNA の取得を試み、Rbmy に結合する mRNA 前駆体であるヘテロ核 RNA 群を探索した。精原細胞由来細胞株 NEC14 において Rbmy を用いた RNA-タンパク質免疫共沈降法の詳細な条件検討を行い、Rbmy 結合 hnRNA 群の一部の同定に成功した。同定された hnRNA の一部において、選択的なスプライシング領域を含むイントロン、エクソン構造を用いた mini-gene を作成し、Rbmy のスプライシ

ング効果を確認した。また RBMY 相互作用蛋白質をスクリーニングした結果、いくつかの SR 蛋白質群と転写制御因子群を得ることに成功した。

(2) Rbmy を標的としたノックダウンマウスの作出を試みるため、pol で誘導される shRNA 発現ノックダウン型ベクターを構築し細胞レベルでの条件を検討した。その結果、有効なノックダウン効率を示すベクターを完成した。さらに組織特異的なノックダウンを制御するために pol で制御されるノックダウンベクターの構築を試みた。現在 2 種類のベクターの構築に成功し、有効なノックダウン効率を得るため改変を行っている。

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)

Yoshida S, Aihara K, Ikeda Y, Sumitomo-Ueda Y, Uemoto R, Ishikawa K, Ise T, Yagi S, Iwase T, Mouri Y, Sakari M, Matsumoto T, Takeyama K, Akaike M, Matsumoto M, Sata M, Walsh K, Kato S, Matsumoto T. Androgen receptor promotes sex-independent angiogenesis in response to ischemia and is required for activation of vascular endothelial growth factor receptor signaling. Circulation, 査読有、128(1)、2013、60-71、doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001533

Matsumoto T, Sakari M, Okada M, Yokoyama A, Takahashi S, Kouzmenko A, Kato S, The androgen receptor in health and disease、Annu Rev

Physiol., 査読有、75、2013、201-224、doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183656

[学会発表](計 6 件)

盛真友、Y 染色体遺伝子 CDY のアンドロゲンシグナルを介した雄性特異的エピゲノム制御、第 32 回アンドロロジー学会、2013 年 7 月 26 日、大阪国際会議場(大阪府)

盛真友、ヒト Y 染色体精子形成不全領域遺伝子 RBMY のエストロゲンシグナルを介したスプライシング制御、第 20 回ステロイドホルモン学会、2012 年 11 月 18 日、石川県立音楽堂(石川県)

盛真友、Y Chromosomal Azoospermic Factor RBMY and Estrogen Signaling Coordinately Regulate Male-specific Alternative Splicing、15th ICHSHC、2012 年 11 月 17 日、石川県立音楽堂(石川県)

盛真友、ヒト Y 染色体精子形成不全領域遺伝子 RBMY の分子機能解析、The 58th/60th NIBB Conference “Germline-Specification, Sex, and StemCells-”、2012 年 7 月 19 日、Okazaki New Grand Hotel(愛知県)

盛真友、Y 染色体遺伝子群と性ホルモンとの相互作用解析、第 31 回日本アンドロロジー学会、2012 年 6 月 30 日、神戸ポートピアホテル(兵庫県)

盛真友、ヒト Y 染色体精子形成不全領域遺伝子 RBMY の分子機能解析、第 85 回日本内分泌学会、2012 年 4 月 20 日、名古屋国際会議場(愛知県)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

盛 真友（SAKARI, Matomo）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・特任助教

研究者番号：90466772