

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870888

研究課題名(和文) マウス胎仔期雌性生殖腺分化関連因子の転写ネットワークの解析と機能解明

研究課題名(英文) The functional analysis of transcription factors and transcriptional co-factors related to embryonic female mouse gonadal differentiation

研究代表者

加藤 朋子 (Kato, Tomoko)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・研究所 システム発生・再生医学研究部・研究員

研究者番号：10638802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では雌性生殖腺分化に関わる候補遺伝子として18遺伝子を対象に、細胞ベースの強制発現系を用いた評価により、18遺伝子間の発現制御関係を明らかにした。さらに、既存の約800遺伝子の発現ベクターセットを用いて同様の評価を行い、新規卵巣分化候補遺伝子を多数抽出した。さらにCRISPR/Cas9システムを用いてその中の6遺伝子についてノックアウトマウスの作出に成功したが、いずれも顕著な生殖腺形成異常は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：I performed the expression and functional analysis of 18 ovarian differentiation candidate genes to reveal transcriptional network during ovarian differentiation. To elucidate the transcriptional interaction among these genes, first, luciferase assay using cultured cell based overexpression system was conducted. Second, high-throughput screening using same system was conducted to find the novel candidate genes. In addition, in order to identify the essential genes for female gonadal differentiation in vivo, knockout mice for six genes among them were generated using genome-editing technology, CRISPR/Cas9. However, no gonadal abnormality was detected so far.

研究分野：性分化

キーワード：卵巣 転写因子 性分化 ノックアウトマウス

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の雌における生殖腺分化は、形態的变化が乏しい上に、既知の卵巣分化マーカー遺伝子の数が非常に少ない(Gregory SG *et al.*, 2006; Uhlenhaut NH *et al.*, 2009, Nef *et al.*, 2005)ことから、雄の生殖腺分化に比べて研究の発展に遅れが見られている。特に胎仔期の卵巣形成に必須な遺伝子や転写カスケードの全容解明には、卵巣形成やホルモン産生の理解などが重要であるが、ほとんど未解明である。雄では体細胞でY染色体上の *Sry* が発現し、続いて *Sox9*, *Fgf9*, *Amh* などの遺伝子が発現することで、生殖細胞や間質細胞とともに精巣分化を進めていくことが明らかとなっている(Brennan & Capel, 2004, Kanai *et al.*, 2005, Wilhelm *et al.*, 2007)。このように雄では生殖腺形成に必要ないくつかの遺伝子の存在や、それらの分子メカニズムが明らかにされている。以前は *Sry* が発現すると雄へ、発現しないと雌へと分化していくという考えが通説であったが、雌雄生殖腺が分化する前の起源が同一であること、機能欠損すると XX 型雄となる遺伝子が存在することを考えると、雌でも雄と類似の転写カスケードが存在していると考えられる。

## 2. 研究の目的

研究代表者らは、マウスのすべての転写因子・転写コファクターを対象に胎生 13.5 日の生殖腺における発現の雌雄差に着目した Whole-mount in situ hybridization (WISH) データベースを開発している。WISH による、視覚的な雌雄生殖腺の発現差の観察および DNA アレイ解析による定量的な確認の結果、発現差のある転写因子・転写コファクターを 160 種(雄優位: 142 種、雌優位: 18 種)同定しており、これらを転写カスケードに関わる最有力候補因子と考えて解析を行う。本研究課題では雌における転写因子ネットワーク

の概要を築くことを目的とし、独自のハイスループットトランスフェクションアッセイとゲノム編集技術によるノックアウトマウスの作製を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 卵巣分化候補因子の転写制御因子の同定

発現ライブラリを用いた卵巣分化候補因子のハイスループットスクリーニング

研究代表者らは MGC クローン(約 9000 遺伝子)の発現ベクターライブラリと、マウスのすべての転写因子・転写コファクターを対象に行い、独自に開発した WISH データベースを照らし合わせ、現在利用可能な約 800 遺伝子の発現ベクターセットを大容量スクリーニング用に調整した(図 1)。それぞれの卵巣分化候補因子(18 種類)と既知の卵巣分化マーカー遺伝子(*Foxl2*, *Wnt4*, *Rspo1*)の転写開始点から 7.5 kb 上流の配列をルシフェラーゼベクターに組み込んだレポーターコンストラクトと、発現ベクターセットの中の遺伝子1つずつをロボットによって培養細胞にリバーストランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイにより活性の増減を調べた。各レポーターを活性化する因子を比較することにより卵巣分化の上流遺伝子のスクリーニングを行った。

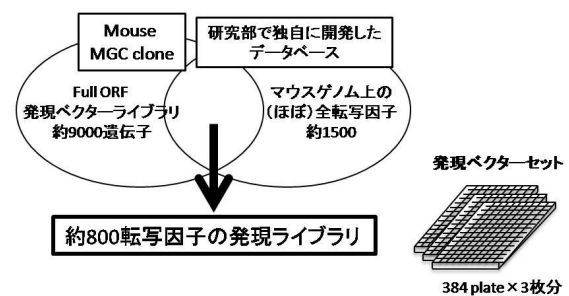


図1 ハイスループットスクリーニングの発現ベクターの選出

卵巣分化候補因子の全長配列を用いた卵巣分化候補因子の相互制御解析

研究代表者らが WISH により抽出した卵巣分化候補因子に関しても の発現ベクター

セットと同じバックボーンベクターの発現プラスミドを作製し、また、同じレポーターコンストラクトを用いて、18種の卵巣分化候補因子と既知の3種の卵巣分化マーカーに限定したルシフェラーゼアッセイを行った(図2)。この解析により、卵巣分化転写候補因子に限定した転写カスケード、転写ネットワークを明らかにすることを試みた。

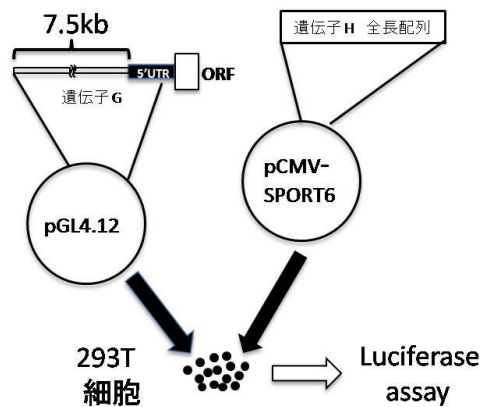


図2 卵巣分化候補因子の全長を用いたルシフェラーゼアッセイ

## (2) CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウトマウスの作製

新たなゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムは、切断したい標的塩基配列を含む guide RNA と Cas9 タンパク質により、ゲノム上の任意の配列を切断するシステムであり、標的配列のデザインやベクターの作製が容易で、マウスでも高効率にノックアウトできることを研究代表者からも報告している。本研究課題においては、*Irx3*, *Dmrtc2*, *Egr1*, *Hmgb1*, *Msx1*, *Mphosph8* の各 6 遺伝子のノックアウトマウスを作製し、エストロゲンやプロゲステロンなどホルモンの分泌が活発に行われる性成熟期前後で組織学的解析により卵巣分化異常あるいは外性器異常の有無を調べることにした。

## 4. 研究成果

### (1) 卵巣分化候補因子の転写制御因子の同定

発現ライブラリを用いた卵巣分化候補因

子のハイスループットスクリーニング  
卵巣分化に関わる転写因子の上流・下流関係を明らかにするため、各卵巣分化候補因子のプロモーター領域(転写開始点より上流 7.5 kb) に対し、既存のマウス MGC クローン(発現ライブラリ)約 800 遺伝子を作用させ、新規卵巣分化候補因子の探索をルシフェラーゼアッセイにより検討した。各遺伝子について活性を上昇させた上位 50 遺伝子を抽出したところ、1 つないし複数のレポーター遺伝子について活性を上昇させたものが計 155 遺伝子存在した。そのうち、卵巣特異的な活性を示したものが 133 遺伝子存在することが明らかとなった。一方で、卵巣分化因子とは無関係のレポーターとも共通に挙がってきたものが 19 遺伝子存在している(図3)。後者の遺伝子群は多数のレポーター遺伝子でも共通に活性を上げていたことから、非特異的に活性を挙げてしまう因子である可能性が考えられる。

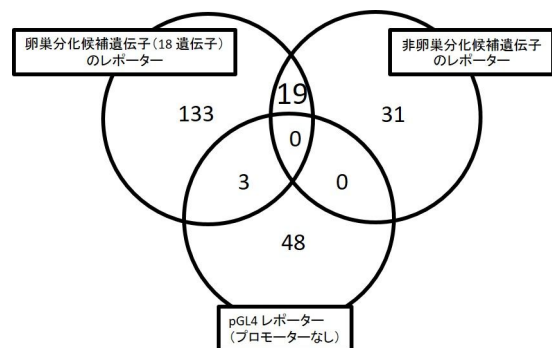
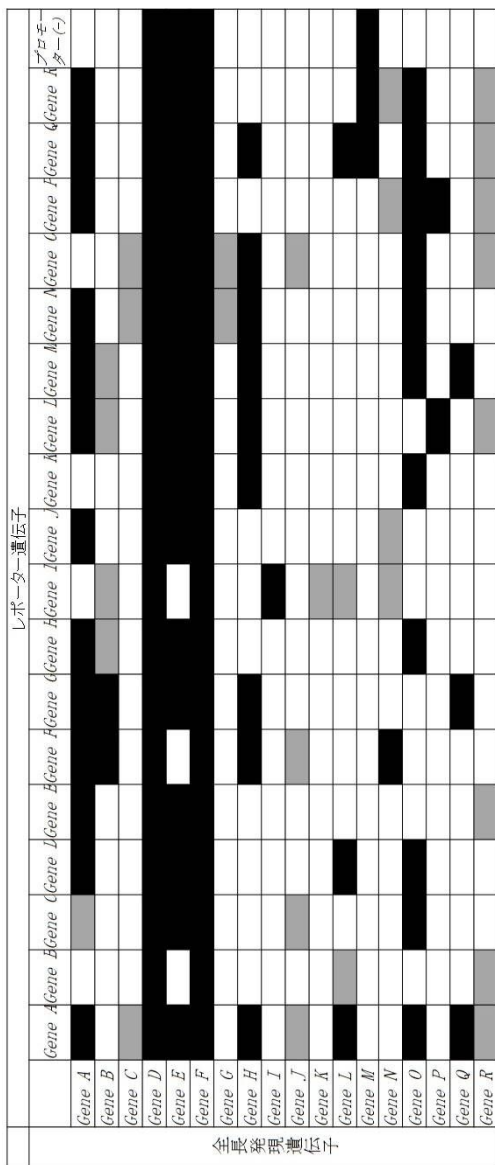


図3 卵巣分化候補遺伝子のレポーターで活性を上げた遺伝子の内訳

### 卵巣分化候補因子の全長配列を用いた卵巣分化候補因子の相互制御解析

前項で用いたレポーター遺伝子を各因子の全長発現ベクターに作用させ、ルシフェラーゼアッセイによる遺伝子間の相互制御解析を行った。対象とした 18 遺伝子のうち、9 遺伝子は多くの遺伝子を活性化させる general activator として機能する一方で、

多くの遺伝子を抑制させる general repressor として機能する遺伝子を 3 遺伝子同定した。さらに、自身の活性を調節する (auto-regulation) 方向に動く遺伝子も存在していた。、により得られた結果は、各遺伝子の発現細胞種を同定したのち、将来



的に細胞種ごとに転写ネットワークを繋げていく。

図 4 卵巣分化候補因子 (18 遺伝子) の相互制御関係

activator として働くものを黒、repressor として働くものを灰で示す。

(2) CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウトマウスの作製

卵巣分化候補遺伝子 18 遺伝子のうち、*Irx3*, *Dmrtc2*, *Egr1*, *Hmgb1*, *Msx1*, *Mphosph8* の各 6 遺伝子についてノックアウトマウスの作製を行った。このうち、*Mphosph8* と *Hmgb1* はホモ欠損で胎生致死になることを確認した、*Irx3*, *Dmrtc2* は F2 世代で解析を行ったが、生殖腺形成に明瞭な差は見られなかった。*Egr1* と *Msx1* については F2 世代まで現在維持できているが、*Egr1* はノックアウトすると LH サージの異常により不妊、*Msx1* はノックアウトしても生殖腺形成に異常がないことが既に他のグループから報告されているので、今後確認していく。*Irx3* は *Irx5* と同じファミリーに属することから、同時にノックアウトすることで卵巣形成に異常が出る可能性がある。今後、*Irx3* と *Irx5* のダブルノックアウトを作製し、解析が必要であると考えている。

### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Terao M, Tamano M, Hara S, Kato T, Kinoshita M, Takada S. Utilization of the CRISPR/Cas9 system for the efficient production of mutant mice using crRNA/tracrRNA with Cas9 nickase and FokI-dCas9. *Exp Anim.* 65(3):275-283. (2016) doi: 10.1538/expanim.15-0116. 査読有

Hara S, Tamano M, Yamashita S, Kato T, Saito T, Sakuma T, Yamamoto T, Inui M, \*Takada S: Generation of mutant mice via the CRISPR/Cas9 system using FokI-dCas9. *Scientific Reports* 5:11221 (2015) doi: 10.1038/srep11221. 査読有

\*Matsubara Y, \*Kato T, Kashimada K, Tanaka H, Zhi Z, Ichinose S, Mizutani S, Morio T, Chiba T, Ito Y, Saga Y, Takada S and Asahara H: TALEN-mediated gene disruption on Y Chromosome reveals

critical role of EIF2S3Y in mouse spermatogenesis. Stem cells and Development **24**(10):1164-1170 (2015) doi: 10.1089/scd.2014.0466. 査読有 \*equally contributing author

〔学会発表〕(計 4 件)

加藤朋子、原聡史、玉野萌恵、小川湧也、岡安春佳、乾雅史、浅原弘嗣、高田修治  
マウス軟骨・生殖腺特異的 *Sox9* エンハンサーの同定と機能解析(2015年12月第39回日本分子生物学会、兵庫(神戸))ポスター発表

Tomoko Kato, Moe Tamano, Karin Terauchi, Hanako Kakuta, Hiroshi Asahara, Tomomi Sato and Shuji Takada. Functional analysis of gonad-specific *microRNA-202* (2015年4月7<sup>th</sup> International Symposium On Vertebrate Sex Determination, Hawaii, USA) ポスター発表

Tomoko Kato, Moe Tamano, Karin Terauchi, Hanako Kakuta, Hiroshi Asahara, Tomomi Sato and Shuji Takada. Functional analysis of gonad-specific microRNA (2014年12月新学術領域「性差構築の分子基盤」若手研究会、静岡(熱海))ポスター発表

加藤朋子、原聡史、玉野萌恵、秋元未来、乾雅史、浅原弘嗣、高田修治  
マウス胎仔期雌性生殖腺分化に関わる転写因子・転写コファクターの機能解析(2014年11月第38回日本分子生物学会、神奈川(横浜))口頭発表

## 6. 研究組織

研究代表者

加藤 朋子 (KATO, Tomoko)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・研究員

研究者番号：10638802