

卵胞培養系を用いたハイスループット遺伝子機能解析

●畑田出穂 ◆堀居拓郎

群馬大学生体調節研究所

＜研究の目的と進め方＞

原始卵胞は成熟分化した卵子を供給するプールとして生殖期間をとおして存在し、このうちのごく一部のみが随時、成長期に移行するとともに完全な成長分化した卵胞となり、成熟して減数分裂を再開した卵子を排卵する(図1)。従って卵子の分化において原始卵胞の成長期へのコミットメントが重要な分岐点となっているがその実体は不明である。このコミットメントに関与する因子を知ることは卵子の分化機構を知るのみならず、多量に存在する原始卵胞のプールを活用を可能にし、不妊治療、畜産分野において多大な貢献をもたらすと考えられる。申請者らはこれまでにin vitroの培養系を用いてマウスの始原生殖細胞から成熟した卵子を作成するシステムを開発し、さらに卵子を用いて体外受精をへて仔を出産させることに成功している。この研究ではマイクロアレイを用いて原始卵胞から成長期への移行時に発現誘導される遺伝子のスクリーニングをおこない、in vitroの培養系を用いることによりこれらの遺伝子が成長期へのコミットメントやその後の成長分化に関わるものであるかをハイスループットに解析する。

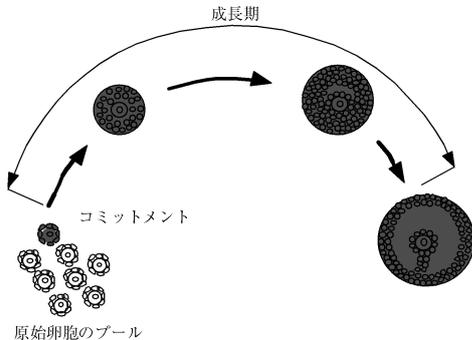


図1 卵胞の成長分化

＜研究開始時の研究計画＞

原始卵胞から成長期への移行時に発現誘導される遺伝子のスクリーニングをおこない、分化成長因子様遺伝子の候補をみつけ、活性をハイスループットに検定する。これらの因子は成長期への移行を促す因子である可能性と、すでに成長期に移行した卵胞の成長を促す因子の可能性がある。候補の遺伝子をCOS7細胞で発現させた上澄みを申請者らの開発したin vitro培養系に加え、原始卵胞の成長期への移行が促進されるか、あるいは成長期に移行した卵胞の成長が促進するかをハイスループットに検定する。

＜研究期間の成果＞

In vitroの培養系を用いることによりこれらの遺伝子が成長期へのコミットメントやその後の成長分化に関わるものであるかをハイスループットにスクリーニングし、

いくつかの成長期への移行時に発現誘導される分化成長因子様遺伝子が多くみいだした。これらの因子は成長期への移行を促す因子である可能性と、すでに成長期に移行した卵胞の成長を促す因子の可能性がある。このうちの1つをCOS7細胞で発現させた上澄みを申請者らの開発したin vitro培養系に加え、原始卵胞の成長期への移行が促進されるか、あるいは成長期に移行した卵胞の成長が促進するか検定したところ成長期への移行が増加していることがわかった。

今回のスクリーニングでは十分な数の候補を得られなかった。その原因は転写物量のスクリーニングでは微量発現のものをみのがしていることが考えられる。DNAのメチル化を指標にスクリーニングをおこなった場合は発現量にかかわらずスクリーニングできる。そこでスクリーニングの感度をあげるためゲノムワイドなメチル化のスクリーニング法の開発をおこなった。開発したMIAMI法ではゲノムワイドに遺伝子のプロモーター領域のオリゴヌクレオチドをマイクロアレイを用いる。そしてメチル化感受性の制限酵素Hpa IIの感受性のサンプル間の違いを蛍光強度の違いとして比較する。また同時にメチル化非感受性のアイソシマーであるMsp Iの感受性のサンプル間の違いも比較することにより精度を上げることができる。

＜国内外での成果の位置づけ＞

ゲノムワイドなメチル化のスクリーニングシステムはユニークなものであり、ポストゲノム時代のエピジェネティクスにおける方法の1つとして評価されている。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

発現量によるスクリーニングでは微量のものの変化をとらえることはむづかしい。それに対してDNAのメチル化の変化を調べれば発現量にかかわらずスクリーニングすることができる。

＜今後の課題＞

MIAMI法を用いてメチル化でスクリーニングをおこなっていく。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

(1) Hatada I, Fukasawa M, Kimura M, Morita S, Yamada K, Yoshikawa T, Yamanaka S, Sakurada A, Sato M, Endo C, Kondo T, Horii A, Ushijima T, & Sasaki H Genome-wide profiling of promoter methylation in human. *Oncogene* (in press).

(2) Fukasawa M, Kimura K, Morita S, Matsubar K, Yamanaka S, Endo C, Sakurada A, Sato M, Kondo T, Horii A, Sasaki H, & Hatada I Microarray analysis of promoter methylation in lung cancers *J Hum Genet* (in press)