

精子および卵子の標識による効率的な複数遺伝子変異マウスの作成法の開発

●八神健一

筑波大学大学院 人間総合科学研究科

〈研究の目的と進め方〉

生活習慣病などの多因子疾患の病態解明や疾患関連遺伝子の相互作用を解明するため、複数の遺伝子間の相互作用をマウス個体内で解析する方法が急激に普及している。ヘテロ変異マウスより変異遺伝子をもつ精子や卵子をFACS (fluorescein activated cell sorter) および顕微鏡で選別し、体外受精あるいは顕微授精で受精させることにより、短期間に複数遺伝子ホモ変異マウスを作製する方法の確立を目標として、GFPを精子や精子幹細胞で発現するトランスジェニックマウスを作製し、FACSによるソーティングの条件や顕微授精によるマウス個体の作製の可否を検討する。また、精子幹細胞をFACSにより選別・培養する方法も検討する。

〈研究開始時の研究計画〉

1) による精子選別法の検討

精子で特異的に発現するアクロシン結合タンパク遺伝子の制御領域とGFP遺伝子の融合遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いて、そのヘテロ変異マウスの精子をFACSでソーティングし、GFP陽性精子を回収し、精子の運動性や体外受精能を検討する。

2) ソーティングの条件や顕微授精法の検討

精子ソーティングの条件や顕微授精法の条件を検討し、ソーティングした精子によりマウス個体が得られるかどうかを検討する

3) ソーティングによる精子幹細胞の選別と培養法の検討

精子幹細胞で発現するOct4遺伝子制御領域とGFP遺伝子の融合遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの精巣細胞をHoechst 33342色素の取り込み能を指標としてFACSソーティングし、幹細胞と考えられるSP分画を回収し精子幹細胞のマーカー遺伝子の発現状況を検討する。回収が可能であれば、培養し、マウス個体が得られるかどうかを検討する。

〈研究期間の成果〉

1) FACSによる精子および精子幹細胞の選別法の検討

アクロシン結合タンパク遺伝子制御領域の制御下でGFPを発現した精子をFACSソーティングしたが、得られた精子の運動性や受精能力の低下が見られた。これは、希釈液やソーティングに要する時間や温度あるいは酸化還元電位の変化等による影響が考えられた。

2) ソーティングの条件や顕微授精法の検討

精子ソーティングを種々の方法で検討したが、精子運動性や体外受精能の改善にはいたらなかった。一方、不動化した精子や体外受精不能な精子の頭部だけでも顕微授精により、マウス個体の作製は可能であった。この顕微授精法は各種精子で応用可能であり、成果の一部は論文1として公表した。

3) ソーティングによる精子幹細胞の選別と培養法の検討

精子幹細胞で発現するOct4遺伝子制御領域の制御下で

GFPを発現するマウス精巣細胞をソーティングし、幹細胞特異的と考えられるHoechst 33342色素排泄能を指標にSP分画を回収した。しかし、この細胞集団はGFP陽性細胞集団と一致せず、精子幹細胞のマーカーである表面抗原遺伝子を発現していなかった。

GFP陽性の精子幹細胞は得られなかったが、精巣細胞のSP分画細胞は細胞周期がG0期にある精子幹細胞の集団である可能性が示唆され、精子幹細胞に関する新知見が得られた。この結果は、その後のデータを加えて論文2として公表した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

この領域の技術開発と普及の速度は目覚しく、現在では各種細胞のFACSソーティングは一般化しつつある。顕微授精技術も一般化して、受精能力の低い精子の補助的生殖技術として普及しつつある。また、マウス精子幹細胞の特性として我々の成果は新知見をもたらしたが選別や培養には成功していない。精子幹細胞の選別・培養技術は国内の別な研究グループが成功しており、今後、効率的な遺伝子改変マウスの作製技術へと展開が予想される。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

この技術を用いて複数変異マウスの作製には至らなかった。個々の基本技術は確立し応用可能であるが、当初からES細胞への複数変異の導入が新手法となりつつある。

〈今後の課題〉

精子幹細胞の選別・培養とそれによる遺伝子改変マウスの作製

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Ogonuki N, Sankai T, Yagami K, Shikano T, Oda S, Miyazaki S, Ogura A.

Activity of a sperm-borne oocyte-activating factor in spermatozoa and spermatogenic cells from cynomolgus monkeys and its localization after oocyte activation.

Biol Reprod. 2001 65 (2) :351-357.

2. Shimizu Y, Motohashi N, Iseki H, Kunita S, Sugiyama F, Yagami K.

A novel subpopulation lacking Oct4 expression in the testicular side population.

Int J Mol Med. 2006 17 (1) :21-28.