

研究題目 卵胞発生における核内膜タンパクの役割

研究組織

研究代表者：石内 崇士（山梨大学生命環境学部生命工学科）

共同研究者：高岡勝吉（徳島大学・先端酵素学研究所）

竹本龍也（徳島大学・先端酵素学研究所）

研究分担者：Máté Borsos（California Institute of Technology）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

核膜は真核生物の核を細胞質から隔て、核の範囲を規定している生体膜である。また内膜と外膜からなる脂質二重膜構造をとり、内膜の内側にはラミンからなる中間径フィラメントが核ラミナを形成し核の形態を保っている。核の形状やサイズの変化は病理学的な診断の1つとしても知られ、核形態と細胞形質には関連があると考えられてきたが、その詳細はあまりわかっていない。われわれはこれまでの研究から、マウス卵子においては特定のゲノム領域が核ラミナ近傍に位置することを見出している（Borsos et al., Nature2019）。そこで本研究では、核ラミナ近傍へのゲノムのアンカリングに機能するLamin B Receptor(LBR)を卵子特異的にノックアウトすることで、卵子内のゲノム-核ラミナ相互作用の役割を明らかにすることを目的とする。

[1-2]研究の方法・経過

まず、CRISPR-Cas9技術を用いて、LBR flox マウス作製に取り組んだ。具体的には、まずLBRの exon4 と 5 の両端に gRNA 標的配列 ctgatcagagagtgcg_tgg と aactcaggtgtatagcggc_ggg を見出し、それぞれの配列に対し crRNA を作製した。次に、LBR の exon4 と 5 の両端に loxP を挿入したターゲティングベクターを作製した。次に、Cas9 タンパク、tracrRNA、そして2つの crRNA を 37 度で 30 分インキュベートして、in vitro で複合体を合成した。得られた複合体とターゲティングベクターをマウス受精卵にマイクロインジェクションした。産仔は PCR 法により、スクリーニ

ングを行い、1匹のオスと1匹のメスの flox マウスを得た。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

flox マウスは健康で現在成熟間近であることから、が LBR の exon4 と 5 の両端に loxP 配列を挿入しても内在の転写に影響を与えない可能性が示唆された。今後、ホモ flox マウスを交配により得て、LBR の exon4 と 5 の両端に loxP 配列を挿入しても内在の転写に影響を与えないかどうか検討する。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

LBR は多様な組織や細胞で発現している。本研究で作製した Cre-loxP システムを用いた組織特異的 flox マウスは、Cre マウスとの交配次第で他の組織特異的なノックアウトが可能であり、他のプロジェクトにも適用可能である。このように、医療にも学術的にも産業にも多方面にインパクトを与える汎用性の高いバイオリソースとなる可能性を秘める。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表
なし

[3-2]学会発表
なし

[3-3]成果資料等
なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

本研究は順調に進んでおり、LBR flox マウスが得られた。今後、ZP3Cre(第一卵胞から胞状卵胞期に Cre が発現する)や GDF9iCre(原始卵胞から胞状卵胞期に Cre が発現する)マウスと交配し、卵胞における機能を探る。

具体的には、LBR flox/flox ; Cre の遺伝型を持ったメスマウスを作製し、卵胞特異的LBR ノックアウトの表現型解析を行う。さらにトランスクリプトーム解析や核形態解析、DNA-FISH 等を組み合わせて行うことにより、卵胞発生段階の転写産物や核・ゲノムの変化を観察する。これにより、ゲノム位置、核形態、転写の情報を紐づけし、LBR がこれらにどのように関与するかを明らかにする。