

平成 30 年 5 月 23 日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点  
平成 29 年度共同研究報告書

京都大学ウイルス・再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：奈良先端科学技術大学院大学

職名：准教授

氏名：笹井 紀明

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：器官形成と個体サイズを制御する細胞増殖制御機構の解明
2. ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：廣田 圭司  
(統合生体プロセス分野 准教授)
3. 研究期間：平成 29 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日
4. 研究経過及び研究成果：

ソニック・ヘッジホッグ (Sonic Hedgehog; Shh) は胚発生において前駆細胞の増殖と分化に関与する細胞外シグナル因子である。申請者は Shh によって制御されるこれらの現象を直接制御するエフェクター分子を同定する目的で、Shh の下流遺伝子を mRNA シーケンス法によるトランスクリプトーム解析によって網羅的に解析し、それらの中から特に細胞増殖に関与する候補遺伝子として、サイクリン関連遺伝子 (vCDK) を単離し、現在その機能解析を進めている。申請者らのニワトリ胚を用いた予備的解析の結果、vCDK は神経管の中でも Shh シグナルの影響を受ける領域やのほか前腎にも発現し、前駆細胞の増殖に関わっていることが明らかとなった。そこで、vCDK の個体レベルに対する影響を、遺伝子機能を完全に破壊したマウス個体で解析することにした。

平成 29 年度は、前年度に続いて表現型を解析したほか、vCDK の発現をモニターするための eYFP ノックインマウスを作成し、その発現を追跡することとした。

### (1) vCDK ノックアウトマウスの表現型についての詳細な解析

前年度の解析から、vCDK ノックアウトマウスにおいて、固体サイズの矮小化がみられることが明らかになった。しかし匹数が少なく、有意性を議論できるだけの十分なデータがえられていなかった。

そこで平成 29 年度は、ノックアウトマウス、ヘテロマウスに関して繁殖を進め、体重変化のプロファイリングや遺伝子発現について網羅的かつ系統的な解析を行った。その結果、vCDK ノックアウトマウスは生後直後はヘテロマウスなどと変化は見られなかったが、生後 3 週目頃から体重に変化が始め、その傾向が成体になるまで継続することが明らかになった。さらに、この体重の変化、サイズの矮小化の傾向は雄マウスで顕著であり、雌マウスでは大きな変化は見られなかった。このことから、性別に特異的、または雄に特異性の高い遺伝子の発現量に影響が大及んだものと予想された。

このことから、精巣で分泌される遺伝子の発現パターンや発現量について、定量 PCR を主な方法として解析を行った。この結果、一部の男性ホルモンの前駆体をコードする遺伝子で発現量が著しく低下しており、これが体重減少の原因になっていることが示唆された。現在、この直接の効果を詳細に解析している。

### (2) vCDK の eYFP ノックインマウスの作成と発現の解析

vCDK はニワトリ胚では神経組織（脊髄領域）の一部に強く発現しており、発現量も高い。一方で、マウスでは発現量が低い上に発現領域がはっきりせず、抗体染色や *in situ* ハイブリダイゼーションで再現性の高い発現を示す上で難点があった。

そこで、vCDK の遺伝子座の一部に eYFP をノックインで導入した eYFP ノックインマウスを作成し、eYFP の発現によって vCDK の組織内局在を解析することにした。その結果、生後マウスの腎臓、精巣に強い eYFP の発現が見られ、特に精巣に関しては精細管の間質のライディッヒ細胞に局在していることが明らかになった。この結果は、前項の体重減少、サイズの矮小化とほぼ一致するものである。一方、マウス胚では vCDK の発現は全体に弱く、ニワトリとマウスで vCDK の発現調節に一部相違が生じている可能性が示唆された。

これらのノックアウトマウス、ノックインマウスを貴研究所より譲渡を受け、申請者の本務校である奈良先端台に導入してコロニーの再構築を行った。表現型は以前に得られたものとほぼ一致しており、現在、組織・器官の発現解析を継続している。また、vCDK 欠損によって影響を受ける遺伝子を網羅的に同定するため、vCDK ノックアウトマウスの細胞で mRNA シーケンスによる網羅的発現解析を行った。その結果、精巣に発現すると思われる遺伝子の発現量に影響が及んでおり、vCDK が精巣に発現するという結果と一致していた。現在、vCDK が直接相互する因子を探索し、直接の影響を同定するための解析を進めている

## 5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表、

特許取得等

(論文：1件)

1. Akiko Nishi-Hori, Hitomi Watanabe, Minori Kadoya, Tomo Ichikawa, Gen Kondoh, Keiji Hirota, Noriaki Sasai

“Essential roles of a novel Cyclin Dependent Kinase in the neurogenesis and organogenesis.” (2017)

論文準備中