The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	蛍光蛋白質を発現する遺伝子操作動物を利用した受精・発生機構の解明
Author(s)	中西, 友子
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43367
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【8】

氏　　名	中西友子（なかにしともこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　16961　号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	**蛍光蛋白質を発現する遺伝子操作動物を利用した受精・発生機構の解明**
論文審査委員	（主査） 教授　岡部　勝 （副査） 教授　山元　弘　　教授　真弓　忠範　　教授　西宗　義武

論文内容の要旨

オワンクラゲ由来の green fluorescent protein（GFP）は細胞を生かしたまま観察できることからレポーター遺伝子・マーカー蛋白質として広く用いられている。また、蛍光強度や励起波長、さらに遺伝子コドンの使用頻度が哺乳類型に改善された EGFP を利用することにより、殆ど全身の細胞が強い緑色蛍光を発する“グリーンマウス”が得られることも知られている。著者は EGFP 遺伝子を導入した遺伝子操作マウスを多数作製して FISH 解析を行った後に凍結保存し、グリーンマウスのバンク化を図った。また EGFP の性質を利用してマウスの発生および受精機構の解明を行った。

まず著者は、CAG プロモーターのもとで EGFP を発現させるベクターを用いて、EGFP を全身で発現するグリーンマウスを145ライン作製した。トランスジェニックマウスの作製効率は他のさまざまな遺伝子を用いた場合とほぼ同じ3％であり、作製されたマウスは蛍光を発する以外は野生型マウスと区別がつかなかった。このことから、EGFP は全身で発現させるマーカー蛋白質として十分使用可能であることが示された。145ラインのマウスについて EGFP 遺伝子の染色体への導入部位を決定した結果、トランスジーンが2箇所に導入されたり転座を伴ったりする複雑な組み込みは16％（23ライン）に及ぶことが判明した。また培養細胞においてトランスジーンはランダムに染色体導入されると報告されているが、145ライン の EGFP 遺伝子の導入部位についてポアソン分布の適合性検定を行ったところ、トランスジェニックマウス作製時におけるトランスジーン組み込み部位は染色体全域にわたっているがその分布は必ずしもランダムではないことが示された。

グリーンマウスの胚では CAG プロモーターの制御下で EGFP 遺伝子が初期胚から発現するため、着床前にトランスジェニックであるかどうかを緑色蛍光を指標に簡単に判別することができる。そこで、著者の作製したグリーンマウスのうちでX染色体に EGFP 遺伝子が導入されたマウスの雄（^{GFP}XY）と野生型の雌（XX）用いて受精卵を作製すれば、それらの核型は^{GFP}XX と XY になるので雌のみが蛍光を発し、この緑色蛍光を指標にすれば着床前の雌雄胚を簡単に選別できると考えた。実際に着床前の胚盤胞の時期に蛍光を発する胚と発しない胚に選別しそれぞれの胚を仮親に移植したところ、蛍光を発する胚からは雌のみを、蛍光を発しない胚からは雄のみを得た。このように、X染色体に EGFP 遺伝子が導入されたトランスジェニックマウスを使うことにより、大量の胚の雌雄を100％正確に

より簡単に選別できるという新規な方法が可能であることを示した。この方法を応用すれば、雌の胚盤胞だけを選んで雄のES細胞をインジェクションすることによりES由来の産仔だけを生ませたり、8細胞期の雌と雄の胚を一緒に培養し雌雄両方の細胞をもつ胚さらにはキメラマウスを容易に作って性分化の解析に用いたりと多くの実験系の基盤を提供することができたと考えている。

精子は受精の過程で先体反応と呼ばれる形態変化を起こし、先体内腔に含まれる酵素群を放出する。これまで電子顕微鏡、抗体やchlortetracyclineによる染色により先体反応の様子を観察することが行われてきた。しかし、これらの方法は固有の操作を必要とするため経時的な観察は不可能であった。そこで著者はEGFPを精子の先体内腔に局在させることができれば先体反応と同時にEGFPが放出されることで、先体反応を精子を生かしたまま観察できると考えた。アクロシンプロモーターの制御下にアクロシンの軽鎖の一部（5アミノ酸）を含むアクロシンN末端24アミノ酸とEGFPの融合蛋白質を発現するトランスジェニツクマウス（acr3-EGFP）を作製したところ、精子先体内にEGFPを局在させることに成功した。このマウスの精細胞ではEGFPの局在を指標に先体が形成される様子が観察できた。トランスジェニックマウスの精子はEGFPが先体に存在しているにもかかわらず、野生型と変わらぬ受精能を有していた。この精子を用いて緑色蛍光の消失を指標に個々の精子の先体反応をリアルタイムで観察したところ、先体反応はEGFPの大部分が短時間（3秒）に放出される一段階目と、残りのEGFPが徐々に放出される二段階目に分けられることが示された。

最後に著者はEGFPの蛍光強度がpHに依存して変化することを見出し、acr3-EGFPマウスの精子を用いて先体内pHを測定する方法を開発した。この系を用いることで、回収してすぐの精子の先体内pHは5.3であり、2時間培養する間に先体内pHは6.2に上昇することを明らかにした。また、先体内に局在させたEGFPは3秒で放出されるが、先体内抗原であるMN7、MC41は60分かけて徐々に消失していた。そこで、先体内pH上昇の先体内蛋白質への影響を検討するために、精子を様々なpHの培地で先体反応させた。その結果、pH5.3の培養液で精子は先体反応できるがMN7とMC41は容易に遊離しないことを認めた。しかし、PH6.2で先体反応した場合にはMN7、MC41ともに速やかに遊離した。これらことより、精子は先体反応する前に先体内pHを上昇させることで先体内蛋白質を安定な形から放出されやすい形に変化させていることが示唆された。今回の結果から、精子は先体内容物の放出速度を先体内pHなどで制御することにより、卵子透明帯を通過を行っているのではないかと考えられた。作製したacr3-EGFPマウスは雄性不妊系統のマウスなどと交配させることにより、先体反応やそれに先立つ受精能獲得現象の解明に役立つばかりでなく、不妊のメカニズムを明らかにするのにも役立つと期待される。

論文審査の結果の要旨

著者は細胞を生かしたまま観察できるマーカー蛋白質green fluorescent protein（GFP）から得られた変異体（EGFP）を全身で発現させた遺伝子操作マウスを多数ライン作製してFISH解析を行った後に凍結保存し、グリーンマウスのバンク化を図った。

この間にEGFP遺伝子の導入部位をFISHで検討することにより複数箇所への導入率や染色体転座のおこる確率を推定したほか、トランスジーンの導入は染色体全域にわたって均等におこるわけではないことを示した。また、X染色体にEGFP遺伝子が導入されたマウスを用いて非侵襲的に着床前期の雌雄胚を100%正確に判別できる系を作製することに成功した。

EGFPを先体内に局在させた精子を産生するような遺伝子操作マウスを作製し、先体反応を精子を生かしたまま連続的に観察できる系を用いて、先体反応が単純な放出反応ではないことを明らかした。さらに、同じ遺伝子操作マウスを用いてEGFPがpH指示蛋白質として利用できることから精子先体内pHの測定を行い、先体反応に先立つ先体内pHの上昇が先体からの物質の放出を制御していることを示唆した。

以上の成果は、EGFPの新しい可能性を提示しただけでなく、受精に先立つ精子の先体反応の機構の一部を明らかにしたものであり、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考える。