

2022 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	Importin13 の生殖細胞分化における役割の解明
キーワード	① マウス、② 生殖細胞、③ Importin13

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ヤマグチ ヤスカ 山口 泰華
配付時の所属先・職位等 (令和4年4月1日現在)	熊本保健科学大学・保健科学部・ポストドクター
現在の所属先・職位等 (令和5年7月1日現在)	熊本保健科学大学・保健科学部・ポストドクター
プロフィール	動植物のこだわりなく、生殖細胞や幹細胞の細胞間相互作用に着目して新しい分子シグナル経路を探索してきました。現在は、博士後期課程からのテーマである、細胞内トランスポーターである Importin13 遺伝子のマウス生殖細胞での働きを研究中です。新しい研究テーマを発掘し、精力的にこなします。

1. 研究の概要

生物は、次世代を産み出すことにより、遺伝情報を伝達して種の存続を図ってきた。有性生殖を行う個体では、精巣と卵巣、雌雄それぞれの生殖巣において次世代のもとである雌雄の配偶子を形成する。体細胞系譜とは異なり、生殖細胞系列には、配偶子へと分化して遺伝情報を次世代へと伝達する能力が与えられている。また、雌雄の配偶子の受精によりそれぞれの親由来の遺伝情報の混合が起こり、これは、生命の多様性を生み出す原動力の1つとなっている。次世代を作り出すためには、精子と卵子のもとである生殖細胞の形成とその後の減数分裂を伴う雌雄の配偶子への分化が必要であるが、その形成と分化を制御する分子機構については、十分には明らかにされていない。

本研究では、細胞質-核間で特定の分子（カーゴ分子）の物質輸送活性を持つ Importin13 (Ipo13) に着目して研究を進めてきた。この遺伝子は、我々の研究グループが、マウスの生殖細胞で強く発現し、多能性幹細胞には殆ど発現しない遺伝子の探索を行い、その候補の1つとして得たものである（大学院生当時）。Ipo13は、Importin β ファミリーに属し、特定のカーゴ分子の細胞質-核間の輸送（局在変化）に働いている。Importinは、一般的に α 型と β 型が複合体を形成して核内へ（import）、或いは核外へ（export）物質輸送を行うが、Ipo13は複合体を形成せずに単独でカーゴ分子を運搬し、また、核内と核外への両方向性にカーゴ分子を輸送する（Mingot *et al.*, *EMBO J*, 20: 3685, 2001）。Ipo13が運搬するカーゴ分子は、細胞質から核内への import カーゴとしてタンパク質の SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) 化修飾に必須な SUMO 特異的 E2 結合酵素である Ubc9 や、グルコシルコイド受容体、転写因子群 (ARX, Pax3, Pax6) が、一方、核内から細胞質への export カーゴとして翻訳やクロマチ

ンの制御因子群 (EIF1A, EIF4G2, HMG20A) などがカーゴ分子であることが、本研究者の共同研究の論文 (Fatima *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 1864: 546-561, 2017) を含め、報告されている。

これまでの研究から、マウス卵巣を用いたノックダウン系を樹立し、Ipo13 遺伝子が減数分裂のパキテン期において卵母細胞の分化に必須であることを明らかにした。Ipo13 が始原生殖細胞の形成期に関わっていると推測されたので、その解析のために *Ipo13* の欠損胚を作成したが、着床後の胎齢 6 日頃までに致死となった。そこで、*Ipo13* を時空特異的に欠損させることのできるように *LoxP* 配列を挿入した *Floxed-Ipo13* マウスを用いて、始原生殖細胞の形成期、及び減数分裂期の生殖細胞を含む胎仔卵巣と成体の精巣での時期特異的な機能欠損解析を行うことを計画した。現在、所属先大学の動物施設にて *Floxed-Ipo13* と、薬剤投与により核移行が誘導され *LoxP* 配列間の組み換えがおこる Cre-ER^{T2} 融合タンパク質を全身性に発現する *Rosa-Cre-ER^{T2}* マウスとの交配を進めている。さらに、我々の研究グループが作成した生殖細胞特異的に Cre-ER^{T2} を発現する *Ifitm3-Cre-ER^{T2}* も用い、薬剤投与により *Ipo13* を始原生殖細胞の形成期、及び減数分裂過程特異的に欠損させ、Ipo13 の役割を明らかにする。次いで、Ipo13 の欠損により細胞質-核間の局在が変化することで、生殖細胞の形成、及び分化に影響を与える Ipo13 の機能的なカーゴ分子の同定を行ない、その作用機序の全貌の解明を目指している。

2. 研究の動機、目的

本研究者は、マウス生殖細胞の分化過程に着目し、Ipo13 の発現について詳しく調べたところ、精母細胞と卵母細胞ともに減数分裂のパキテン期に一過的に強く上昇、それに伴いカーゴ分子である Ubc9 が細胞質から核へと輸送され、核内に局在化することを見出した。そこで、本研究者が胎仔卵巣の器官培養系で siRNA を用いた *Ipo13* のノックダウン実験を行った結果、Ipo13 の発現抑制により Ubc9 の核への局在化が阻害され、卵母細胞のパキテン期以降への分化が阻害されることを明らかにした (Yamaguchi *et al.*, *Dev Biol*, 350-360, 297, 2006)。この Ipo13 の機能解析をさらに進めるため、海外協力研究者の Patrick Tam 教授 (オーストラリア小児医療研究所、シドニー大学) との共同研究で *Ipo13* の欠損マウスを作成し、本研究者がその解析を行った。

その結果、*Ipo13* 欠損胚は、胎齢 3.5 日頃では、正常胚と同様に胚盤胞を得ることができるが、着床後、始原生殖細胞が形成される前の発生段階である胎齢 6 日頃には、正常な生存胚を得ることができないことがわかった。そこで、本研究者は、始原生殖細胞の形成やその後の配偶子形成過程における Ipo13 の役割を明らかにするため、Cre リコンビネースの発現により時空特異的に遺伝子欠損が誘導できる *Floxed-Ipo13* マウスを作成した。現在、*Floxed-Ipo13* マウス等の実験に必要な遺伝子改変マウスを所属先大学の動物施設にて飼育・繁殖させ、その解析を進めている。以上、本研究計画では、この *Floxed-Ipo13* マウスを用いた生殖細胞の形成過程及び配偶子形成過程における時期特異的な機能欠損解析を行い、Ipo13 の生殖細胞分化における役割を解明することを目指している。

3. 研究の結果

始原生殖細胞の形成期 (7 日目胚) において Ipo13 の全身性のノックアウトを作成し、生殖細胞が移動して生殖巣に定着する生殖巣着床期 (12 日目胚) において観察したところ、Ipo13 がノックアウトした胚では生殖巣内に生殖細胞はほとんど観察されなかった。この結果から、Ipo13 は形成期以降の生殖細胞において重要な働きをしていると考えられる。現在は、形成期

以降のどの段階で生殖細胞がなくなるのか、また移動異常や細胞死など、なぜなくなるのかについて解析中である。一方で、減数分裂期における Ipo13 の機能を解析するために、始原生殖細胞の定着期（12日目胚）において Ipo13 の全身性のノックアウトを作成し、減数分裂期（19日目胚の卵巣）において生殖細胞を観察したところ、Ipo13 がノックアウトした胚では減数分裂期の生殖細胞の細胞死増強が観察された。成体の精巣においても、同様にノックアウトしたところ、同じく減数分裂期の生殖細胞の細胞死増強が観察された。

4. 研究者としてのこれからの展望

私が研究活動を始めてから15年以上になり、日々の研究活動についても落ち着いてデータを重ね、論文としてまとめることができるようになってまいりました。今後は、本研究課題の研究を進めつつ、同時に教育の分野においても活動していくことで、次世代の若手・女性研究者を育てていくことができると考えております。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

この度は、ご支援をありがとうございました。

数多くの応募の中から、私を選んで下さったことにとっても感謝しています。研究生活を続けていく中で、特に女性研究者には結婚・出産・育児など大きなライフイベントが、時に邪魔になり、活動を中断せざるえないことがあります。私も3人の子供を育てながらの研究活動です。なかなか成果が出ないこともありますので、別の選択肢を選ぶことを考えることが幾度もありました。この度の本事業での採択は、私にとって、これからも研究活動を続けていく上での大きな原動力となりました。

また、採択時に研究内容についての応援メッセージも頂きまして、本当にありがとうございました。今後とも、研究活動や教育活動、そして子育てにも頑張っていきたいと思っております。

