

平成23年 3月 24日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21780270

研究課題名(和文)

ヌクレオプラスミンを介した哺乳類卵母細胞核小体の機能解析

研究課題名(英文) Functional Analysis of Nucleoplasmin in Mammalian Oocyte Nucleolus

研究代表者

大串 素雅子 (OGUSHI SUGAKO)

独立行政法人理化学研究所・生殖系列研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号： 50437505

研究成果の概要(和文)：

卵母細胞の核小体は初期胚発生に必須だが機能は不明である。核小体を除去した卵母細胞を受精させると精子脱凝縮遅延、構成的ヘテロクロマチンの高次構造に異常が見られる。また、第一分割で細胞周期進行が遅れ染色体分離に異常を示す。精子脱凝縮、構成的ヘテロクロマチンの構築、第一分割の染色体分離に卵母細胞の核小体が必要であることがわかった。また、卵母細胞核小体に局在するヌクレオプラスミン2 (Npm2) と相互作用する因子を Yeast two hybrid 法で同定した。現在それらの因子の機能を解析中である。

研究成果の概要(英文)：

In mammals, the oocyte nucleolus is required for early embryonic development, but the function of oocyte nucleolus is elusive. Detailed analysis revealed that the zygotes lacking nucleolus showed the delay of sperm chromatin decondensation, constitutive heterochromatin disorganization during interphase, and the defect in first mitotic progression. These results indicate that the oocyte nucleolus is involved in the functional chromatin organization in zygotes. Moreover, we identified the proteins interacted with nucleoplasmin2 (Npm2) in the oocyte nucleolus. The function of these proteins is under analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：卵母細胞・核小体・初期胚発生・ヌクレオプラスミン2 (Npm2)

1. 研究開始当初の背景

我々は、哺乳類受精卵の構築、初期胚発生進行に卵母細胞の核小体が必須であること

を2008年に報告した。しかしこの核小体の機能は明らかにされていない。先行研究により卵母細胞の核小体成分としてヌクレオプラスミン

(Npm2)を同定した。Npm2は卵母細胞に多量に存在するヒストンシャペロンタンパク質としてアフリカツエガエルではじめて同定され、受精時の精子クロマチンの脱凝縮、ヘテロクロマチンの形成制御に関与していると報告されている。2003年にNpm2欠損マウスが報告され、その受精卵は雄性前核を形成することができるが、初期胚発生進行を2-4細胞期で停止する。つまり、哺乳類において、Npm2は正常な初期胚発生進行に必要なことは明らかであるが、機能がはっきりとしない。

2. 研究の目的

受精卵はたった一つの細胞から我々の体を構築する全ての細胞になる能力、全能性を保持している。この受精卵を構築し、その後の初期発生を進行するという重要なステップに卵母細胞の核小体が関与していることがわかっている。しかし、卵母細胞の核小体の初期胚発生進行に必要な機能を解析した報告はない。本研究は、卵母細胞の核小体成分であるNpm2を解析することにより核小体の機能に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

まず、発育を完了し減数分裂再開能力を持った卵母細胞から顕微操作により核小体を除去したのち、体外成熟・受精し、核小体のない卵母細胞の減数分裂進行、初期胚発生進行を詳細に解析した。また、発育途上の減数分裂再開能力のない卵母細胞から核小体を除去し、発育途上卵母細胞における核小体の役割を検討した。さらに、卵母細胞核小体に局在するNpm2と相互作用するタンパク質をマウス卵巣cDNAライブラリーを用いたYeast Two Hybrid法により同定することを試みた。

4. 研究成果

(1) 核小体のない卵母細胞を体外で成熟させると減数分裂を正常に進行した。しかし、これらの卵を体外で受精させると精子脱凝縮-雄性前核形成の遅延が認められた。体外でマウス精子をリコンビナントマウスNpm2のみを含む緩衝液で培養すると精子は脱凝縮を起こした。卵母細胞核小体にはNpm2が大量に存在することから、核小体のない卵においておこる精子脱凝縮の遅延はNpm2の減少によって誘起されることが判明した。本発見は哺乳類ではじめて精子脱凝縮-雄性前核形成に関与する因子を同定したことになる。

(2) 核小体のない卵母細胞を体外成熟後、単為的に活性化させると前核を形成する。しかし、その前核に核小体は形成されない。さらに前核のヘテロクロマチンの高次構造

に異常が見られた。また、第一分割の細胞周期進行が遅れ、染色体分離にも異常が生じた。染色体分離に異常が生じた卵は染色体末端の構成的ヘテロクロマチン構築に異常があることが判明した。マウスの染色体末端にはテロメア、セントロメア、リボソームDNAといった反復配列が存在している。これらの配列を含むクロマチン構造構築に異常を引き起こしているということになる。また、ヒストン修飾は正常なタイミングでおこっており、クロマチン構造の異常がどのように引き起こされたのかは依然不明である。卵母細胞の核小体は前核の核小体形成に必要なだけでなく、前核中の反復配列を含む染色体末端部分の構成的ヘテロクロマチンの構造制御を行っている可能性が示唆された。

(3) 哺乳類卵母細胞は卵巣で十分に発育したもののみが減数分裂進行能力を獲得し受精・発生できるようになる。減数分裂進行能力のない発育途上卵母細胞の核小体を顕微操作により除去し、体外培養を行った。対照卵母細胞では減数分裂は抑制されたままであるが、核小体を除去した発育途上卵母細胞では減数分裂を再開した。さらに、発育を完了し減数分裂再開能力を持った卵母細胞に発育途上卵母細胞由来の核小体を顕微注入すると減数分裂再開が抑制された。つまり発育途上卵母細胞の核小体には減数分裂進行抑制因子が含まれていることが明らかになった。

(4) マウス卵巣のcDNAライブラリーを用いたYeast two hybrid法により卵母細胞特異的に発現するNpm2と相互作用するタンパク質をスクリーニングした。すると、14の候補タンパク質が同定された。これらの候補タンパク質が実際に哺乳類の細胞内でNpm2と結合する能力があるかどうかをHEK293T細胞にNpm2と候補タンパク質を強制発現させた細胞抽出液を用いて免疫沈降法で調べた。すると14の候補タンパク質のうち7つがNpm2と結合することが明らかになった。この7つのタンパク質にはSUMO化に関わるものや全く機能の知られていないタンパク質が含まれており、現在機能を解析中である。

これまでの結果より、卵母細胞において核小体は発育途上では減数分裂抑制因子、発育完了後には受精後の前核形成・第一分割進行に必須の因子を含むことがわかった。つまり、細胞の状態に応じて必要不可欠な因子が核小体中存在することを示唆している。卵母細胞核小体は非常に緊密な構造を取っていることから、タンパク質などの因子を外部環境から隔離し、必要な時期に利用するまで正常な状態に維持するカプセルとして機能しているのではないかと考えている。

また、Npm2はアフリカツメガエルでヒストンシャペロンとして働き、精子脱凝縮に関わることは知られていたが、哺乳類ではNpm2欠損マウスで雄性前核形成がおこることからその役割が不明

であった。我々の解析により Npm2 欠損マウス卵においても精子脱凝縮の遅延が見られることが明らかとなった。さらに体外で Npm2 のみによって精子脱凝縮を誘起することが可能なことから、Npm2 が精子脱凝縮因子であることを同定した。哺乳類でははじめて精子脱凝縮に関わるタンパク質が同定されたことになる。また、Npm2 が卵母細胞核小体に多量に存在することから、核小体と精子脱凝縮の関連も示唆された。

Npm2 と相互作用する因子を7つ同定したが、それらの中にヒストンタンパク質は存在しないことから哺乳類では Npm2 はヒストンシャペロンとしての機能はないと考えられる。

現在、Npm 2 と相互作用するタンパク質の機能解析を行っている。この解析により卵母細胞の核小体の機能を新たに発見できると確信している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

全て査読有り

① **Kyogoku, H., Ogushi, S., and Miyano, T.** Nucleoli from Growing Oocytes Support the Development of Enucleolated Full-grown Oocytes in the Pig. *Molecular Reproduction and Development*, **77**, 167-173, 2010. **Selected for Cover.**

② **Ogushi S., & Saitou M.** The Nucleolus in the Mouse Oocyte Is Required for the Early Step of Both Female and Male Pronucleus Organization. *Journal of Reproduction and Development*, **56**, 495-501, 2010. **Selected for Cover.**

③ **Inoue A., Ogushi S., Saitou M., Suzuki MG., and Aoki F.** Involvement of Mouse Nucleoplasmin 2 in the Decondensation of Sperm Chromatin after Fertilization. *Biology of Reproduction*, In press.

[学会発表] (計5件)

① **Ogushi, S.** The nucleolus in the mouse oocyte is required for the early step of pronucleus formation
18th Lake Shirakaba Conference, Vedbaek, Denmark. June, 2009.

② **Ogushi, S.**

The oocyte nucleolus roles during early embryonic development in mouse.

2009 Japan-Taiwan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation, Kobe, Japan. Nov, 2009.

③ **Ogushi S., Kato Y., Nakamura A., Saitou M.** The Maternal Nucleolus Function in Early Embryonic Development.
43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, Kyoto, Japan. June, 2010.

④ **Ogushi S., Kato Y., Nakamura A., Saitou M.** Functional Analysis of Maternal Nucleolus in Mouse Oocytes.
Czech-Japan Joint Symposium for Animal Reproduction, FROM GAMETES TO STEM CELLS, Liblice, Czech Republic. Sep, 2010.

⑤ **Ogushi S., Yamanaka K., Itoi F., Yamagata K., Wakayama T., Saitou M.** Oocyte Nucleolus Requirement for the Higher Chromatin Organization in Zygotes.
International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities, Awaji, Japan. Jan, 2011.

[図書] (計0件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件) その

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大串 素雅子 (OGUSHI SUGAKO)

独立行政法人理化学研究所・生殖系列研究チーム・基礎科学特別研究員

50437505

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし