

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14841

研究課題名(和文) 減数分裂期の哺乳類卵に特異的な核/細胞質輸送関連因子の探索

研究課題名(英文) Research for nuclear-transport-factors functioning in mammalian oocyte meiosis

研究代表者

内藤 邦彦(Naito, Kunihiko)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：20188858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の未成熟卵における核外輸送レセプターの機能を解析した。核外輸送レセプターとしてエクスポーチン1(XP01)、XP06およびCSE1Lを、またそれぞれのカーゴとしてSnurportin-1とWee1B、アクチン(ACTB)およびimpotin-1の遺伝子をクローニングした。ブタ未成熟卵にXP01のmRNAおよびアンチセンスRNA注入により人為的に発現量を変化させたところ、過剰発現による核外輸送の増加が確認され、減数分裂の再開が有意に早まった。逆にXP01発現抑制により以上より減数分裂の再開が遅れた。以上より、核輸送が哺乳類卵の減数分裂の正常進行に重要な役割をはたすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Functions of nuclear-transport-factors on mammalian immature oocytes have been analyzed with special focuses on nuclear-export-receptors. Complementary DNAs of three nuclear-export-receptors, exportin 1 (XP01), XP06 and CSE1L, and their cargos, Snurportin-1 and Wee1B for XP01, beta-actin for XP06 and impotin alpha-1 for CSE1L, were cloned. In vitro synthesized mRNA or antisense RNA of XP01 were injected into the cytoplasm of immature porcine oocytes for upregulation or downregulation of XP01, respectively. The upregulation of XP01 increased the nuclear export of its cargos and significantly accelerated the meiotic resumption. In contrast, the downregulation of XP01 delayed the start of oocyte maturation. These results indicate that the nuclear transport plays important roles for the meiotic resumption of mammalian immature oocytes in the normal time course.

研究分野：生殖遺伝学

キーワード：核輸送 ブタ卵 減数分裂 エクスポーチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類の卵母細胞は、卵巣の卵胞内ではcAMP依存性キナーゼ(PKA)活性が高く維持され減数分裂を第一分裂前期(GV期)で停止しているが、ホルモン刺激や卵胞から単離して体外培養をするとPKA活性が低下することによって減数分裂が開始し第2減数分裂中期(MII期)まで成熟することが良く知られている。一方、減数分裂再開の直前に、それまで細胞質に局在していたPKAが核内に移行することは、あまり知られていない。しかし、この局在の変化は非常に重要であり、たとえPKA活性が変化せずとも局在が変化するだけで減数分裂が再開することを申請者は明らかにした[]。この結果は、卵母細胞におけるタンパク質の核輸送制御機構が、減数分裂の進行を含む細胞機能に大きく影響していることを示唆している。

(2) 真核生物の細胞では、DNAの複製や転写関連因子など核内で作用するタンパク質や、逆にmRNAの輸送やその翻訳関連因子など細胞質で作用するタンパク質が存在し、これらのタンパク質の機能発現には核内外への移行が必要不可欠である。細胞にとってこれらの局在の制御は、発現量制御と同等、あるいはそれ以上の意味を持つ重要な生理機構と考えられる。一般的に分子量40kDaを超えるタンパク質は単純拡散によって核膜孔を通過できず、この核/細胞質移行にはタンパク質自身や結合する他のタンパク質が持つ核内移行シグナル(NLS)や核外移行シグナル(NES)といった核輸送シグナルに依存する。このカーゴが持つシグナルを核移行レセプター(各種インポーチン/エクスポート)が認識して結合し、巨大な核膜孔複合体(NPC)と相互作用することによって核膜孔を通過することが知られている[]。

2. 研究の目的

(1) 哺乳類の卵巣内に存在する未成熟卵は、誤って時期尚早な減数分裂を開始しないよう厳密に抑制されていると考えられるが、その抑制機構の中心はタンパク質の翻訳・分解といった発現制御機構、および各種キナーゼなど酵素活性の制御機構が中心であり、核移行レセプターやそのカーゴタンパク質のNLS、NESに対する反応性など、核輸送制御機構に注目した研究は殆ど存在しないのが現状である。しかし、この点を解析することは哺乳類卵の新しい生理機構を示唆する生物学的な価値に加え、現在多量に廃棄されている成長途上卵の利用性向上にも貢献すると期待される。そこで、本研究ではブタ未成熟卵を用い、特に核外移行レセプターに注目し、減数分裂の再開に対する機能解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 今回、核外移行レセプターとしてエクスポート 1(XPO1)、XPO6 および CSE1L

の3種類に着目し、これらの核外移行レセプター発現を制御することにより機能を解析することとした。機能確認のため、それぞれのレセプターが運ぶカーゴとしてXPO1にはSnurportin-1(SNUPN)、XPO6にはアクチン(ACTB)、CSE1Lにはimpotin α -1(IMP α 1)を設定した。先ずこれらのcDNAをブタ未成熟卵より回収したTotal RNAよりPT-PCRによりクローニングを行った。なお、XPO1のカーゴとして、以前、申請者がクローニングしたWEE1Bも用いた。

(2) 得られた配列に、核外移行レセプターには発現確認のためのFLAGタグを、カーゴタンパク質には卵内の局在を確認するための緑色蛍光タンパク質(EGFP)配列を付加したコンストラクトを作成した。発現促進のためにはmRNAを、発現抑制のためにはアンチセンスRNA(asRNA)をブタ未成熟卵質に顕微注入することとし、これらのRNAをin vitro合成した。

(3) 先ずブタ卵の成熟過程における内因性レセプターの存在と変動を、特異的な抗体を用いた免疫プロットにより調査した。なお、抗体の特異性は、ブタ未成熟卵にそれぞれのレセプターに対するasRNAを注入した後に免疫プロットを行いバンドが低下することにより確認した。

(4) 次に、卵巣から採取直後のブタ未成熟卵の細胞質にRNAを顕微注入した後、発現確認を免疫プロットにより、また機能確認を核外移行レセプターとEGFPタグ付のカーゴmRNAを共注入しEGFPの局在変化で確認した。

(5) ブタ卵の減数分裂の再開に対する核外移行レセプターの影響は、RNA注入により各レセプターの発現量を変化させたブタ卵を最大48時間まで培養し、卵のホルマウント標本を作成して核相観察すること、および減数分裂関連因子の発現やリン酸化状態を免疫プロットにより調べることにより解析した。なお、今回は特にXPO1の機能に焦点を当て、XPO1特異的阻害剤のレプトマイシンB(200 nM)による機能阻害実験も行った。

4. 研究成果

(1) 核外移行レセプターのXPO1、XPO6 および CSE1L、また、それらのカーゴであるSNUPN、ACTB および IMP α 1 のcDNAをブタ未成熟卵のTotal RNAよりクローニングに成功した。アミノ酸配列を調べたところ、ヒトおよびマウスの配列と88%以上の高い相同性であった(表1)。WEE1Bについては既に報告済みである[]。

表 ブタの核外移行レセプターおよびそのCargoの相同性

Exportin	アミノ酸数	相同性(%)	Cargo	アミノ酸数	相同性(%)
XPO1	1071	H:99 M:99	SNUPN	362	H:92 M:88
XPO6	1125	H:99 M:99	ACTB	375	H:100 M:100
CSE1L	971	H:99 M:99	IMP α 1	529	H:97 M:95

H: pig vs human, M: pig vs mouse

(2) In vitro 合成した核外移行レセプターの mRNA をブタ未成熟卵の細胞質に顕微注入し、タンパク質の発現を FLAG タグに対する抗体を用いた免疫プロットで確認した(図1)。また asRNA の発現抑制効果は mRNA と asRNA を共注入し、mRNA の発現が抑制されることで確認した(図1)。なお、時期の卵内に常に一定量存在することが知られている CDC2 をローディングコントロールとして用いた。XPO1、XPO6 および CSE1L のいずれも mRNA 注入で予想される分子量に明確なバンドが検出され、asRNA の共注入でこのバンドが消失した。この結果から、mRNA によるタンク質発現と asRNA による発現抑制効果が確認された。

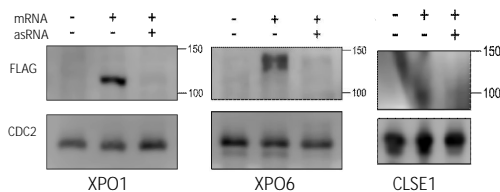


図1 mRNAおよびasRNAのタンパク質発現への効果

(3) ブタ卵母細胞の減数分裂過程における内因性核外移行レセプターの発現動態を免疫プロットにより調べるにあたり、まず抗体の特異性を確認した(図2)。その結果、XPO1、XPO6 および CSE1L のいずれの抗体も予想される分子量の位置にバンドが確認され、このバンドは asRNA 顕微注入により低下した。したがって特異的なタンパク質を認識していると考えられた。

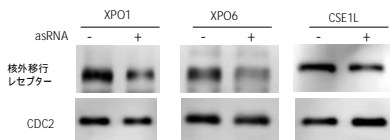


図2 核外移行レセプターの抗体検査

そこでこれらの抗体を用いて、ブタ卵母細胞の核外移行レセプターの減数分裂過程における内因性タンパク質の変動を調べた所いずれもほぼ一定量が存在しており、有意に変動しないことが明らかとなった(図3)。

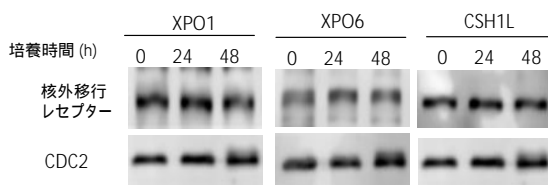


図3 内因性核外移行レセプターの変動

(4) カーゴについては外因性カーゴタンパク質の発現と局在を EGFP 蛍光により調べた。その結果、XPO1 のカーゴである SNUPN と WEE1B は核内明瞭な蛍光が発現し、局在することが明らかとなった。これに XPO1 を過剰発現したところ核内の局在が低下する様子が確認された(図4A)。そこで、

XPO1 の核外移行レセプターとしての機能を定量的に示すことを目的とし、核内発現量：細胞質発現量の比率を計測したところ(図4B)、SNUPN では約 3/4、WEE1B では約 1/2 へと減少していた(図4C)。また、WEE1B より NES に相当する配列を削除した ΔNES-WEE1B を作成し XPO1 と共に発現させたところ、この核外輸送の機能はみられなくなった(図4D)。この結果は、XPO1 がブタ未成熟卵においてもカーゴの NES を認識し、核外へ輸送する機能を果たしていることを明確に示している。

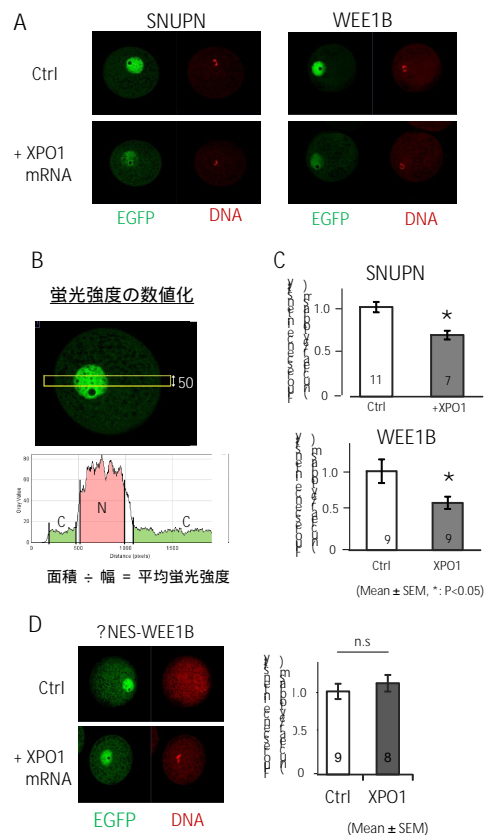


図4 カーゴタンパク質の発現局在によるXPO1の機能確認

XPO6 のカーゴである ACTB、および CSE1L のカーゴである IMPα1 は卵内全体に発現が確認されたが核内に若干強い発現がみられた(図5)。なお、XPO6 や CSE1L の発現による核外輸送の機能確認には未だ至っていない。

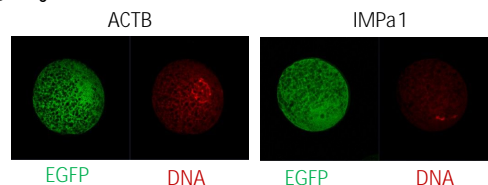


図5 ACTBおよびIMPα1の発現局在確認

(5) XPO1 アンチセンス RNA 注入により発現を抑制すると、XPO1 抑制卵は最終的な成熟率には変化が無いが、減数分裂の再開の指標である卵核胞崩壊(GVBD)の率の上昇が有意に遅れる傾向が見られた(図6)。

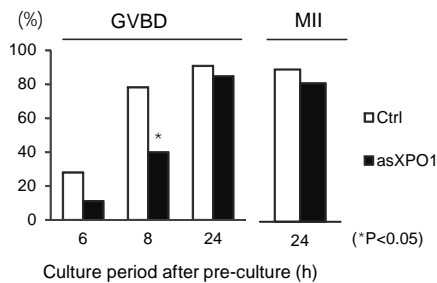


図6 減数分裂に対するXPO1発現抑制の影響

この現象は XPO1 特異的阻害剤であるレプトマイシン B (LMB) を処理した場合も同様であり (図 7)、NES を認識する核外移行レセプターの関与が支持された。

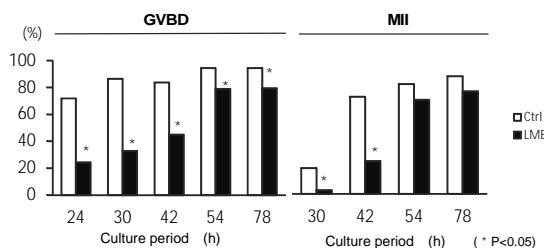


図7 減数分裂に対するレプトマイシンBの影響

逆に XPO1 を過剰発現すると減数分裂の再開が有意に早まることが明らかになった (図 8A)。この結果は成熟促進因子の制御サブユニットである Cyclin B1 の培養 18 時間後における発現上昇によっても裏付けられた (図 8B)。なお、XPO6 および CSE1L の効果については現在検討中である。

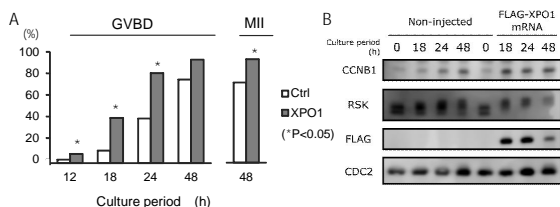


図8 減数分裂に対するXPO1過剰発現の影響

これまで核輸送の変化により減数分裂に影響が出ることを示した報告は無く、本研究は核輸送が哺乳類卵の減数分裂の正常な進行に重要な役割を果たすことを示す初めの実験結果となった。

<引用文献>

- Nishimura T, Fujii W, Sugiura K, Naito K. Biol Reprod, 90, 58:1-10 (2014).
- Pemberton LF, Paschal BM. Traffic. 6, 187-198 (2005)
- Shimaoka T, Nishimura T, Kano K, Naito K. Cell Cycle 8: 2375-2384 (2009)

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

小沼 あすか・藤井 渉・杉浦 幸二・内藤 邦彦: プタ卵母細胞成熟過程における核外移行因子 exportin-1 の機能解析
第 121 回日本畜産学会
2016 年 3 月 29 日
日本獣医生命科学大学 (東京)

Onuma A, Fujii W, Sugiura K, Naito K: Functions of a nuclear-transport receptor, exportin-1 (XPO1), on porcine oocyte maturation.
The 17th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Science (AAP).
2016 年 8 月 22-25 日
九州産業大学 (福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 邦彦 (NAITO, Kunihiko)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号: 20188858