

令和元年5月17日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17688

研究課題名(和文) 休眠中卵母細胞の健全性を保障するタンパク質メチル化酵素Prmt5の機能解析

研究課題名(英文) Functional Analysis of Prmt5 on maintenance of primordial follicle oocytes

研究代表者

鈴木 仁美 (Suzuki, Hitomi)

東京医科歯科大学・統合研究機構・助教

研究者番号：60644094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類卵巣において、卵母細胞は体細胞に囲まれて「卵胞」とよばれる球状の細胞の集合体を形成している。もっとも未成熟な原始卵胞は休眠状態で長期間卵巣内に蓄えられており、刺激を受けて活性化すると成熟し、排卵される。本研究はマウスを用いて、タンパク質のアルギニンをメチル化する酵素Prmt5が休眠中の卵母細胞ゲノムを正常に保つ役割を担い、Prmt5が機能しない原始卵胞では「眠りが浅い」状態になるために卵母細胞の遺伝子発現が異常になり、個体が不妊に至ることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体内で長期間休眠状態にある卵母細胞がどのように管理され、品質を保っているか、そのメカニズムの一端を、本研究で示すことができた。この結果は将来、再生医療や不妊治療法の開発・改善に寄与できると考えている

研究成果の概要(英文)：Each oocyte is maintained in a follicle with some somatic cells, Granulosa cells, in mammalian ovary. Most immature “primordial follicles” are dormant and stored during a long life until receiving activation signals and entering to folliculogenesis pathway for maturation. We revealed that Protein arginine methyltransferase 5 (Prmt5) play an important role in mouse oogenesis for maintain the genome integrity of dormant oocytes. Prmt5 cKO oocytes cannot maintain the dormancy and showed abnormal gene expression profile, leading the mouse to premature ovarian insufficiency.

研究分野：発生生物学

キーワード：卵母細胞 卵胞成熟 女性不妊

1. 研究開始当初の背景

哺乳類卵巣において、卵母細胞は体細胞に囲まれて「卵胞」とよばれる球状の細胞の集合体を形成している。もっとも未成熟な原始卵胞は休眠状態で長期間卵巣内に蓄えられており、刺激を受けて活性化すると卵胞成熟過程に入り、性周期に従って一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞と成熟して排卵に至る(図1)。健康なヒト女性の卵巣は、思春期以降、月に1個ずつ、合計400個ほどの成熟した卵子(卵母細胞)を約40年間排卵し続ける。このように長期間安定した卵胞成熟を保つためには、卵の供給源である休眠中の卵母細胞の健全性を維持し、適切に管理する機構が重要である。申請者は、タンパク質のアルギニンをメチル化する酵素 Prmt5 が休眠中卵母細胞を保護し、活性化後に正常に成熟していけるようにオルガネラの状態や遺伝子発現を管理する役割を果たしていると考え、その分子的作用機序の解析を進めていた。

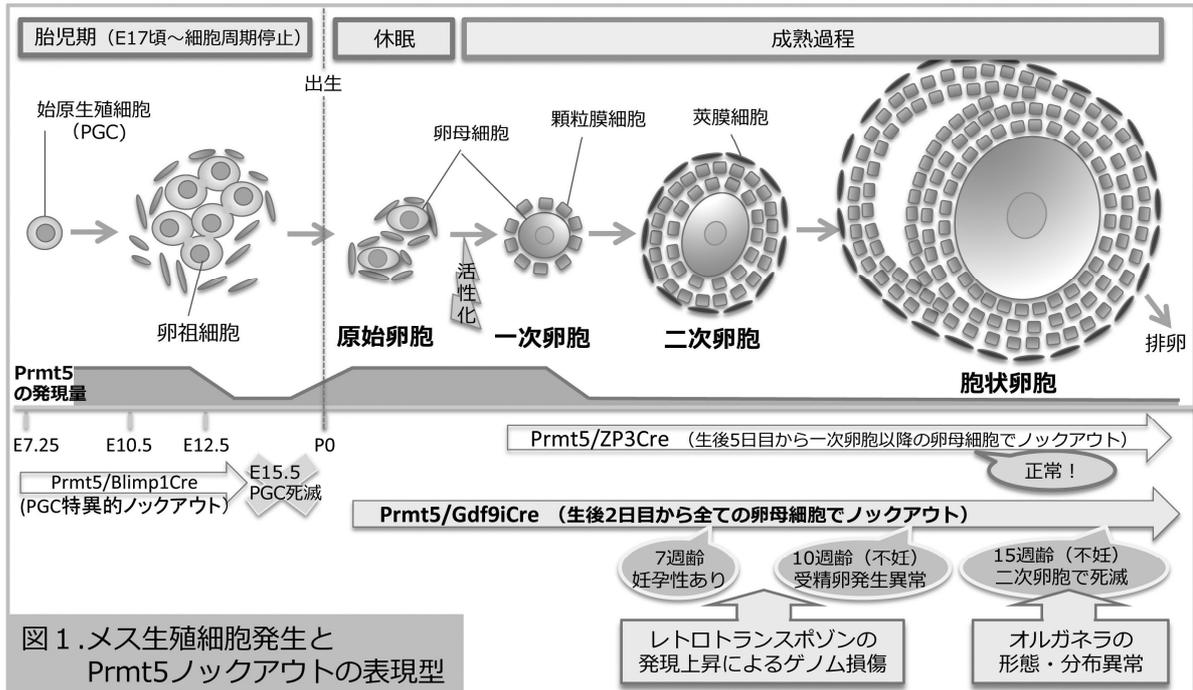


図1. メス生殖細胞発生と Prmt5 ノックアウトの表現型

Prmt ファミリー遺伝子はハエからヒトまで高度に保存された遺伝子群であり、アルギニンメチル基転移酵素をコードしている。Prmts はメチル基の付加様式によって2つに分けられ、Prmt5 は非対称ジメチル化を行う2型に分類される。先行研究から、Prmt5 はヒストンH4のジメチル化による転写抑制や、Trp53 や Foxo3a 等の転写因子のジメチル化による転写活性の調節を行うことが知られている。胎児期の始原生殖細胞(PGC)においては、Prmt5 がヒストンH4のジメチル化によりレトロトランスポゾン(RT)の発現を抑制し、PGC 特異的に Prmt5 を欠損した Prmt5/Blimp1Cre では胎児期のうちに PGC が死滅することが報告されている。同時に、一次卵胞以降の卵母細胞で Prmt5 を欠損するマウス Prmt5/ZP3Cre (P5/ZP cKO) は、卵胞成熟が完全に正常であることも示されていた(図1中央部) Kim et.al. Mol.Cell. 2014)。

申請者は、Prmt5 が休眠期の原始卵胞の卵母細胞に最も強く発現することに注目し、出生後にすべての卵母細胞で Prmt5 を欠損する Prmt5/Gdf9iCre ノックアウトマウス (P5/G9 cKO) を作製、解析を行った(図1右下)。その結果、P5/G9 cKO メスマウスは7-8週齢のうちには妊娠・出産するが10週齢以降は不妊を呈する早発閉経症様の表現型を示すことを見いだした。一次卵胞以降でノックアウトした P5/ZP cKO (原始卵胞では Prmt5 発現を維持) では正常な卵胞成熟を行うことから、Prmt5 が原始卵胞の卵母細胞で機能することが重要であることが強く示唆される。さらに、不妊の原因が週齢によって異なることも示唆されている。10週齢のメスマウスから採取した胚は、胚盤胞期までにすべて死滅した。10週齢の卵母細胞では Line1 と IAP の発現が顕著に上昇していたことから、Prmt5 は RT の発現を抑制し、ゲノム損傷の蓄積による胚発生異常を防いでいることが示唆された。さらに、15週齢の P5/G9 cKO 卵巣では二次卵胞後期に卵胞がすべて死滅し、胞状卵胞を完全に欠いていた。電子顕微鏡観察の結果、15週齢二次卵胞中の卵母細胞では、小胞体の断片化と重層化、ミトコンドリアの膨化、全てのオルガネラが細胞膜側に凝集する分布異常が起きていることが明らかになった。類似の表現型がミトコンドリアの融合・分裂に必須な GTPase である Drp1 や、微小管修飾酵素 Padi6 の KO で観察され、不妊となることが知られている。従って、Prmt5 も直接または間接的にミトコンドリアや微小管の活性を制御している可能性が高いと考えている(図2. 投稿準備中)。Prmt5 のこれらの機能が、表現型の顕れる二次卵胞ではなく、休眠中の原始卵胞にあると予想されることは非常に興味深い。卵胞維持と卵胞成熟の関係について注目しつつの解析を進めていくこととした。

2. 研究の目的

本研究は、未成熟な卵母細胞を健康に長期間維持するために働く分子メカニズムを解明することを主目的とした。そのため本申請期間中には、早発閉経症のモデルマウスであるタンパク質メチル化酵素 Prmt5 のノックアウトマウス Prmt5 /Gdf9-iCre cKO (以下 P5/G9 cKO) を用いて以下のことを明らかにすることを目標とした。

- (1)未成熟な卵母細胞において Prmt5 がオルガネラ関連因子を制御する機構を解明する。
- (2)卵母細胞のトランスクリプトーム解析、Prmt5 過剰発現マウスの解析、Prmt5 のクロマチン免疫沈降解析により Prmt5 の直接・間接の標的遺伝子を明らかにし、Prmt5 を起点とした不妊関連遺伝子カスケードを解明する。

3. 研究の方法

研究開始当初は以下の予定で研究を進める予定であった。

(1)Prmt5 のオルガネラ制御における機能の解析(H29)

ミトコンドリアの融合・分裂関連タンパク質や微小管、微小管結合タンパク質に Prmt5 のメチル化標的が存在するかどうかを *in vitro*, *in vivo* 双方の系を用いて検証する。

c

②Prmt5 過剰発現マウス(P5 *ovx*)を作製・解析し、cKO とは逆方向から Prmt5 の標的を検証する。

③P5 *ovx* を用いたクロマチン免疫沈降により、①で同定した候補遺伝子が、Prmt5 が直接制御しているのか間接的に制御しているのかを解析する。

概ね予定通り進行したが、方法(2)-②、③については Prmt5 過剰発現マウス(P5 *ovx*)の作出に失敗したため実行できなかった。

4. 研究成果

(1)Prmt5 のオルガネラ制御における機能の解析

P5/G9 cKO のマウスでは、二次卵胞の卵母細胞内で細胞内小器官の形態および分布異常がみられた。ミトコンドリアの断面積を計測したところ、一部のミトコンドリアが膨化していることが示された。そこで、ミトコンドリアの融合・分裂関連タンパク質や微小管、微小管結合タンパク質が、Prmt5 と結合能をもつかどうかについて、細胞強制発現系と免疫沈降法を用いてスクリーニングした。その結果 March5/MITOL、Drp1、TubulinB が Prmt5 と結合し、そのうちの March5 と TubulinB が Prmt5 のメチル化標的配列に類似の配列を持つことが明らかになった。そこで、*in vitro* のメチル化アッセイを試みたが、どちらも Prmt5 によるメチル化修飾を受けなかった。このことから、Prmt5 はタンパク質修飾によって March5 や Tubulin を制御しているのではなく、P5/G9 cKO 卵母細胞における細胞内小器官の形態および分布異常は二次的な要因であることが示唆された。

(2)Prmt5 標的遺伝子の解析と不妊関連遺伝子カスケードの解明

P5/G9 cKO のトランスクリプトーム解析により、Prmt5 が制御する候補遺伝子を同定するため、まず原始卵胞内卵母細胞を効率よく収集する系を検討した。最終的に、FACS を用いて、Cre によって発現する GFP、すべての卵母細胞膜に発現する cKit、細胞のサイズ (FSC) でソーティングすることで原始卵胞内卵母細胞を収集し、Quartz-seq 法により発現解析を行う実験系を確立した。3、7、10 週齢の卵巣をもちいて、コントロールと P5/G9 cKO の発現プロファイルを比較した結果、10 週齢の原始卵胞内卵母細胞内でのみ卵胞成熟に関する遺伝子発現のわずかな上昇が検出された。したがって、Prmt5 は原始卵胞内の休眠中卵母細胞において、卵胞成熟を担う遺伝子の発現抑制を担っていることが強く示唆された。なお、3 週齢と 7 週齢では発現に変化がなかった。これは、ゲノム上の Prmt5 が削除されたあとも、ヒストンのジメチル化修飾 (H4R3Me2s) が 7 週齢ごろまで維持されていることが原因だと考えている。H4R3Me2s は転写抑制に働くこと、Prmt5 による修飾であることが知られている。休眠中卵母細胞ではヒストンのターンオーバーがゆっくりであるために、Prmt5 ノックアウト後も数週間修飾が維持されるため、表現型の顕在化が遅れるのではないだろうか。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。