

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18791171
 研究課題名（和文） ユビキチン加水分解酵素の Maus 卵発生過程での発現と機能の検討
 研究課題名（英文） Expression and functional analysis of UCH-L1 in the mouse oocytes and preembryo
 研究代表者
 水澤 友利（MIZUSAWA YURI）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：10348716

研究成果の概要：マウス卵において、ユビキチン加水分解酵素（UCHL1）がメッセージレベル、およびタンパクレベルで多量に発現していることを明らかにし、このタンパクが減数分裂再開に関与している可能性を明らかにしたとともに、老化により UCHL1 mRNA の total RNA に占める割合が成熟卵子で低下することを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：1. 発生・分化 2. 酵素 3. 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

ユビキチンはチェックポイント蛋白の分解調節機構を介して細胞周期制御に関与していることが知られているが、2002年、カエル卵子より抽出されたユビキチン加水分解活性を有するタンパク p28 が、卵子でのプロゲステロン依存性の減数分裂再開に関与している事が報告された。このタンパクは cyclosome と呼ばれる細胞周期調節に関与するタンパク複合体(Cdk や cyclin もこの複合体の構成要素である)に存在しており、この

タンパクがユビキチン-プロテアソーム系を介して cyclinB1(卵における cyclin)レベルを調節することにより卵の G2/M transition を調節している事が推測される。ヒトを含む哺乳類卵子のユビキチン加水分解酵素 UCH-L1(ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1)は p28 と高い相同性をもつ。

2. 研究の目的

そこで本研究ではユビキチン分解酵素

UCHL1 の、哺乳類卵での発現様式およびその細胞周期調節・卵発生における機能をマウスをモデルに検討することを目的とした。具体的にはマウス卵子での UCHL1 の全長 cDNA の確認、卵巣中での UCHL1 の胎児期卵巣内での卵から分割期胚までにおける mRNA レベルおよびタンパクレベルでの発現量の解析に加え、SiRNA を用いてマウス卵子での減数分裂再開への関与を検討、さらに卵発生における本タンパクの関与を検討するため dsRNA ベクターを組み込んだ RNAi トランスジェニックマウスを作成することによって検討する。

3. 研究の方法

- 1) UCHL1 と考えられるタンパクがマウス卵子に相当量存在することを、約 2000 個のマウス M 期未受精卵抽出タンパクの二次元電気泳動による解析と、スポットの N 末端アミノ酸配列解析および質量分析から確認する。さらに genebank に登録されたマウス UCHL1 cDNA 配列をもとにプライマーを設計して nested RT-PCR を行った結果、UCHL1 mRNA のマウス卵子における発現を確認し、マウス卵巣切片にウサギ UCHL1 ポリクローナル抗体による免疫組織化学染色を施行し、間質や顆粒膜細胞には反応が認められないが Graaf 卵胞内卵子には少なくとも局在して強い染色性を認めることを確認する。
- 2) (GV 期卵への UCHL1 SiRNA の顕微注入による卵子細胞分裂への影響)
UCHL1 に対する SiRNA を調整し、GV 期卵に顕微注入することによりその後の UCHL1 タンパク発現量の低下を、RI を用いた抗原抗体反応にて確認するとともに、それによる GVBD、極体放出、さらに体外受精・顕微授精後の細胞分裂への影響、とくに分裂速度の影響を検討する。
- 3) (UCHL1 mRNA の単一卵子における定量)
UCHL1 は未受精卵子中に比較的多量に存在するため、将来様々な情報を与えてくれる可能性がある卵子の DNA マイクロアレイによる解析法の際、内部対照あるいは質的診

断の指標として使用できる可能性がある。そこで UCHL1 に加えて、これも卵子に比較的多量に含まれる、H1Foo, Eef1a の合計 3 つの mRNA について、マウス単一未受精卵子から抽出した mRNA 量のばらつきを検討した

- 3) UCHL1 mRNA の個々の卵子における多寡が、卵子の quality に関与している可能性を検討するために、定量的 PCR 法および遺伝子発現マイクロアレイを用いて定量を行うとともに、マウス卵子の加齢における UCHL1 mRNA 量の変化について検討を行った。

4. 研究成果

- 1) (UCHL1 のマウス卵子における発現) マウス未受精卵 2000 個からの抽出タンパク溶液を二次元泳動した結果、クマシー染色レベルで 86 の明瞭なスポットが確認できた。この中で、12 のスポットが飛行型質量分析計にて同定され、等電点 4.9、分子量 29.85 のスポットは、N 末端アミノ酸配列解析と一致して UCHL1 と推定された (図 1)。さらにマウス卵子 total RNA に対し RT-nested PCR を施行した結果 (図 2) UCHL1 mRNA 発現が確認された (図 3)。(卵巣内局在と着床前期胚における発現) 抗 UCHL1 ポリクローナル抗体を用いマウス卵巣の免疫組織化学染色を施行したところ (図 4) 一次卵胞からグラーフ卵胞までのすべての卵子に特異的な反応を認めた (図 5)。さらに受精後の着床前期胚では、UCHL1 mRNA は桑実胚まででは多量に発現しているが、胚盤胞期以降その発現量が低下する傾向が見られた (図 6)。
- 2) (マウス卵における UCHL1 の生物学的意義)
UCHL1 アンチセンスオリゴをマウス Gv 期卵細胞質内に注入し、その後の卵の減数分裂の再開 (GVBD) を解析した。アンチセンス注入群ではコントロール群と比較し、減数分裂が進行する傾向があった (図 7)。ただ、その後の体外受精で

は受精率・発生率・発生後の細胞分裂速度への影響は見られなかった。

3) UCHL1に加えて、これも卵子に比較的多量に含まれる、H1Foo, Eef1aの合計3つのmRNAについて、マウス単一未受精卵子から抽出したmRNA量のばらつきを検討した結果、UCHL1は他の二つの遺伝子より個々の卵子による量のばらつきが大きく、卵子ごとのなんらかの質的な差を表している可能性が示唆された。ここでマウス卵子一個から抽出されるRNAは800pgと極微量であり、まずmRNA定量の信頼性を検討するため、8週令BDF1成熟メスマウス単一卵子よりTrizol抽出したtotalRNAを、我々が以前デザインしたPCR primer、およびTaqman probeを用いて定量的real-time PCRを行った結果、後者の再現性・信頼性が飛躍的に高いことが明らかとなった。

4) 若齢(8週)および高齢(60週齢)マウスで単一卵子を遺伝子増幅後に増幅産物をWhole Mouse GenomeオリゴDNAマイクロアレイにて解析したところ、UCHL1の卵子内全RNAに対する構成比は加齢とともに低下することが明らかになった。

5) (3)まとめと本研究の国内外における位置づけ

マウス卵において、ユビキチン加水分解酵素(UCHL1)がメッセージレベル、およびタンパクレベルで多量に発現していることを明らかにし、このタンパクが減数分裂再開に関与している可能性を明らかにしたとともに、老化によりUCHL1mRNAのtotalRNAに占める割合が成熟卵子で低下することを明らかにした。特に老化によるUCHL1mRNA低下は、今後卵子のagingやqualityを検討する上で、指標あるいは内部対象となりうる可能性を世界で初めてあきらかにした。

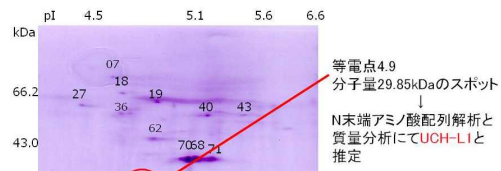


図1. 二次元電気泳動の分析結果

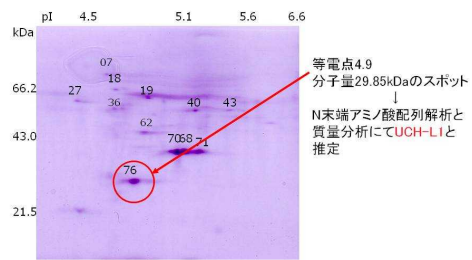


図2. UCH-L1遺伝子上でのプライマー設定

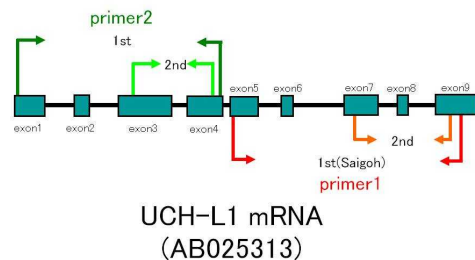


図3. RT-nested PCR結果

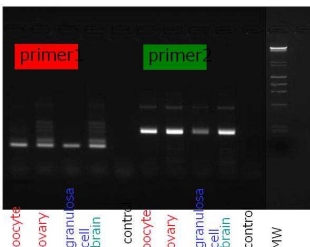


図4. 免疫組織化学染色 (前胞状期卵胞)

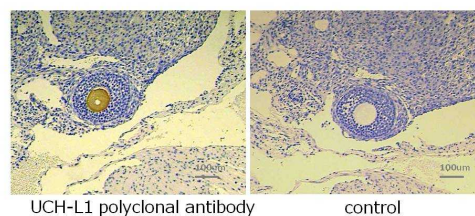


図5. 胞状期卵胞、二次卵胞

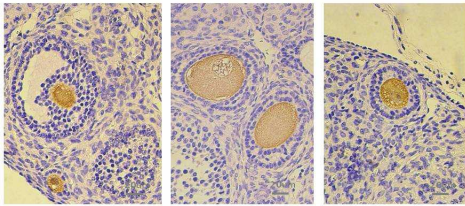


図6. ウェスタンブロット結果

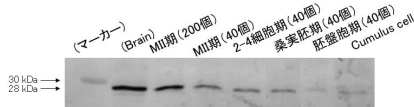
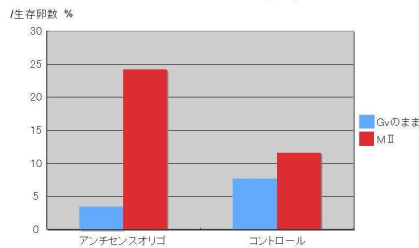


図7. Gv期卵のUCH-L1アンチセンスオリゴインジェクション(結果)



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)

Mizusawa Y, Kuji N, Tanaka Y, Tanaka M, Ikeda E, Komatsu S, Kato S, Yoshimura Y. Expression of human oocyte-specific linker histone protein and its incorporation into sperm chromatin during fertilization. Fertil Steril. Jan13;Epub ahead of print,2009. 査読有

Kuji N, Yoshida H, Mizusawa Y, Hashiba T, et al Expression of ubiquitin carboxy1-terminal

hydrolase1(UCH-L1)inmouse oocytes and preembryos. Human Reproduction 21;sup11, 109,2006. 査読なし

吉田宏之、久慈直昭、水澤友利、吉村泰典 他 2 名 ユビキチン加水分解酵素(UCH-L1)マウス卵子初期胚での発現と生物学的意義 日本生殖医学会雑誌 51(4);269、2006 査読なし

〔学会発表〕(計 3 件)

松村康子、水澤友利 他 融解胚移植～自然排卵周期とホルモン補充周期についての検討 第 53 回日本生殖医学会学術講演会、2008 年 10 月 23～24 日、神戸国際会議場

高橋純、水澤友利 他 低用量メトホルミン療法による不妊患者への効果 第 53 回日本生殖医学会学術講演会、2008 年 10 月 23～24 日、神戸国際会議場

水澤友利 他 低用量メトホルミン療法による不妊患者への効果 第 53 回日本生殖医学会学術講演会、2008 年 10 月 23～24 日、神戸国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

水澤 友利 (MIZUSAWA YURI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10348716

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし