

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06022

研究課題名(和文) 雌性配偶子形成におけるアルギニル化の機能の解明

研究課題名(英文) Arginylation in female gametogenesis.

研究代表者

黒坂 哲 (Kurosaka, Satoshi)

近畿大学・先端技術総合研究所・講師

研究者番号：30625356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アルギニル化はアルギニン転移酵素(ATE1)によってタンパク質にアルギニンが結合する翻訳後修飾であり、発生に必須であるが、配偶子形成とのかかわりは明らかではない。本研究では、それを明らかにするために、マウス卵母細胞におけるアルギニル化タンパク質の解析をおこなった。第二減数分裂中期(MII)期の卵母細胞において、アルギニル化β-アクチンは紡錘体に強く局在した。卵核胞期(GV期)およびMII期の卵母細胞において、雌の生殖能力あるいは初期胚発生において重要となるタンパク質がアルギニル化を受けていた。これらの結果は、アルギニル化の生殖・発生へのかかわりの解明に向けての新規かつ重要な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルギニル化は発生やさまざまな生命活動において必要であるが、世界的に研究が進んでいない翻訳後修飾である。本研究では、卵母細胞におけるアルギニル化タンパク質の解析により、アルギニル化の雌性配偶子形成へのかかわりの解明を試みた。その結果、アルギニル化タンパク質が卵母細胞の紡錘体に局在すること、生殖や発生において重要なタンパク質が卵母細胞においてアルギニル化されていることが明らかになった。これまでに雌性配偶子におけるアルギニル化の解析はなされておらず、本研究成果は生殖・発生の分野にをもたらすのみならず、生殖医療や動物生産の発展に向けてこれまでになく角度からの情報を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：Arginylation is a posttranslational modification mediated by arginyltransferase (ATE1). Arginylation is essential for the development, however, its involvement in gametogenesis is still unknown. This study was conducted to elucidate the involvement of arginylation in the female gametogenesis. Arginylated beta-actin localized to the meiotic spindle in the oocytes at metaphase II stage. We identified arginylated proteins in the oocytes at germinal vesicle and metaphase II stages, and some of them are important for female fertility or preimplantation development. These novel and important results are significant steps to elucidate the involvement of arginylation in female fertility and development.

研究分野：細胞生物学、発生生物学、生殖生物学

キーワード：アルギニル化 雌性配偶子

1. 研究開始当初の背景

アルギニル化は、アルギニン転移酵素 (ATE1) の働きによって、タンパク質にアルギニンがペプチド結合する翻訳後修飾である。ATE1 ノックアウトマウスが致死であることから、個体発生に必須であることは明らかである。また、コンディショナルノックアウトマウスの解析から、正常な生殖能力にアルギニル化が必要であることも示されているが、雌性配偶子の形成におけるアルギニル化の役割についてはこれまでに報告が皆無である。

減数分裂における染色体分配の異常により染色体の異数性が生じ、卵子の発生能が低下することは、ヒトを含む哺乳類における多く研究および実例から明らかであり、減数分裂時の紡錘体形成および染色体分離を制御する機構の詳細な解明は、動物生産や生殖医療において喫緊の課題である。紡錘体において中心となっているタンパク質はチューブリンであり、さらにアクチンも紡錘体形成および染色体分離において重要な役割を担っていることがわかっている。チューブリンとアクチンはともにアルギニル化のターゲットであり、アクチン細胞骨格およびそれに関わる細胞骨格系がアルギニル化によって制御されていることは我々による研究を含む過去のいくつかの研究から明らかである。

以上のことから、雌性配偶子形成にアルギニル化タンパク質がかかわっているという仮説をもとに、本研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞骨格タンパク質とそのアルギニル化が減数分裂時の紡錘体形成や染色体分配をどのように制御しているのか、さらにはその他のタンパク質のアルギニル化が配偶子形成にどのように関与しているのかを調べることで、雌性配偶子形成のメカニズムの一端を明らかにし、動物生産や生殖医療に貢献する成果を得ることである。

3. 研究の方法

(1) マウス第二減数分裂中期 (MII 期) 卵母細胞における ATE1 の発現の確認

雌性配偶子における ATE1 の発現の有無についてはこれまで報告されておらず、本研究の予備実験では、免疫染色によりマウス MII 期卵母細胞で ATE1 のシグナルが検出されているが、免疫染色のみでは検出されたシグナルが ATE1 であると断定することはできない。そこで、ATE1 ノックアウト細胞をネガティブコントロールとして設定したウェスタンブロッティングで、MII 期卵母細胞における ATE1 タンパク質の存在を確認した。ATE1 を検出するための抗体として、Millipore 社の Anti-ATE1 Antibody (MABS436) を用いた。

(2) 若齢および加齢マウス第二減数分裂中期 (MII 期) 卵母細胞における、ATE1 およびアルギニル化 -アクチンの局在の確認

卵母細胞の紡錘体形成とアルギニル化の関連を明らかにするためには、アルギニル化タンパク質の紡錘体への局在を調べることが必要である。アルギニル化タンパク質を特異的に検出できる抗体としては、Millipore 社の Anti-beta Actin Antibody, arginylated (N-terminal) (ABT264) が市販されており、この抗体を用いた免疫蛍光染色により、MII 期卵母細胞におけるアルギニル化 -アクチンの極材を確認した。アルギニル化 -アクチンの局在が加齢による影響を受けるのかを明らかにするため、卵母細胞は 2、7、9、11 ヶ月齢のマウスから回収したものをを用いた。

(3) マウス卵核胞期 (GV 期) 卵母細胞および MII 期卵母細胞においてアルギニル化されるタンパク質の同定

卵母細胞においてアルギニル化されているタンパク質を同定するため、GV 期および MII 期卵母細胞から回収したタンパク質の質量分析 (SCIEX 社 TripleTOF5600+ system を用いた LC-MS/MS) を行った。検出されたペプチドの中から、本来の質量よりもアルギニンの質量分だけ重い質量をもつと判定されたペプチドをピックアップし、その中からアルギニル化と近似する質量変化をみせる翻訳後修飾を受けている可能性が考えられるものや N 末端のアルギニンが切断されなかったと考えられるものを除き、残ったものをアルギニル化されたペプチドであると判定した。

4. 研究成果

(1) マウス MII 期卵母細胞における ATE1 タンパク質の存在

上記の抗体 (MABS436, Millipore) を用いたウェスタンブロッティングにより、野生型細胞 (図 1, Lane 1) では ATE1 を検出でき、ATE1 ノックアウト細胞 (図 1, Lane 2) では検出できなかった。このことは、本研究において使用した抗体は正しく ATE1 を認識していることを示している。そして、230 個の MII 期卵母細胞から ATE1 を検出することができた (図 1, Lane 3)。予備実験の免疫染色で既に得られている結果と合わせ、ATE1 タンパク質がマウス MII 期卵母細胞中に存在することが明らかとなった。

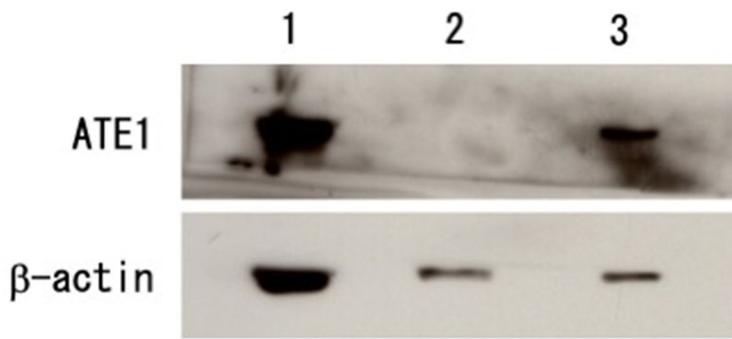


図 1: マウス MII 期卵母細胞における ATE1 タンパク質の発現

Lane 1: 野生型マウス ES 細胞。Lane 2: ATE1 KO マウス胎子線維芽細胞。Lane 3: マウス MII 期卵母細胞 (230 個)。

(2) マウス MII 期卵母細胞におけるアルギニル化 β -アクチンの局在

マウス MII 期卵母細胞において、アルギニル化 β -アクチンの紡錘体への強い局在がみられた (図 2)。紡錘体中存在するアクチンが卵子の正常な染色体分配に必要であることが報告されており (Mogessie and Schuh, Science, 2017) この役割を担うアクチンがアルギニル化 β -アクチンである可能性が示唆される。この局在パターンは 2、7、9、11 ヶ月齢のいずれの雌マウス由来の卵母細胞においても認められたことから、アルギニル化 β -アクチンの紡錘体への局在は加齢による影響を受けないことが示された。

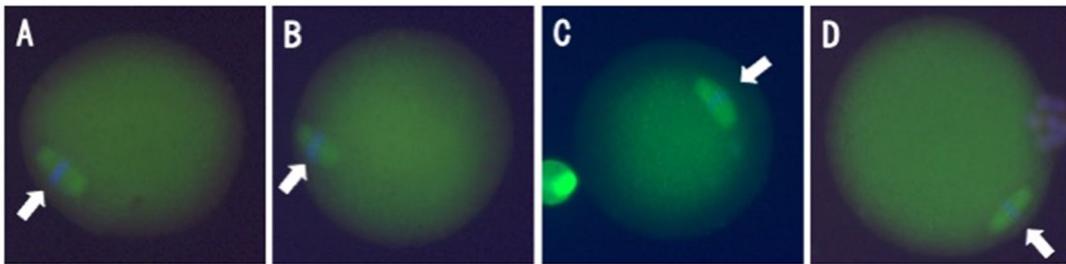


図 2. マウス MII 期卵母細胞におけるアルギニル化 β -アクチンの紡錘体への局在

A: 2 ヶ月齢、B: 7 ヶ月齢、C: 9 ヶ月齢、D: 11 ヶ月齢。紡錘体の位置を矢印で示す。

アルギニル化 β -アクチンと紡錘体の主要構成タンパク質である α -チューブリンの共免疫蛍光染色で確認したところ、紡錘体におけるアルギニル化 β -アクチンは α -チューブリンよりも狭い範囲で、紡錘体の中心に近い部分に局在していた。本研究期間内にこの局在パターンの意味を明らかにすることはできず、これは今後の課題である。

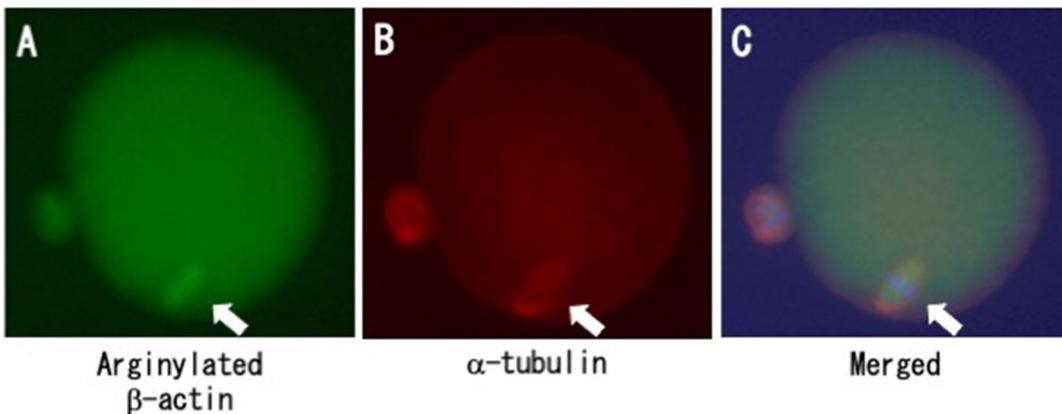


図 3. マウス MII 期卵母細胞の紡錘体におけるアルギニル化 β -アクチンと α -チューブリンの局在

A: アルギニル化 β -アクチン、B: α -チューブリン、C: Merged。紡錘体の位置を矢印で示す。

(3) GV 期および MII 期マウス卵母細胞におけるアルギニル化タンパク質の同定

GV 期および MII 期の卵母細胞各 433 個を用いて質量分析を実施した結果、GV 期卵母細胞において 13 種類 (図 1)、 MII 期卵母細胞において 22 種類 (図 2) をアルギニル化タンパク質の候補

として同定することができた。検出されたタンパク質のうち、DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 47 (Ddx47)、Elongation factor 1-beta (Eef1b)、Frizzled-9 (Fzd9)、Isoform 2 of KH domain-containing protein 3 (Khdc3)、RAB1, member RAS oncogene family, isoform CRA_a (Rab1a) の5つはGV期卵母細胞とMII期卵母細胞のいずれにおいてもアルギニル化タンパク質として同定された。この5つのうち、Khdc3は雌マウスの生殖能力において重要である。Khdc3 ノックアウト雌マウス由来の受精卵は卵割期において紡錘体形成異常を示すことが報告されており (Zeng and Dean, Proc Natl Acad Sci U S A, 2009)、減数分裂においても同様に紡錘体形成異常が生じる可能性は否定できない。Khdc3の正常な機能にアルギニル化がかかわっている可能性を調べることは興味深い課題である。GV期卵母細胞でのみ同定されたもののうち、Tle6は初期胚発生に必須な母性効果遺伝子である (Yu et al., Nat Commun, 2014)、MII期卵母細胞においてのみ同定されたもののうち、Nlrp4f、Nlrp5、Padi6はいずれも雌の生殖能力や初期胚発生において重要なものである。Nlrp4fは母性効果遺伝子であり、ノックアウトマウスは卵母細胞の形態異常や雌の生殖能力の低下を示す (Qin et al., Development, 2019)、Nlrp5は雌の生殖に必須な母性効果遺伝子であり、ノックアウト胚は2細胞期で致死である (Tong et al., Nat Genet, 2000; Yu et al., Nat Commun, 2014)、Padi6は生殖細胞特異的に発現する遺伝子で、雌の生殖に必須であり、ノックアウト胚は2細胞期で致死である (Esposito et al., Mol Cell Endocrinol, 2007)。上記のような生殖・発生に必須な母性効果遺伝子にコードされたタンパク質がアルギニル化されていることは、アルギニル化が生殖・発生において重要な翻訳後修飾であることを示唆している。これらの非アルギニル化変異体を用いた解析や生殖細胞特異的ATE1ノックアウトマウスを用いた解析により、生殖・発生におけるアルギニル化の重要性が明らかになることが期待できる。

表1. マウスGV期卵母細胞においてアルギニル化されていたタンパク質

Proteins	Genes	Accessions
L-lactate dehydrogenase B chain	Ldhd	sp P16125 LDHB_MOUSE
Isoform 2 of KH domain-containing protein 3	Khdc3	sp Q9CWIU5-2 KHDC3_MOUSE
Transducin-like enhancer protein 6	Tle6	sp Q9IWB3 TLE6_MOUSE
RAB1, member RAS oncogene family, isoform CRA_a	Rab1a	tr Q0PD67 Q0PD67_MOUSE
Elongation factor 1-beta	Eef1b	sp O70251 EF1B_MOUSE
Uncharacterized protein	Actb	tr Q3UAA9 Q3UAA9_MOUSE
GPI inositol-deacylase	Pgap1	sp Q3UUQ7 PGAP1_MOUSE
Frizzled-9	Fzd9	sp Q9R216 FZD9_MOUSE
FRY-like transcription coactivator (Fragment)	Fryl	tr AOA0J9YUH4 AOA0J9YUH4_MOUSE
Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	Cpt2	sp P52825 CPT2_MOUSE
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 47	Ddx47	tr Q4VBG1 Q4VBG1_MOUSE
MKIAA0131 protein (Fragment)	mKIAA0131	tr Q6ZQ17 Q6ZQ17_MOUSE
Secernin-3	Scrn3	sp Q3TMH2 SCRN3_MOUSE

表2. マウスMII期卵母細胞においてアルギニル化されていたタンパク質

Proteins	Genes	Accessions
Protein-arginine deiminase type-6	Padi6	sp Q8K3V4 PAD16_MOUSE
NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 5	Nlrp5	sp Q9R1M5 NALP5_MOUSE
Isoform 2 of KH domain-containing protein 3	Khdc3	sp Q9CWIU5-2 KHDC3_MOUSE
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	Uchl1	sp Q9R0P9 UCHL1_MOUSE
NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 4F	Nlrp4f	tr L7N1W9 L7N1W9_MOUSE
Protein disulfide-isomerase A4 GN=Pdia4	Pdia4	tr AOA0R4JOZ1 AOA0R4JOZ1_MOUSE
Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase, mitochondrial	Mecr	sp Q9DCS3 MECR_MOUSE

RAB1, member RAS oncogene family, isoform CRA_a	Rab1a	tr Q0PD67 Q0PD67_MOUSE
Uncharacterized protein GN=Cf12	Cf12	tr Q3UHW9 Q3UHW9_MOUSE
Elongation factor 1-beta GN=Eef1b	Eef1b	sp 070251 EF1B_MOUSE
Uncharacterized protein GN=Cep128	Cep128	tr B7ZNX8 B7ZNX8_MOUSE
Phospholipid-transporting ATPase IB	Atp8a2	sp P98200 AT8A2_MOUSE
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 2	Slc2a2	sp P14246 GTR2_MOUSE
Vacuolar protein sorting-associated protein 41 homolog	Vps41	sp Q5KU39 VPS41_MOUSE
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 47	Ddx47	tr Q4VBG1 Q4VBG1_MOUSE
Frizzled-9	Fzd9	sp Q9R216 FZD9_MOUSE
Guanylyl cyclase GC-E	Gucy2e	sp P52785 GUC2E_MOUSE
Fatty acid-binding protein, brain	Fabp7	tr E9Q0H6 E9Q0H6_MOUSE
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 4	Ppil4	sp Q9CXG3 PPIL4_MOUSE
Protein FAM135A	Fam135a	sp Q6NS59 F135A_MOUSE
E3 ubiquitin-protein ligase RNF213	Rnf213	tr A0A171EBL2 A0A171EBL2_MOUSE
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2	Usp2	sp O88623 UBP2_MOUSE

(4) まとめ

本研究において、アルギニル化が生殖・発生において重要な翻訳誤修飾であることを示唆するいくつかの知見を得ることができた。予定していた生殖細胞特異的 ATE1 コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析を研究期間内に実施することができなかったなど、当初の研究計画通りに進まなかったが、得られた成果をもとにさらなる研究を進めることで、学術的に重要な生殖医療や動物生産に貢献することのできる成果が期待できると考える。

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of Pennsylvania			