

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03267

研究課題名（和文）RNA結合タンパク質が担う卵母細胞の活性化制御機構

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of primordial follicle activation mediated by RNA-binding proteins

研究代表者

加藤 譲（Kato, Yuzuru）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任講師（常勤）

研究者番号：60570249

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：卵子の供給源である原始卵胞は長期に渡り卵巣内で維持されるが、常にその一部の卵胞成長を開始することで継続的に卵子は産生される。この原始卵胞の維持と卵胞成長活性化はどのような分子機構により制御されているのか？本研究では転写後遺伝子発現制御に関わる2つのRNA結合タンパク質に焦点を当て、これらの原始卵胞の維持及び卵胞成長活性化への関与を遺伝学的に検討した。遺伝子Aに対する遺伝子KO及び卵母細胞特異的過剰発現マウスの解析結果から、遺伝子Aが原始卵胞の活性化に関わることが示唆された。また遺伝子Bに対するKOマウスの結果から遺伝子Bが原始卵胞の維持に関わることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はマウスをモデルに哺乳動物の継続的な卵子産生メカニズムの解明を目指すものである。哺乳動物の卵巣は長期に渡る生殖を可能にするため、原始卵胞と呼ばれる最も未成熟な卵胞を限りある卵子の供給源として維持している。そして原始卵胞の卵胞成長を逐次的に開始することで継続的に卵子を作り出している。このメカニズムの破綻は早発卵巣不全などの女性不妊症の原因となることから、生殖医学的にも重要な研究課題である。本研究ではRNA結合タンパク質が介する遺伝子発現制御に注目し、原始卵胞の維持と成長を制御する分子機構の理解に迫った。本研究の成果により、原始卵胞の維持と成長開始に関わる二つのRNA制御因子が同定された。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to understand continuous egg production in the mouse ovary. Particularly, we examined the regulatory mechanisms of the maintenance and growth of primordial follicles, a finite reservoir of eggs in mammalian ovaries, by focusing on two RNA-binding proteins (protein A and B). To examine the role of these RNA-binding proteins, we generated oocyte-specific knockout mice. We found that deletion of gene A results in the loss of oocytes in postnatal ovaries. To further examine the role of gene A, we next generated an over-expressing (OE) mouse line. We found that primordial follicles were abnormally enlarged in the OE ovaries. These results suggest that protein A is required for the survival and growth of primordial follicles. On the other hand, disruption of gene B results in the abnormal oocyte enlargement, suggesting that protein B is required for the maintenance of primordial follicles.

研究分野：発生生物学

キーワード：マウス 原始卵胞 卵母細胞 RNA制御

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

継続的な卵子産生は種の存続にとって重要な配偶子産生機構である。線虫やショウジョウバエなどのモデル生物では生殖幹細胞に依存したシステムにより継続的な卵子産生が達成され、その分子機構に関する研究は数多く報告されている。一方、卵巣に生殖幹細胞が存在しないとされる哺乳動物では、最も未熟な卵胞である原始卵胞を長期に渡り維持しつつ、その卵胞成長を逐次的に活性化することにより、継続的に卵子を産生する。この哺乳動物特有の卵子産生システムの解明は生殖生物学・生殖医学における主要な研究課題だが、未だ知見に乏しい。

原始卵胞は一つの卵母細胞とそれを取り巻く少数の顆粒膜細胞から成り、活性化により顆粒膜細胞の増殖および卵母細胞の成長が起こる。原始卵胞活性化における卵母細胞と顆粒膜細胞の関係について、これまでの研究から、ア) 卵母細胞の成長に先立ち顆粒膜細胞数が増加すること、イ) 卵母細胞の成長は顆粒膜細胞に由来する KIT シグナルが関与すること、が報告されている。このことから、原始卵胞活性化は顆粒膜細胞の活性化に起因する連続的なプロセスと考えられてきた。一方、卵巣内ではしばしば顆粒膜細胞の正常な増殖を伴わない卵母細胞の異常な成長が観察される。このことは卵母細胞が自身の活性化を制御する顆粒膜細胞非依存的な仕組みを有することを暗示するが、その分子機構は未だ謎である。

2. 研究の目的

本研究はこれまで深く着目されてこなかった「卵母細胞における活性化制御機構」という原始卵胞活性化制御の新たな概念の提示を目指すものである。我々のこれまでの予備の結果から、卵母細胞の活性化制御において2つの RNA 結合タンパク質(タンパク質 A, B) が関わる可能性が見出された。本研究ではこれら2つの遺伝子の機能を解析し、RNA 結合タンパク質が担う卵母細胞の活性化制御機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子 A, B の遺伝学的解析

原始卵胞の維持と活性化における遺伝子 A, B それぞれの発生学的役割を調べるため、遺伝子ノックアウト及び卵母細胞特異的過剰発現マウスを作製し、卵胞数の計測及び卵胞成長への関与が知られているマーカータンパク質の発現解析を行なった。

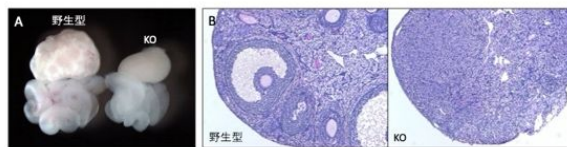


図1：遺伝子Aの卵母細胞特異的ノックアウトは卵胞が死滅する (A) 生後5週齢のマウス卵巣。野生型に比べ遺伝子AのKOは萎縮している。(B) (A) のPAS染色像。KO卵巣では卵胞が見られない。

(2) RNA シーケンスによる遺伝子 B KO 原始卵胞の遺伝子発現解析

遺伝子 B の欠損が卵母細胞の遺伝子発現にどのような影響を与えるのか調べるため、卵母細胞特異的に GFP を発現する Stella-GFP と交配し、セルソーターにより原始卵胞を単離した後、次世代シーケンサーを用いて遺伝子発現変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子 A, B の遺伝学的解析

遺伝子 A KO/OE マウスの解析

卵巣の組織切片を用いたタンパク質 A の免疫染色の結果から、タンパク質 A は卵母細胞特異的に発現することを見出した。この知見をもとに生後の卵母細胞特異的に遺伝子 A をノックアウトしたところ、全ての卵母細胞が死滅し、卵巣が萎縮した(図1)。このことから、遺伝子 A は卵母細胞の生存に必須であることが明らかとなった。

次に、生後の卵母細胞特異的に FLAG タグを融合した遺伝子 A を過剰発現するマウスを作製した(図2)。このマウスの卵巣を解析したところ異常な成長卵胞が多数観察され、原始卵胞が早発に枯渇することを見出した(図3)。これらの結果から、我々はタンパク質 A が卵胞成長の促進に働くと考え、翻訳促進のマーカーであるリン酸化 S6 の発現を免疫染色により解析した。野生型においてリン酸化 S6 のシグナルは原始卵胞では非常に弱く、一次卵胞からシグナルが検出される。遺伝子 A の過剰発現卵巣では野生型に比べリン酸化 S6 のシグナルが検出される原始卵胞の割合がわずかに増加したが、顕著な差は見られなかった。このことから、遺伝子 A の過剰発現だけでは、リン酸化 S6 のシグナルに大きな影響を与えることができないと考え、卵母細胞がより卵胞成長しやすい状況下で遺伝子 A を過剰発現させることにした。そこで、卵胞成長を抑制する Pten 遺伝子に着目し、Pten 遺伝子をノックアウトした遺伝的背景において遺伝子 A を過剰

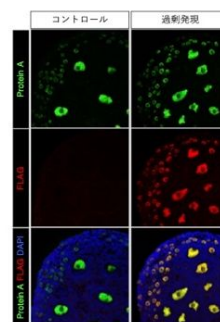


図2：遺伝子Aの過剰発現卵巣。生後7日目の卵巣の組織切片を用いてタンパク質 A 及び FLAG に対する抗体で行った免疫染色像。遺伝子Aの過剰発現卵巣で FLAG-protein A のシグナルが検出される。

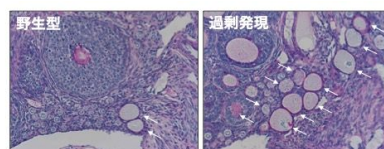


図3：遺伝子Aの過剰発現卵巣は原始卵胞の異常な活性化が観察される。生後3週齢のマウス卵巣のPAS染色像。野生型に比べ遺伝子Aの過剰発現卵巣では異常に活性化した卵胞(白矢印)が多数観察される。

発現させることにした。その結果、リン酸化 S6 のシグナルが検出される原始卵胞の割合は野生型に比べ 6 倍に増加した。コントロールとして解析した Pten KO の卵巣では、遺伝子 A の過剰発現卵巣とほぼ同様の 2 倍弱程度だったことから、遺伝子 A の過剰発現の効果が Pten ノックアウトにより、顕在化したと考えられる。これらの結果から、遺伝子 A が原始卵胞の活性化に関与することが示唆された。

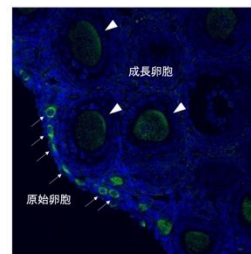


図4 タンパク質Bは原始卵胞で強い発現を示す生後2週齢のマウス卵巣の免疫染色像。緑：タンパク質B。白矢印：原始卵胞。白矢頭：成長卵胞

遺伝子 B KO/OE マウスの解析

続いて我々は原始卵胞の維持と活性化における遺伝子 B の機能解析を行った。まずタンパク質 B の発現パターンを調べるため、卵巣の組織切片を用いて免疫染色を行った。その結果、タンパク質 B はタンパク質 A と異なり、原始卵胞で強い発現を示し、卵胞成長に伴って発現量が低下することが示された（図 4）。そこで我々は、遺伝子 B が原始卵胞の維持に働いているという作業仮説のもと、CRISPR/Cas9 により遺伝子 B の KO マウスを作成した。その結果、我々が期待した通り KO 卵巣では異常な成長卵胞が多数観察され、原始卵胞が早発に枯渇することを見出した（図 5）。このことから、遺伝子 B が原始卵胞の維持に働くことが強く示唆された。そこで、卵胞成長のマーカであるリン酸化 S6 に加え、細胞内の局在が卵胞成長の指標となる FOXO3A と我々が独自に見出した卵胞成長の指標である P-body について、遺伝子 B ノックアウト卵巣における発現及び局在の変化を免疫染色により解析した。その結果、驚いたことに、これらの卵胞成長マーカーの発現及び局在の変化は野生型と遺伝子 B ノックアウト間で顕著な違いが見られなかった。このことから、遺伝子 B 欠損下では未知のメカニズムにより原始卵胞が異常に活性化するものと思われる。そこで遺伝子 B の過剰発現マウスを作成して原始卵胞の維持への影響を調べることにした。しかし、残念ながらトランスジーンが発現が十分に高いラインを得ることができなかった。

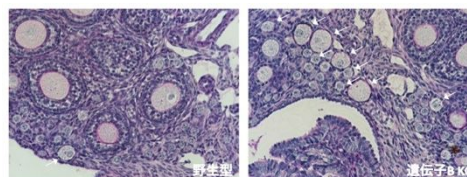


図5：遺伝子Bのノックアウトは原始卵胞の異常な活性化が観察される生後2週齢マウス卵巣のPAS染色像。野生型に比べ遺伝子Bのノックアウト卵巣では異常に活性化した卵胞（白矢印）が多数観察される。

(2) RNA シーケンスによる遺伝子 B KO 原始卵胞の遺伝子発現解析

組織学的な解析からは原始卵胞の維持への関与が示唆されるタンパク質 B は mRNA の分解に働くことが報告されている。そこで遺伝子 B ノックアウトによりどのような遺伝子の発現が変化するのか調べるため、遺伝子 B ノックアウトの遺伝的背景に卵母細胞のマーカーである Stella-GFP を導入し、セルソーターを用いて原始卵胞を単離した後、次世代シーケンスによる解析を行った。その結果、遺伝子 B ノックアウト原始卵胞では 864 の遺伝子発現変化が検出された。このうち、465 遺伝子がノックアウト原始卵胞で発現上昇し、399 遺伝子が発現低下していた。タンパク質 B は RNA の分解に働くことが予想されることから、ノックアウトで発現上昇する 465 の遺伝子に着目し、GO 解析を行ったところ、Rho GTPase が関わるシグナルや mRNA の核外輸送に関わるカテゴリーなどに関わる遺伝子が有力な候補として同定された。現在、これらの遺伝子に着目して詳細な解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimada Ryuki, Koike Hiroko, Hirano Takamasa, Kato Yuzuru, Saga Yumiko	4. 巻 24
2. 論文標題 NANOS2 suppresses the cell cycle by repressing mTORC1 activators in embryonic male germ cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102890 ~ 102890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.102890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fukuda Kurumi, Muraoka Masafumi, Kato Yuzuru, Saga Yumiko	4. 巻 105
2. 論文標題 Decoding the transcriptome of pre-granulosa cells during the formation of primordial follicles in the mouse	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 179 ~ 191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioab065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Yuzuru, Saga Yumiko	4. 巻 109
2. 論文標題 Antagonism between DDX6 and PI3K-AKT signaling is an oocyte-intrinsic mechanism controlling primordial follicle growth	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 73 ~ 82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioad043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤譲	
2. 発表標題 原始卵胞の維持と活性化の制御機構：RNAヘリカーゼDDX6が関わる原始卵胞の維持機構を中心に	
3. 学会等名 熊本大学発生医学研究所第398回発生研セミナー（招待講演）	
4. 発表年 2021年	

1. 発表者名 加藤 謙
2. 発表標題 P-body様細胞質顆粒の解析から迫る原始卵胞の維持と活性化の制御機構
3. 学会等名 新学術領域「配偶子構築」「全能性プログラム」合同公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

原始卵胞形成過程における顆粒膜細胞の遺伝子発現を解析
https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2021/05/research-highlights_ja/rh20210413.html
 国立遺伝学研究所の加藤助教らのグループは原始卵胞形成過程の顆粒膜細胞のトランスクリプトーム解析を
<https://www.gamete-integrity.com>

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