様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ６ 月　 ７ 日現在

機関番号：３２５１９
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2023
課題番号：２０Ｋ０７４２７

研究課題名（和文）生殖細胞特異的なStra8活性化分子の同定と卵新生の制御

研究課題名（英文）Identification of a germline-specific Stra8 activator for the regulation of de novo oogenesis

研究代表者
新倉　雄一（Niikura, Yuichi）

城西国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：１０６１５１０７

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）：本研究では、卵子形成に関与する転写因子Stra8に注目し、その機能制御と卵巣老化のメカニズムを解明を目指した。具体的には、Stra8と結合するタンパク質を網羅的に同定し、特に加齢によって発現が変動するものを見つけることを目指した。従来の免疫沈降法ではタンパク質の乖離が問題となるため、近位依存性ビオチン標識法を採用した。生細胞でのビオチン標識には成功したが、ストレプトアビジンビーズを用いたアフィニティ精製の溶出条件を確立できず、目的タンパク質の同定には至らなかった。しかし、生細胞でのビオチン標識の成功は重要な進展であり、溶出条件の課題を克服し、Stra8と相互作用するタンパク質の同定を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義
Stra8は卵子形成に必須な転写因子で、その活性を制御する化合物は不妊症治療薬の可能性がある。今回、Stra8に結合するタンパク質群を網羅的にビオチン標識することに成功した。これらのタンパク質には、卵新生のON/OFFを制御し、卵巣恒常性の維持に関わる分子が含まれていると推測される。現在、卵新生は、分子機序は不明でエビデンスが少なく、懐疑的に見られている。Stra8制御分子の同定は、卵新生の分子機序を解明するだけでなく、卵巣老化との関係を紐解き、加齢による妊娠力の低下を説明することに貢献する。本研究成果は未完成でありながら、分子機序解明につながる大きな一歩である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the transcription factor Stra8, which is involved in oogenesis, aiming to understand its regulation and the mechanisms behind ovarian aging. We attempted to identify proteins that bind to Stra8 and are essential for its transcriptional activity, particularly those whose expression changes with age. Traditional immunoprecipitation methods often cause protein dissociation, so we used a proximity-dependent biotin labeling approach. Although we successfully achieved biotin labeling in living cells, we could not establish optimal elution conditions for affinity purification using streptavidin beads. As a result, we were unable to isolate and identify the target proteins. Nevertheless, the successful biotin labeling in living cells marks significant progress. Future efforts will focus on overcoming the elution challenges to isolate and identify Stra8-interacting proteins, enhancing our understanding of oogenesis and ovarian aging.

研究分野：生殖医学

キーワード：Stra8　卵新生　卵巣老化　不妊症　再生

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

（１）卵胞は卵子とホルモン産生細胞からなる卵巣組織で、女性としての生理機能や女性らしい容姿の形成・維持に寄与するなど重要な役割を担っている。卵胞の数は卵子数で決まるため、学説上、胎児期に形成された卵子数が卵巣機能の容量を決定し、その機能は備蓄卵子の劣化および消失によって失われる。そのため、抗がん治療や加齢に伴う卵巣機能の低下は不可避な現象であり、その機能再生は不可能であると考えられてきた。

（２）Tilly らのグループは、成体マウス卵巣で新たな卵子形成（卵新生）が起きていることを発見した（Johnson *et al.* Nature 2004）。申請者は同グループに参加し、１）抗がん剤や加齢が卵新生を阻害して卵巣老化を引き起こすこと（Johnson, **Niikura** *et al.* Cell 2005、Lee, **Niikura** *et al.* J Clin Oncol 2007、**Niikura** *et al.* Aging 2009）、そして２）卵新生を促す因子が成体マウス末梢血に存在することを明らかにしてきた（**Niikura** *et al.* Aging 2010）。これらの知見は、卵新生を利用した卵巣機能の維持・再生の可能性を示唆するものである。

２．研究の目的

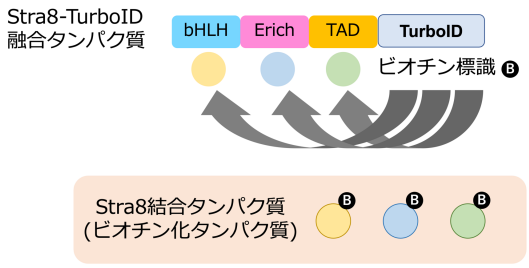
（１）卵子形成を司る転写因子 Stra8 の制御分子を同定し、卵新生の制御による卵巣老化・再生の誘導を試みる。

（２）上記目的を達成するために、Stra8 を含む転写開始複合体の構成分子を網羅的にビオチン標識するシステムの構築し、ストレプトアビジンカラムを用いたアフィニティー精製の系を立ち上げる。

３．研究の方法

（１）Stra8 の C 末端に大腸菌由来ビオチン化酵素 TurboID を融合させた Stra8-TurboID 融合タンパク質（以下、融合タンパク質）の発現ベクターを構築する。Stra8 の転写活性は生殖系 F9 細胞で強く認められることから、同細胞に融合タンパク質は発現させ、ビオチン添加により細胞内での in situ ビオチン標識を行う。TurboID は 10 nm 以内の距離に存在するタンパク質を非特異的にビオチン標識する活性を有することから、ビオチン標識されたタンパク質は Stra8 と相互作用しているタンパク質と考えられ、それらを Stra8 制御分子の候補として単離する。

TurboIDによるStra8結合タンパク質のビオチン化



（２）細胞抽出液中のビオチン標識タンパク質は、ストレプトアビジン磁気ビーズを用いたアフィニティー精製にて単離する。ビオチンとストレプトアビジンの結合は抗原抗体反応並みに強いため、遊離ビオチンを添加しても磁気ビーズからビオチン標識タンパク質を解離させ、単離することはできない。そのため、熱処理によりストレプトアビジンを変性させることで、ビオチン標識タンパク質を解離させる

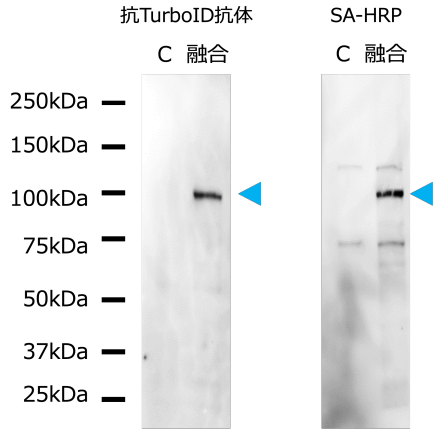
（３）ストレプトアビジン磁気ビーズから解離したビオチン標識タンパク質は SDS-PAGE により分離した後、PDVD 膜へ転写、ストレプトアビジン-西洋わさびペルオシキダーゼを結合させて、ECL による発光反応で検出した。ビオチン標識タンパク質の精製度は、上記の検出法によるバンドのパターンと、銀染色によるバンドのパターンを比較することで判断した。

４．研究成果

（１）Stra8-TurboID 融合タンパク質の発現誘導及びビオチン標識タンパク質群の検出

Stra8-TurboID 融合タンパク質を生殖系 F9 細胞に発現誘導させて（遺伝子導入 24 時間後）、ビオチン（終濃度 100 μM）を添加、60 分間インキュベーションして細胞内でビオチン化反応を行なった。その後、細胞抽出液を調整し SDS-PAGE で分離、PVDF へ転写した後、抗 TurboID 抗体を用いて融合タンパク質の発現を確認した（下図、左）。ビオチン標識タンパク質の検出には、ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ（SA-HRP）を用いた（下図、右）。その結果、自己ビオチン化によるものと思われるバンドに加えて（矢頭、青）、125 KDa と 70 kDa 付近に濃いバンドを検出した。これらのバンドは融合タンパク質を発現させていないコントロール群（ビオチン添加あり）でも認められたため、内在するビオチン化されたタンパク質であると推測された。さらに、上記以外のバンドも薄いながら検出できた。

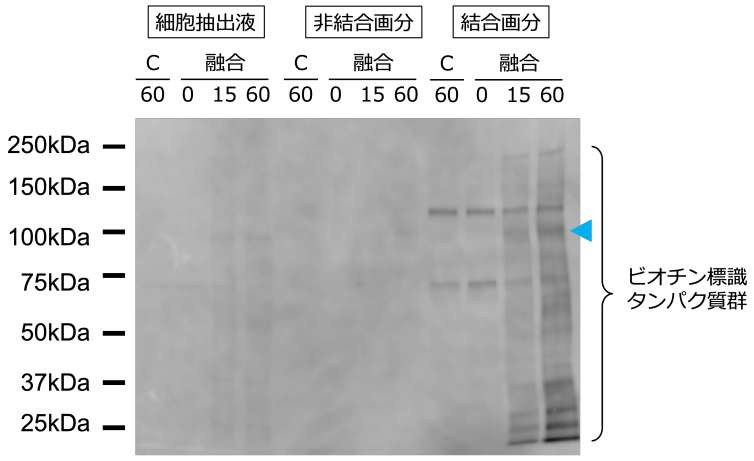
Stra8-TurboID融合タンパク質の検出



（２）ビオチン標識タンパク質群の濃縮、精製

ビオチン化反応を終えた細胞抽出液へ SA-磁気ビーズを加え、ビオチン標識タンパク質のアフィニティー濃縮・精製を行なった。その結果、ビーズ処理前の細胞抽出液ではビオチン標識タンパク質群のバンドが淡く検出されたが、ビーズ結合画分では内在ビオチン化タンパク質とともにバンドが濃く検出できた（SA-HRP を用いて）。ビーズ非結合画分ではいずれのバンドも認められなかったことから、細胞抽出液に含まれるビオチン標識タンパク質はビーズにより回収できたものと推測された。同一サンプルについて銀染色を行なったが、結合画分のレーン全体にスメアー状のバンドが無数に検出され、ビーズへ非特異的に細胞由来タンパク質が吸着していることが示唆された（データ不掲載）。界面活性剤や熱処理など洗浄条件を検討したが、非特異的吸着を抑える条件を見つけ出すことができなかった。目的タンパク質だけを溶出する条件を見つけ出し、Stra8 の制御分子の同定、卵新生制御による卵巣老化・再生の誘導へとエビデンスを蓄積したい。

ビオチン標識タンパク質群のアフィニティー精製



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