

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791803

研究課題名(和文)生殖細胞特異的に発現するエストロゲン受容体beta標的遺伝子Bnc1の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of estrogen receptor beta-targeting candidate gene Basonuclin1.

研究代表者

井原 基公 (IHARA, MOTOMASA)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50403506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞とkeratinocyte特異的に高発現するBasonuclin1(Bnc1)の遺伝子発現が、エストロゲン受容体beta(ERbeta)によって制御される可能性を見出した。Bnc1は卵母細胞の成熟過程において、これまで報告された局在とは異なることを見出した。また、Bnc1にはisoformが存在し、ミトコンドリアに局在する可能性を見出した。このisoformはSUM01ではなく、SUM02/3特異的にSUM0化されることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Basonuclin1 (Bnc1) gene is specifically expressed in germ cells and keratinocyte. We have identified the possibility of that Bnc1 gene expression is regulated by estrogen receptor beta. Our findings include: The localization of Bnc1 is slightly different from that of Bnc1 during early oocyte maturation; Bnc1 has another isoform and it localizes in cytoplasm; This isoform is specifically sumoylated with SUM02/3.

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：生殖 不妊

## 1. 研究開始当初の背景

不妊の原因は複合的であり、器質的な異常や染色体異常が認められない原因不明不妊症例が数多く存在する。現代社会において少子化や晩婚化に伴い不妊治療の意義はますます高まっているが、その治療法には未だ改善の余地があり、不妊のメカニズムに対する新たな知見や理解が必要である。そのうち卵の質を管理・制御することは生殖補助技術(ART)においても重要な課題の一つであり、また、卵母細胞における RNA やタンパク質の合成・貯蔵(卵成熟)機構は生物学的にも受精や初期胚形成の遂行に重要であるが、卵成熟が胚形成にどう関連しているか詳細なメカニズムは未だ不明である。

Basonuclin1(Bnc1)は Keratinocyte と生殖細胞特異的に発現しており、卵母細胞における Bnc1 の発現低下は初期胚の染色体分離異常を引き起こすことや分裂停止の原因になることが共同研究グループによって報告されている(Ma J. *et al.* 2006)。顆粒膜細胞と比較すると卵母細胞にはエストロゲン受容体 beta (ERbeta) がほとんど発現していないが、ERbeta ノックアウトマウスの成熟卵巣では卵胞数の減少が認められ、産仔数が減少することが知られており、その卵巣の表現系は Bnc1 ノックアウトマウスとよく似ているため、これらのシグナル伝達経路に関連性が存在する可能性があった。

## 2. 研究の目的

そこで、卵母細胞において Bnc1 が ERbeta 依存的に制御されているか否かを検討した。Bnc1 ノックダウンマウスの卵母細胞を用いた研究結果から Bnc1 は多数の重要な遺伝子の発現を制御していることが分かっており(Ma J, *et al.*, Development, 2006) (GEO Profile 登録済み) これまでの予備的研究成果をもとに、本研究では、生殖細胞・

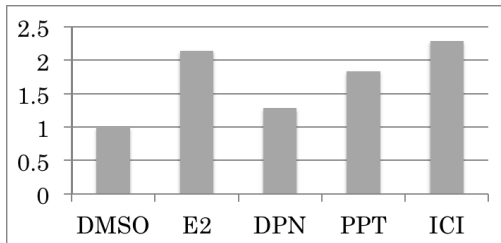
keratinocyte 特異的に発現する Bnc1 の機能に着目し、卵母細胞における Bnc1 の機能を分子レベルで解析する。すなわち、(1)マウス卵母細胞を用いて Bnc1 の遺伝子発現が ERbeta によって実際に制御されているか否かを解析し、エストロゲンシグナル異常の発生機序の一端について検討し、Bnc1 の異常が卵母細胞由来の不妊の原因になり得るか否かを検討する。また、卵胞期にエストロゲン分泌が低下する加齢因子が卵母細胞に与える影響は不明であり、(2)加齢が卵母細胞における Bnc1 の遺伝子発現レベルに影響を及ぼすか否かも検討する。さらに、タンパク質翻訳後修飾の制御破綻はさまざまな病因・病態に深く関与するが、Bnc1 の翻訳後修飾がどのように Bnc1 の機能を制御しているか不明である。そこで、(3)Bnc1 のタンパク質翻訳後修飾 SUMO (small ubiquitin related modifier)化に焦点を当て、Bnc1 による細胞機能の制御機構を分子レベルで明らかにする。

## 3. 研究の方法

Bnc1 にはタンパク質翻訳後修飾 SUMO 化の SUMO 化コンセンサス配列が4カ所も存在し、Bnc1 の機能はこれらの SUMO 化によって制御されることを示唆している。そこで、SUMO 化部位であると予想されるアミノ酸(リジン基)をアルギニン基に置換させた変異型 Bnc1 を作製し、*in vitro* で生化学的・分子生物学的に Bnc1 の SUMO 化部位を同定し、それらの細胞内局在や転写活性などに対する SUMO 化の影響を解析する。共同研究グループから譲渡された Bnc1 の遺伝子配列を鋳型にして、卵母細胞にマイクロインジェクションするためのプラスミドを作製し、mRNA を精製する。ヒト38~45歳に相当する60~70週齢マウスと、対照群として6~8週齢のマウスから卵母細胞を採取し、real time-PCR を施行する。

#### 4. 研究成果

(1) 内在性の Bnc1 を検出できる抗体を入手し、Day4, Day10, および 7 週相当の成熟卵母細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。これまで報告されている Bnc1 の局在とは若干異なり、Day4~Day10 では細胞質・核質と核小体にも局在したが、成熟卵母細胞では主に核質に局在していた。すなわち、卵母細胞の成熟過程において Bnc1 の作用が異なる可能性がある。(2) Day4 の卵母細胞を 10nM エストロゲン(E2)で培養したところ、Bnc1 遺伝子発現が増加した。また、ERalpha や ERbeta 特異的な作動薬を使用した場合も同様であった。一方、ERalpha と ERbeta 両方の阻害剤である ICI 182,780 を用いたところ、Bnc1 の遺伝子発現が増加したが、ICI 182,780 は GPER (G protein-coupled ER)の作動薬でもあり、Bnc1 はエストロゲンを介した GPER のシグナル伝達経路によっても制御されている可能性がある。



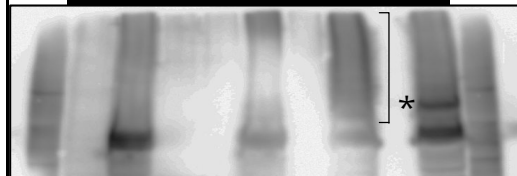
7 週相当と 60 週相当の卵母細胞において、Bnc1 の遺伝子発現に大きな差は認めなかった。(3) DBTSS (Database of Transcriptional Start Sites)を用いて Bnc1 mRNA の転写開始点を探索する際に、これまでその局在が報告されていない Bnc1 の isoform を見出した。(4) この isoform の mRNA は 5' UTR が非常に短く、転写開始点から 9 塩基で first ATG が始まる。転写開始点上流は GC リッチな配列が続くことから、DBTSS が不完全か、isoform の mRNA の発現制御が特殊である可能性が示唆された。

(5) この isoform の C 末に GFP を付けた mRNA を卵母細胞にマイクロインジェクションし

たところ、Bnc1 は細胞質に局在し、ミトコンドリア (MitoTracker) に共局在する可能性を見出した。(6) また、SUMO 化される可能性が高いリジンをアルギニンに置換した変異体の局在は wild type と同様であった。

(7) Western Blotting にて Bnc1 isoform が SUMO1 ではなく、SUMO2/3 によって特異的に SUMO 化された。また、SUMO 化の E3 リガーゼである PIAS4 によって SUMO 化が促進されることが明らかになった。

-	+	-	-	+	-	+		+	Bnc1
-	-	+	-	+	+	+		-	SUMO1
-	-	-	+	-	+	+		+	PIAS4
-	-	-	-	-	-	-		+	SUMO2



IB: anti-Bnc1

#### 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)

Ihara M, Meyer-Ficca ML, Leu NA, Rao S, Li F, Gregory BD, Zalenskaya IA, Schultz RM, and Meyer RG. Paternal poly(ADP-ribose) metabolism modulates retention of inheritable sperm histones and early embryonic gene expression. *PLoS Genet.* 2014 査読有 May 8; 10(5):e1004317. doi: 10.1371/journal.pgen.1004317.

Meyer-Ficca ML, Lonchar JD, Ihara M, Rader JJ, and Meyer RG. Alteration of poly(ADP-ribose) metabolism affects murine sperm nuclear architecture by impairing pericentric heterochromatin condensation. *Chromosoma.* 2013 査読

有 Aug; 122(4):319-335. doi:  
10.1007/s00412-013-0416-y.  
井原 基公、有馬 隆博  
活性酸素：生殖細胞と酸化ストレス  
医歯薬出版「医学のあゆみ」  
2013年11月30日 p851-855 査  
読無

〔学会発表〕(計5件)

井原基公, Mirella L. Meyer-Ficca,  
Julia D. Lonchar, Jessica J. Bader, 八  
重樫伸生, Ralph G. Meyer. ポリ(ADP-  
リボシル)化反応異常はヘテロクロマチ  
ンの凝縮障害によって精子の核構造に影響する.2013/9/7 第 61 回北日本産科婦  
人科学会学術講演会 旭川市

井原基公, Mirella L. Meyer-Ficca,  
Richard M. Schultz, Jessica J. Bader,  
菅原準一, 八重樫伸生, Ralph G. Meyer.  
精子形成期のポリ(ADP-リボシル)化反応  
は初期胚遺伝子発現制御に關与する.  
2012/11/9 第 57 回日本生殖医学会学術  
講演会 長崎市

井原基公・Hung Tseng・Richard M.  
Schultz. Basonuclin1 は卵母細胞・着床  
前期胚における ribosomal RNA variant  
の遺伝子発現制御に關与しない. 第 52  
回日本哺乳動物卵子学会学術集会  
2012/5/21 大田原市

井原基公, Mirella L. Meyer-Ficca,  
Julia D. Lonchar, 菅原純一, 八重樫伸  
生, Ralph G. Meyer. 精子におけるポリ  
(ADP リボース)化反応異常は初期胚に  
おける遺伝子発現に影響する.  
2011/12/9 第 56 回日本生殖医学会学術  
講演会 横浜市

井原基公, Mirella L. Meyer-Ficca,  
Julia Lonchar, Kenneth J. McLaughlin,  
菅原準一, 八重樫伸生, Richard M.  
Schultz, and Ralph G. Meyer. 精子にお

けるポリ(ADP-リボ-ス)化反応異常は初  
期胚における遺伝子発現に影響する.  
2011/9/25 第 59 回北日本産科婦人科学会  
学術講演会 秋田市

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

井原 基公 (IHARA, MOTOMASA)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50403506