

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658232

研究課題名(和文) 哺乳類卵の減数分裂制御に対するLTRトランスポゾンの関与の検討

研究課題名(英文) Analyses of the involvement of LTR-transposon in meiotic regulation of mammalian oocytes.

研究代表者

内藤 邦彦(Naito, Kunihiko)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：20188858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：寄生遺伝子と考えられているLTR-トランスポゾン(Te)が哺乳類卵の減数分裂制御に寄与するかを、ブタ卵を用いLTR-Te抑制に関与するpiRNA合成系への関与が精巣で示されているMaelstrom(MAEL)を用いて調べた。ブタMAELをクローニングし、ブタ卵とブタ精巣のMAELは分子量が異なることがわかった。ブタ卵の減数分裂を通してmRNAは存在し、タンパク質は減数分裂の進行に伴い減少した。MAELの発現制御により機能解析を行ったが、紡錘体微小管に変化は無く減数分裂の進行は影響を受けていなかった。以上より、LTR-Teの哺乳類卵の減数分裂制御への寄与を示すには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Possible involvement of LTR-transposable elements (Te), which are thought to be parasite genes in mammalian genome, in meiotic regulation of mammalian oocytes were analyzed using porcine oocytes and Maelstrom (MAEL), which was shown in testis to be involved in the biosynthesis of piRNA, an inhibitor of LTR-Te. Porcine MAEL cDNA was cloned from porcine oocytes and found that the molecular weights of porcine MAEL were different between oocyte and testis. In porcine oocytes, MAEL mRNA was present throughout meiosis and MAEL protein was decreased according with the progression of meiosis. MAEL functions on meiotic maturation were analyzed by artificial expression control of MAEL protein using MAEL mRNA or antisense RNA injection into oocytes. However, there were no effects on microtubule organization and meiotic progression during oocyte maturation. Therefore, I cannot provide the evidence showing the involvement of MAEL, and subsequently LTR-Te, in meiotic regulation of porcine oocytes.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：応用動物 畜産学 卵成熟 レトロトランスポゾン MAEL

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類のゲノム中には宿主細胞に感染してゲノムに侵入し、そのまま宿主ゲノムと一体化して居座っているレトロウイルスが全ゲノムの約1割も存在することが知られ、これを内在性レトロウイルス (Endogenous retroviral sequence: ERV) と呼ぶ。ERVの多くは失活しているものの一部は未だ活性を維持しており、自身を増殖させ宿主ゲノムの他の領域に侵入する寄生遺伝子 (トランスポゾン: Te) として活動を続けている。ERVに由来する Te は特に LTR-Te と呼ばれる。

近年、哺乳類ゲノムには LTR-Te も含め Te が多量 (全ゲノムの 45% 以上) に存在することが明らかとなり、これらを抑制する機構の研究が盛んに行われてきている。一方、Te は我々に悪影響を与えるだけでなく、例えば Te の転移増殖に伴い宿主のゲノムも転移増幅され (レトロ転移と呼ばれる) これが偽遺伝子を蓄積して進化の原動力となったと考えられている。また、Te が持つ配列が我々の有用な遺伝子になっているものもあり、例えばヒトの遺伝子の 4% は Te 由来であり、哺乳類の胎盤遺伝子の多くは LTR-Te 由来と考えられている。このような背景を考慮すると哺乳類が自身の生命活動に Te を生理的に利用している可能性も考えられる。

生殖細胞において LTR-Te の制御には、膜を持たない電子的に密な構造である germ granule が深く関連する。マウス精子形成過程の germ granule は、主に生殖細胞での LTR-Te 発現抑制に機能する PIWI interacting RNA (piRNA) の産生に関連するタンパク質で構成されている。Germ granule の構成因子変異体のオスでは piRNA 生成が行えないため、多くの場合で LTR-Te 発現抑制が異常になり、精子形成の減数分裂が停止する。このような germ granule 構成因子に Maelstrom (Mael) がある。ショウジョウバエ mael 変異体は、オスとメス共に配偶子形成に異常を示す。オスでは生殖幹細胞の分化に異常が生じ、メスでは卵母細胞の極性決定に重要な mRNA の局在が異常になり、前後軸が異常な卵母細胞が形成される。Mael はチューブリンの重合に機能し、卵母細胞内の微小管形成に必要であることが知られている。一方 Mael のマウス相同遺伝子は精巢で見つかり、精子形成に焦点を当てて研究された。マウス Mael 変異体オスでは、LTR-Te の蓄積、精母細胞での減数分裂停止が見られ、Mael が piRNA 生成に関連する因子であることを強く示唆しているため、マウスの精子形成過程の Mael の働きは、主に piRNA 関連であると考えられている。一方、メスでの Mael の機能や卵母細胞に Mael が存在するかなどは報告されておらず、メス変異体の妊性についての記述もない。一般的にマウスの卵子形成過程は精子形成過程に比べ、変異や異常に耐性を持ち、多少の変異であれば、そのまま形成過程を進める傾向が知られてい

が、メスが妊性を示す場合でも、異数体などの染色体異常を起こす卵母細胞の割合が増えることが報告されている。したがって Mael 変異体メスでは何等かの異常を持つ卵母細胞の割合が増える可能性がある。

## 2. 研究の目的

そこで、もし哺乳類の卵母細胞で Mael が機能するならば、Mael 発現が低下するとショウジョウバエ卵子形成過程で報告された微小管形成の異常や、マウス精子形成過程で観察された LTR-Te 発現抑制の異常により、紡錘体の形成異常や減数分裂停止が起こり、卵母細胞の減数分裂過程にあたる卵成熟に変化が生ずると考えた。

本研究では、LTR-Te 量に関連すると考えられる MAEL が哺乳類の卵母細胞に存在するのか、存在するならば卵成熟の進行に伴い MAEL タンパク質発現はどう変化するのか、卵母細胞内で MAEL は LTR-Te の抑制に關与する germ granule に局在するのか、MAEL の発現阻害や過剰発現は卵成熟進行に影響を与えるのか、を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

材料には、卵成熟での遺伝子発現やその機構に関する知見が多いブタ卵母細胞を用いた。始めに、ブタ卵母細胞から MAEL 配列をクローニングすることで MAEL が存在するかを確かめた。次に、卵母細胞を培養し、MAEL タンパク質発現量の経時的変化をウェスタンブロットで調べた。また、ウェスタンブロットで検出できた MAEL のバンドの数やシフトアップなどから、MAEL の転写や翻訳後の修飾を確認した。MAEL アンチセンス RNA (asRNA) および 5' 側に FLAG を持つ FLAG-MAEL mRNA を卵母細胞に注入することで、MAEL 発現阻害と過剰発現を行い、その卵母細胞を培養し、核相観察から減数分裂の進行への影響、および染色体の蛍光色素染色とチューブリンの免疫染色により染色体の位置や紡錘体に異常が起きているかを観察した。また、FLAG 抗体で免疫染色することで、FLAG-MAEL の局在も観察し、germ granule との関連も解析した。

## 4. 研究成果

### (1) ブタ MAEL のクローニング

ブタ卵母細胞の total RNA より PCR クローニングした結果、主に精巢や精母細胞で発現していると考えられていた MAEL の mRNA がブタ卵母細胞に存在することがわかった。クローニングで得られた pMAEL は、遺伝子バンクに登録されている EF486859 の 710 番目 C が G になり、それにより T237 が R237 になっていた。710 番目 G への変化は、クローニングの際に塩基配列を確認した計 4 つのクローン全てに見られたことから、クローニングで起きた変異では無いと考え

られる。今回クローニングした pMAEL と比較したマウス、ヒト、およびショウジョウバエの MAEL は、いずれも 237 番目に相当するアミノ酸は Arg であったことから、ブタ MAEL の 710 番目の塩基は G の可能性が高いと考えられる。

### (2) ブタ卵母細胞の減数分裂過程における MAEL の存在確認

RT-PCR によりブタ卵の減数分裂を通して MAEL の mRNA は存在した(図 1)。抗マウス Mael 抗体を用いたウェスタンブロットでは、卵母細胞でバンドが検出でき、減数分裂に伴い発現量が低下した(図 2)。培養による減数分裂の進行は RSK シフトアップと Cyclin B 発現から、検体の量は CDC2 が一定であることから、また、このバンドが MAEL であることは、MAEL 発現阻害卵(後述)で発現が消失することから確認した。ブタ卵母細胞で検出できた MAEL は、マウス精巣やブタ精巣のものと分子量が異なっていたため、ブタの MAEL は選択的スプライシングを受ける可能性がある。ブタ卵母細胞の MAEL は培養 0 時間から 24 時間の減数分裂再開に伴いシフトアップが見られ、(図 2)。これは減数分裂再開により活性化する多くのキナーゼにより、リン酸化を受けるためと考えられた。

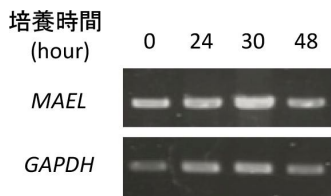


図 1. ブタ卵の減数分裂過程における MAEL mRNA の存在

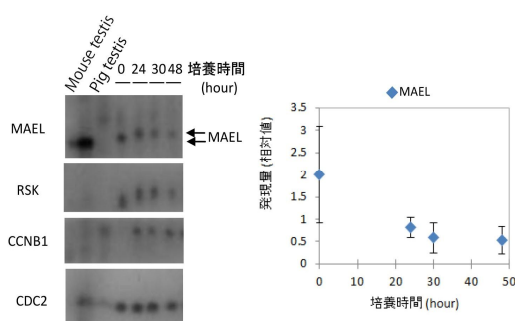


図 2. ブタ卵の減数分裂過程における MAEL タンパク質の存在

### (3) MAEL のブタ卵母細胞の減数分裂の進行に及ぼす効果

MAEL のアンチセンス(as)RNA をブタ未成熟卵細胞質に注入し、MAEL 発現阻害を試みた。減数分裂停止した状態で 48 時間維持したことによる内在性 MAEL の減少、および asRNA 注入が MAEL 発現にのみ影響したことをウェスタンブロットで確認した(図 3)。

その後、減数分裂の抑制を解除し卵母細胞の核相を観察し、GVBD 率および MII 到達率を計算した。しかし、無注入卵と MAEL 発現阻害卵で GVBD 率および MII 到達率に差はなかった(図 4)。

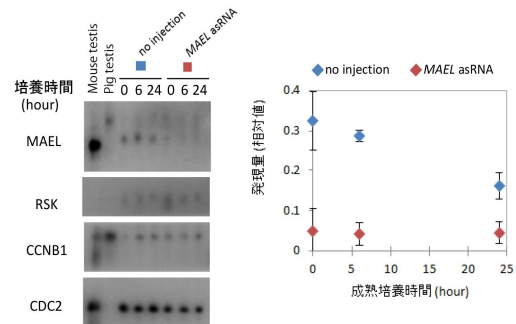


図 3. MAEL アンチセンス RNA の効果確認

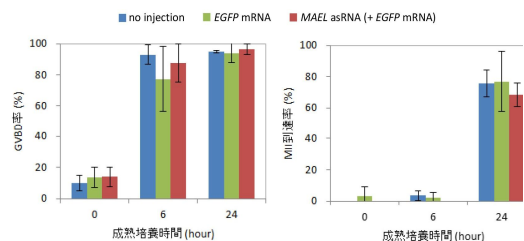


図 4. ブタ卵の減数分裂に対する MAEL 発現抑制の影響

MAEL 過剰発現を行うため Flag 標識が付いた FLAG-MAEL の mRNA を注入した。24 時間成熟培養した注入卵を FLAG 抗体と Mael 抗体を用いてウェスタンブロットし FLAG-MAEL の発現を確認した。また、この操作が MAEL 発現以外に影響を与えないことを、RSK、Cyclin B1、CDC2 発現により確かめた(図 5)。培養 10 時間では、無注入卵と MAEL 過剰発現卵のいずれにも GVBD を起こしている卵母細胞はなかった。培養 18 時間になると、無注入卵で平均約 4 割の卵母細胞が GVBD を起こし、MAEL 過剰発現卵の平均約 7 割が GVBD を起こしていたが、有意な差はなかった。MII 到達率についても、無注入卵と MAEL 過剰発現卵とで有意な差はなかった(図 6)。

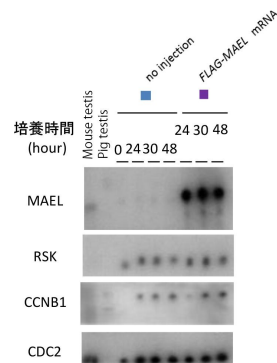


図 5. FLAG-MAEL mRNA の発現確認

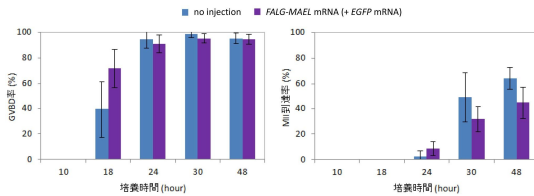


図 6. ブタ卵の減数分裂に対する MAEL 過剰発現の影響

(4) MAEL のブタ卵母細胞の微小管形成に及ぼす効果

MAEL の微小管形成への影響を見るために、無注入卵と MAEL 過剰発現卵を成熟培養 24 時間後の MI 期に蛍光色素染色による染色体と免疫染色による  $\alpha$ -チューブリンの状態を観察した。その結果、核やチューブリンの状態などに違いはなく、観察できた範囲での変化はなかった(図 7)。

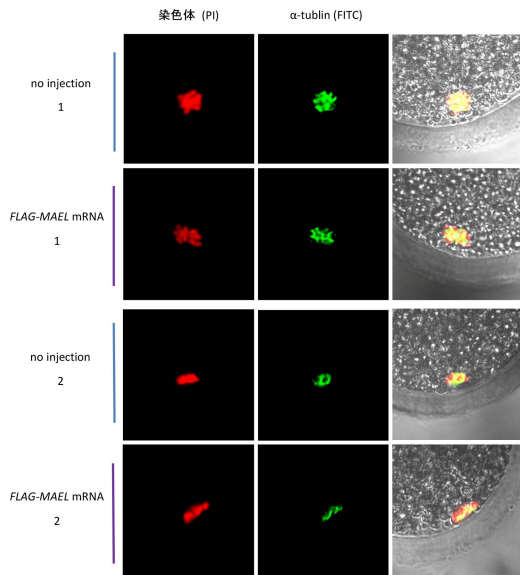


図 7. MAEL のブタ卵母細胞の微小管形成に対する影響

(5) ブタ卵母細胞内の MAEL の局在

卵母細胞が GV 期にあたる成熟培養 6 時間と、MII 期にあたる 24 時間で、FLAG-MAEL mRNA 注入卵の FLAG-MAEL の局在を FLAG 抗体で確認した。GV 期の卵母細胞では FLAG-MAEL が細胞質全体に広がっている場合と、細胞膜に存在している場合の 2 通りが観察できた(図 8A)。MI 期の卵母細胞では FLAG-MAEL は卵母細胞全体に広がって存在しており、紡錘体への FLAG-MAEL の局在は観察されなかった(図 8B)。このことは MAEL がチューブリンの重合に機能するというショウジョウバエでの報告とは異なり、(4) に記したとおり微小管形成に機能していないという結果と一致する。また、MAEL は LTR-Te の抑制に関与する germ granule の構成因子とされるが、ブタ卵では germ

granule への局在も示されず、LTR-Te の発現との関連も支持されなかった。

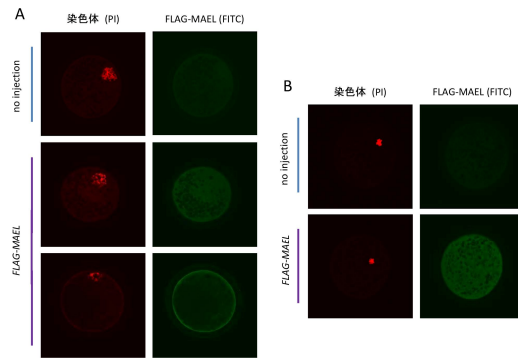


図 8. ブタ卵母細胞における MAEL の局在

以上のことより、ブタ卵母細胞での MAEL の存在および機能を検討した本研究から、ブタ卵母細胞に MAEL は存在し、卵成熟の進行に伴い発現が低下することがわかった。また、MAEL の発現阻害および過剰発現は卵成熟に影響を与えず、MAEL が卵母細胞内で染色体周辺や granule 状に局在しないことが明らかになった。そのため、MAEL は卵成熟過程で機能していない可能性が高く、ショウジョウバエの卵子形成で知られているような微小管形成と関連する機構や、マウスの精子形成で研究されている LTR-Te 発現抑制に関与する機能に働く可能性が低いことが示唆される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 邦彦 (Naito Kunihiko)

東京大学・農学生命科学研究科・教授  
研究者番号：20188858

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者