

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780270

研究課題名(和文)核膜孔構成因子TMEM48が担う核内ゲノムダイナミクスの制御機構の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of nucleoporin TMEM48 in the genome dynamics

研究代表者

秋山 耕陽(Akiyama, Kouyou)

岡山大学・学内共同利用施設等・助教

研究者番号：20515142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：核膜孔は、核の形態維持や核-細胞質間の物質輸送に寄与する真核生物に必須の構造であるが、配偶子形成における機能は全く解っていない。本研究では、TMEM48の機能を明らかにすることで配偶子形成過程における核膜孔の役割の解明を目指した。その結果、TMEM48が欠損しても人為的に誘導された過度なDNA損傷や減数分裂過程で生じる内在性のDNA損傷に対してSUMO化関連因子を介したDNA損傷修復が機能していることが明らかになった。一方で、TMEM48がこれまで知られていない分子機構によるDNA損傷修復機構に寄与していることが推測された。

研究成果の概要(英文)：The function of the nucleoporin during gametogenesis remains unknown, although the nucleoporin has an important role in various biological natures, such as the nucleo-cytoplasmic transport and nuclear morphology assembly, in vitro. In this study, it is proposed to elucidate the role of the nucleoporin during gametogenesis. As a results, the examinations indicated that the induced-DNA damages are repaired in MEFs without TMEM48 and the SOMOylation systems may be functional in the sks mice.

研究分野：実験動物

キーワード：疾患モデル動物 生殖生物学 遺伝学

1. 研究開始当初の背景

核膜孔は、約 30 種の核膜孔構成因子によって構築される細胞質と核内部をつなぐ細胞小器官である。これまで核膜孔は、核と細胞質間の物質輸送に特化した役割を担っていると考えられてきた。近年、必ずしもそれだけでなく、核分裂後の核膜の再構築もしくは核の形態に維持、そして細胞の発生や細胞周期といった遺伝子の転写を直接調節している核膜孔構成因子の存在も明らかにされている。また、SUMO によるタンパク質修飾が核膜孔構成因子を中心とした複合体によって行われることも示されている。すなわちこれらの報告は、核膜孔が単純な細胞内構造物ではなく、遺伝子の発現、細胞周期そして DNA 修復をはじめとする生体機能に重要な分子機構に深く関与していることを示している。特に SUMO によるタンパク修飾は、タンパク質の核への局在化やクロマチン構造制御など細胞の恒常性の維持に重要である。SUMO は、DNA 二本鎖切断(DSBs)などの DNA 修復タンパク質の修飾にも重要な役割を果たしている。

申請者は、核膜孔構成因子 TMEM48 が欠損した *sk*s マウスでは、精子形成が相同染色体の対合に異常が生じることで減数分裂第一分裂前期パキテン期以降の発生が停止するため、無精子症に至る、そして *sk*s マウスのパキテン期精母細胞と胎仔線維芽細胞(MEFs)では、高頻度で核に形態異常が生じることを見出している。このことは、TMEM48 が他の核膜孔構成因子と同様に核の形態維持に不可欠であることを示している。さらに、核の形態に異常が生じた細胞にはアポトーシスが誘導されていないにもかかわらず、TMEM48 が欠損した MEFs の増殖率が著しく低いことがわかった。細胞の増殖過程にはいくつかのチェックポイントがあり、それを通過するまで一時的に細胞周期が停止し、チェックポイントを通過すると再び細胞周期が

進行する。代表的なチェックポイントに DNA 修復があるが、DNA 修復機構の脆弱化が起こると、チェックポイント通過の遅延を導くため細胞周期が延長し、細胞の増殖率の低下を招く。*sk*s マウスの精子形成に異常が生じる第一分裂前期は、DNA 損傷を修復することで遺伝子組換えを行う時期であり、DNA 修復機構が脆弱化すると減数分裂の異常を導くことが知られている。さらに、*sk*s マウスの雌は受精能をもつ卵子を形成できるが、その卵子は受精後、2 細胞期以降に発生しない。初期胚では DNA 修復機構が活発に働いていることから、*sk*s マウスの卵子では DNA 修復機構に異常が生じている可能性がある。これらのことは、TMEM48 が細胞周期もしくは DNA 修復機構の制御に寄与している可能性があり、TMEM48 の機能を解明することで核膜孔構成因子が担う全く新しい制御機構を解明することに繋がると考えた。

2. 研究の目的

配偶子は、多くの遺伝子によって厳密に制御された分子機構によって形成されるが、配偶子形成における核膜孔の役割は全く未知である。それゆえ、TMEM48 の機能を明確することは、配偶子形成における全く新しい分子機構の一端を明らかにできることを意味する。そこで本研究では、TMEM48 を欠損する *sk*s マウスを用いることで、胎仔の発生と配偶子形成における細胞周期や DNA 修復機構の制御における核膜孔構成因子 TMEM48 の役割を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) TMEM48 の細胞周期における機能の解析

- ①. *sk*s マウスを交配させ、胎齢 14.5 日の胎仔を用いて各遺伝子型の胎仔線維芽細胞(MEFs)を単離した。単離した MEFs は、10% Fetal Bovine Serum を含む DMEM 培

地を基礎培地とし、37°C、5%二酸化炭素存在下で培養した。次に、MEFsをダブルチミジブロック法により細胞周期の同調を試みた。まず、対数増殖期にある細胞に2mMのチミジンを含む培地で17時間チミジンを暴露させた。その後、細胞を新鮮な基礎培地で洗浄することでチミジンを除去した。さらに基礎培地での培養を継続し、8時間後に再度2mMのチミジンを含む培地で15時間の処理を行い、再び細胞を新鮮な基礎培地で洗浄することでチミジンによる細胞分裂の抑制を解除した。これらの処理を施した各遺伝子型の細胞を4時間おきに4%PFAにて固定し、TMEM48および細胞周期因子に対する抗体を用いた免疫蛍光染色を行うとともにDAPIで核染色により可視化し、蛍光顕微鏡で観察した。

また、2回目のチミジン処理を終え、細胞分裂の抑制解除後、基礎培地で8時間培養した細胞を10ng/mlのコルセミドを含む基礎培地で2時間培養した。その後、染色体標本を作成することで同調培養の成否を確認した。

- ②. 株化培養細胞としてNIH3T3を用いて *Tmem48* に対する siRNA によって TMEM48 をノックダウンしたのち、(1) - ①と同様の処理を行うことで同調培養することを試みた。まず、*Tmem48* のノックダウンの条件検討を行った。*Tmem48* に対する3種のsiRNAプローブについて最終濃度を0、25、50nMおよび100nMでトランスフェクションし、トランスフェクション後24、48、72および96時間の時点で *Tmem48* の発現を抑制できているかウェスタンブロットにより調べた。
 - (2) MEFsにおけるDNA修復の解析
 - ①. (1) - ①の方法に基づいて各遺伝子型のMEFsを準備した。次に、対数増殖期にある細胞にマイトマイシンC (MMC) が

0、0.25および1.0 μ g/mlとなるように添加した培地で18時間培養した。細胞を新鮮な基礎培地で洗浄することで培地中のMMCを除去し、MMC処理0時間後とした。さらに、MMC処理0時間後の各遺伝子型のMEFsを基礎培地で48時間培養することでDNA損傷修復を誘導した。MMC処理後0時間および16時間後のMEFsは、4%PFAにて固定したのち、DNA損傷のマーカートンパク質である γ -H2AXに対する抗体を用いた免疫蛍光染色を行うとともにDAPIで核染色により可視化し、蛍光顕微鏡で観察した。

- (3) 精子形成におけるDNA修復機構の解析
TMEM48を欠損したマウスの精子形成過程においてDNA損傷修復に異常が生じているかを以下の方法で調べた。各遺伝子型の *sk*s マウスの精巣を8-10週齢の時点で採取し、ブアン固定液、ザンボニ固定液もしくはメタカン固定液により固定し、パファフィン包埋後、薄切することで組織標本とした。準備した組織標本についてDSBsのマーカートンパク質である γ -H2AXとSUMO化関連因子であるSOMO1、UBC9そしてRanBP2に対する抗体を用いた免疫蛍光染色を行うとともにDAPIで核染色により可視化し、蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

- (1) TMEM48の細胞周期における機能の解析
 - ①. 各遺伝子型の胎仔より胎仔線維芽細胞を初代培養し、ダブルチミジブロック法により同調培養を試みたところ、いずれの遺伝子型についても細胞周期の同調率が悪く、細胞周期におけるTMEM48の発現パターンを特定することが困難であった。一方で、M期の細胞の出現頻度には各遺伝子型間で差異はなく、TMEM48の発現の有無によって細胞周期の特定の時

期に遅延が生じる可能性が低いことが示唆された

- ②. 初代培養細胞を用いた同調培養は成功率が低いことが知られていることから、株化培養細胞であるNIH3T3を用いて同様の実験を試みた。まず、NIH3T3で発現するTMEM48をsiRNAによってノックダウンすることを試みたところ、いずれの時点においても完全に細胞が死滅してしまう、もしくはTMEM48の発現を抑制することができなかった。トランスフェクション試薬の使用量を変化させる等、条件を精査したが適切な条件を見出すことができなかった。

(2) MEFsにおけるDNA修復の解析

TMEM48を欠損した胎仔線維芽細胞ではMMCが0、0.25および1.0 μ g/mlのいずれの濃度であっても γ -H2AXにより示されるDNA損傷頻度とそれらが修復される推移が正常個体と同様であり、MMCによって誘起されたDNA損傷が正常に修復されていることが強く示唆された。

- (3) 精子形成におけるDNA修復機構の解析
各遺伝子型の成体の精巣組織標本を作成し、 γ -H2AXの局在をDNA損傷の指標としてSUMO化関連因子であるSOMO1、UBC9そしてRanBP2の発現パターンについて免疫蛍光染色により調べたところ、いずれのタンパク質の局在に差異はないことが明らかになった。特に、*sks*マウスの精子形成過程において異常が生じる減数分裂第一分裂前期パキテン期の生殖細胞においてもSUMO化関連因子が異所に局在する等の異常が観察されなかったことから、TMEM48が欠損してもSUMO化関連因子によるDNA損傷修復機構に影響がない、もしくは影響が小さいことが強く示唆され、TMEM48がこれまで知られていない分子機構によるDNA損傷修復機構に寄与していることが推測された。

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 5件)

- ①. Yasuhiro Fujiwara, Hirokazu Matsumoto, **Kouyou Akiyama**, Anuj Srivastava, Mizuho Chikushi, Takehito Tsuji, Mary Ann Handel, and Tetsuo Kunieda. An ENU-induced mutation in the mouse Rnf212 gene is associated with male meiotic failure and infertility. *Reproduction*. 149巻 67-74ページ 2015年 査読あり DOI:10.1530/REP-14-0122
- ②. Maryam Khalaj, Abdolrahim Abbasi, Hiroshi Yamanishi, **Kouyou Akiyama**, Shuso Wakitani, Sotaro Kikuchi, Michiko Hirose Misako Yuzuriha, Masaki Magari, Heba A. Degheidy, Kuniya Abe, Atsuo Ogura, Hiroshi Hashimoto, Tetsuo Kunieda. A missense mutation in Rev7 disrupts formation of Pol ζ , impairing mouse development and repair of genotoxic-agent-induced DNA lesions. *The Journal of biological chemistry*. 289巻6号 3811-3824ページ 2014年 査読有り DOI:10.1074/jbc.M113.514752.
- ③. **Kouyou Akiyama**, Kentaro Katayama, Takehito Tsuji, Tetsuo Kunieda. Characterization of skeletal fusion with sterility (*sks*) mouse showing axial skeleton abnormalities caused by defects of embryonic skeletal development. *Experimental Animals*. 63巻1号 11-19ページ 2014年. 査読有り https://www.jstage.jst.go.jp/article/expanim/63/1/63_13-0025/_pdf
- ④. **Kouyou Akiyama**, Junko Noguchi, Michiko Hirose, Shimpei Kajita, Kentaro Katayama, Maryam Khalaj, Takehito Tsuji,

Heather Fairfield, Candice Byers, Laura Reinholdt, Atsuo Ogura, and Tetsuo Kunieda.

A mutation in the nuclear pore complex gene Tmem48 causes gametogenesis defects in skeletal fusions with sterility (sks) mice. The Journal of biological chemistry. 288巻44号. 31830-31841ページ 2013年. 査読有り

DOI:10.1074/jbc.M113.492306.

- ⑤. 梶田晋平、秋山耕陽、辻岳人、国枝哲夫. 酵母ツーハイブリッド法を用いた TMEM48 と結合する精巣タンパク質のスクリーニング. The Journal of Animal Genetics. 41巻. 77-86ページ. 2013年. 査読有り

https://www.jstage.jst.go.jp/article/abgri/41/2/41_77/_pdf

[学会発表] (計 1件)

- ①. **Kouyou Akiyama**, Shimpei Kajita,, Junko Noguchi, Takehito Tsuji, Tetsuo Kunieda. Mutation in a Nucleoporin, Tmem48, gene Causes Morphological Abnormalities of Nuclear. Envelope in Germ Cell of Mouse. The 58th/60th NIBB Conference. 2012年07月17日～21日. 愛知県岡崎市 岡崎カンファレンスセンター

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 耕陽 (AKIYAMA KOYO)
岡山大学・自然生命科学研究支援センター・特別契約職員 (助教)

研究者番号 : 20515142

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者