

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650031

研究課題名(和文)胎盤特異的なプロテインキナーゼNrKがもたらす分娩発来機序の解明

研究課題名(英文)Molecular physiology of labor induction via placental protein kinase NrK

研究代表者

傳田 公紀(Denda, Kimitoshi)

東京工業大学・生命理工学研究科・助教

研究者番号：50212064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：X染色体にコードされ、MAPキナーゼ類似構造をもつ新奇なプロテインキナーゼNrK(Nik-related kinase)の遺伝子欠損マウスの作製と解析を行い、胎盤組織の過形成を伴う分娩不全が生ずることより、NrKは、哺乳動物の周産期、殊に分娩誘発に重要な役割を果たすことを明らかにした。

分娩発来時におけるNrKの生理的意義を解明するため、遺伝子欠損マウスの分子生理学的解析ならびにそのリン酸化基質を含む相互作用因子の探索を行った。現在、NrKが欠損したマウスにおける表現型を齎すと考えられる原因遺伝子が複数同定されてきており、これらのタンパク因子が直接NrKとどのように関与するのか解析中である。

研究成果の概要(英文)：NrK (Nik-related kinase) encoded in the X chromosome is a physiologically mysterious Ser/Thr protein kinase, which belongs to the germinal center kinase family. On a whole-body level in mice, disruption of the nrk gene resulted in the placental overgrowth, suggesting that NrK acts as a regulator of cell proliferation in the organ. It has also observed that the nrk-null fetuses influence the pregnant dam to be delay of labor.

To shed light on the molecular mechanisms lying behind the nrk-null phenotypes, we isolated a series of NrK-binding proteins by using two-hybrid analysis and co-immunoprecipitation. In addition, proteomics analysis against the nrk gene disrupted placenta were performed using the high performance two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. We identified several proteins whose expression levels were varied significantly. Our research how NrK acts as a device for controlling labor induction will clarify the complexities in the process of pregnancy and labor.

研究分野：生化学・細胞生物学・分子生理学

キーワード：Ser/Thrキナーゼ 胎盤 妊娠 分娩不全 遺伝子ノックアウト

1. 研究開始当初の背景

Nrk は, MAP キナーゼと類似した構造をもち, germinal center kinase ファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼである。ヒト培養細胞を用いた解析より, Nrk が MAP キナーゼ経路の活性化やアクチン細胞骨格制御に関与する知見が報告され, Nrk の生体内における機能に関心が深まった。そこで応募者は, Nrk の生理的意義を明らかにするため, 遺伝子ノックアウトマウスの作製と解析を行い, 以下の顕著な表現型を見出した。

(1) 胎盤組織内の異常な細胞増殖: 胎児における Nrk 欠損により, 胎盤の海綿状栄養膜細胞(スポンジオトロホプラスト, 胎児由来)が過増殖し, 胎盤の過形成を引き起こす。Nrk は, 受精後 12 日目以降に胎盤の海綿状栄養膜細胞に限局して発現(mRNA およびタンパクレベルで確認)しており, 海綿状栄養膜細胞における Nrk 欠損が胎盤過形成の原因であることが示された。

(2) 分娩不全: Nrk 欠損マウスを野生型マウスと交配した場合(胎児は Nrk を発現), Nrk 欠損は正常に分娩する。すなわち, 母体の Nrk は分娩に不要である。しかし Nrk 欠損を Nrk 欠損と交配した場合(胎児は Nrk 欠損), 母体の分娩不全をきたす。偽妊娠の野生型に Nrk 欠損胚(胚盤胞)を移植した時も, 母体の分娩不全がおきる。したがって, 胎児(胎盤を含む)の Nrk が母体の分娩に必須であることが示された。

上記の表現型の変調からみて, 胎児が母体に向けて何らかの分娩発来シグナルを発しており, Nrk がこのシグナル発信に不可欠な役割を担っていることがわかる。胎児と母体を結ぶ胎盤に Nrk 欠損を原因とする形態異常が認められることは, このシグナルが胎盤から発令されることを示唆するものである。

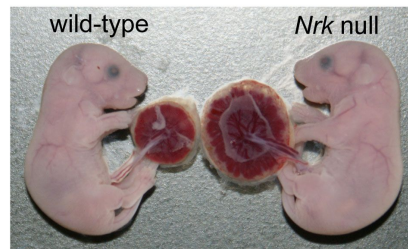
2. 研究の目的

上記の我々が知りえた結果に基づき, 本研究では胎児(胎盤)による分娩誘発の分子機構の解析を行う。まず, (1) Nrk 欠損の胎児(胎盤)をもつ妊娠マウスにおいて, 母体に由来するこれまで報告されている分娩発来の仕掛けに異常が認められるか否かが調べ, Nrk の関与する分娩発来が既知のメカニズムとリンクするのか, それとも独立した系なのか明らかにする。次に, 胎盤において, (2) Nrk と相互作用する結合因子の同定と機能解析, (3) Nrk がリン酸化する基質タンパク質の同定, (4) Nrk が与えるシグナル伝達下流で誘導される標的遺伝子の探索を行い, 分娩の誘発に至る Nrk のシグナル伝達経路を解明する。

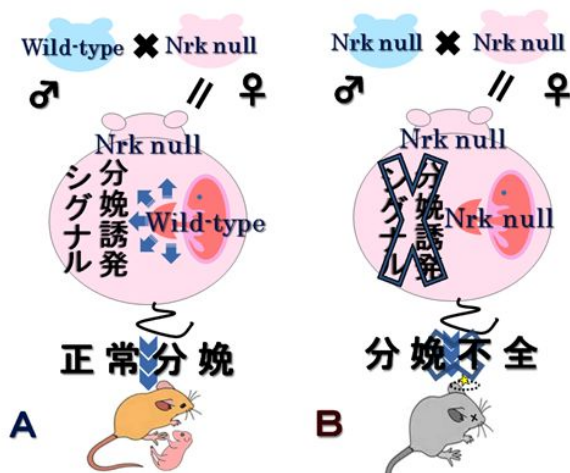
3. 研究の方法

まず, Nrk による分娩誘発機構と母体由来の既知の分娩誘発機構の関連を調べるため, (1) Nrk

欠損胎児を妊娠したマウスにおいて, 母体由来の分娩誘発因子のレベルが正常か, また母体による分娩誘発機構の人為的活性化により分娩が正常に回復するか調べた。

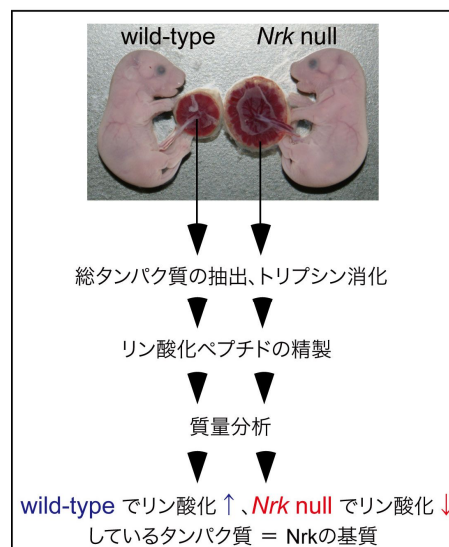


Nrk欠損マウス胎児の胎盤の過形成



Nrk欠損による胎児由来分娩誘発シグナルの喪失

次に, 胎盤において分娩誘発を引き起こす Nrk の下流シグナル伝達経路を分子レベルで解析するため, (2) 胎盤で Nrk と相互作用するタンパク質を酵母 two-hybrid 法および GST プルダウン法で探索した。さらに, Nrk 欠損胎盤における (3) タンパク質の網羅的プロテオーム解析, ならびに (4) リン酸化プロテオミクスを行い, 胎盤で Nrk がリン酸化する基質タンパク質とその下流で発現誘導されるタンパク因子を同定した(下図)。



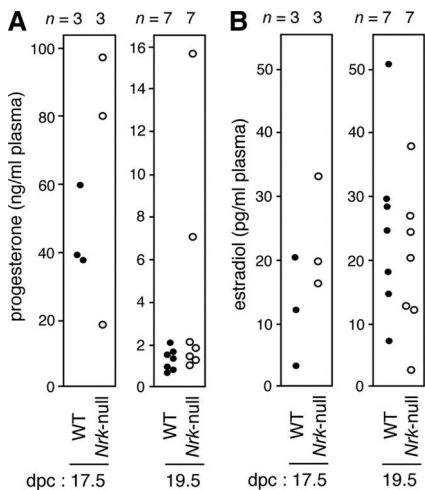
Nrk欠損胎盤のリン酸化プロテオーム

4. 研究成果

Nrk は、MAP キナーゼカスケード中の様々な環境ストレスや炎症性サイトカイン、増殖因子により惹起される SAPK/JNK 経路を特異的に活性化する GCK ファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼである。我々は Nrk の生理的役割を知るため、遺伝子ノックアウトマウスの作製と解析を行い、胎児における Nrk 欠損が胎盤の過形成とその母体の分娩不全を引き起こすことを見出した。母体と胎児を介する胎盤は、物質輸送や妊娠関連ホルモン産生等に寄与し、胎児の生命を確保し正常な発育を維持する必須な器官である。Nrk は胎盤内の海綿状栄養膜層に特異的に発現し、この組織層の Nrk 欠損が胎盤の細胞増殖亢進を引き起こすこと、また分娩不全の表現型より胎児から母体へ発令される未知の分娩誘発シグナルの発信に Nrk が不可欠であることが示された。

(1) 分娩は妊娠維持ホルモンであるプロゲステロン (P4) の母体血中レベルの低下とそれと同時に起こるエストラジオール (E2) 濃度の上昇により誘発されると考えられている。そこで Nrk による分娩誘発と P4 との関

連性を調べた。これまでのところ、マウス妊娠後期における WT と KO に有意な差は認められなかった。このことは、本解析に供した個体数が充足していない可能性を除けば、Nrk によってもたらされると考えられる分娩誘発メカニズムに、既知の P4/E2

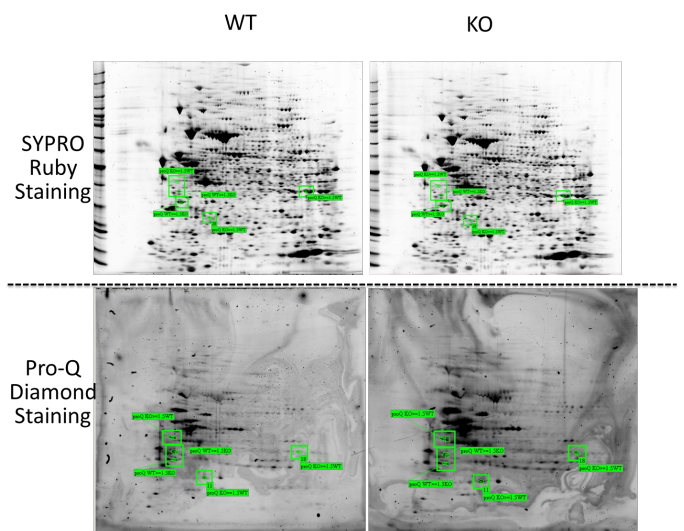


制御が直接関与しないことを示唆するものである (左図 A B はそれぞれ P4 E2 のマウス血中測定値を示す)。現在、周産期におけるステロイドホルモンのマウス血中濃度の変動について、在胎マウスを genotype ごとに場合分けし、さらに詳細な追試を行っている。また、分娩誘発剤の投与や ovariectomy を Nrk 欠損妊娠マウスに対して行い、この結論の妥当性を検証することを試みているところである。

(2) 次に、胎児(胎盤)による分娩誘発の分子機構を知る有力な手掛かりを得るため、Nrk と相互作用する細胞内因子の同定を行った。これまでタンパク質分子間相互作用によって細胞増殖制御に関わることが報告されているシグナル伝達分子を含め複数の候補分子が得られてきており、現在、これら結合因子であるタンパク質分子に関し、哺乳動物細胞内で Nrk と結合するか、Nrk によってリン酸化されるか否かの確認を進行中である。

(3) 本研究課題期間中に特に力点を置いて実施した研

究事項として、Nrk の遺伝子ノックアウトにより遺伝子産物量が変動するタンパク質の探索を目的としたプロテオーム解析を行った。Nrk 欠損によって胎盤組織における個々の遺伝子産物の発現量がどのように影響を受けるかを網羅的に解析した。分娩直前の Nrk 欠損胎児を妊娠したマウスより取得した胎盤から直ちに胎盤組織内の海綿状栄養細胞層を単離し、全タンパクを抽出した。次に、二次元電気泳動の条件設定を行い、最も明瞭な泳動像を与える実験条件の至適化を検討した。次に、毎回 3 個の胎盤を併せてタンパク量 50 μg 相当の検体を調製し、二次元電気泳動で展開した。検出されたスポットを定量化するため、電気泳動像をコンピューターに取り込み、画像解析ソフトを用いてその面積または体積の相対値を求め数値化した。得られた変異体由来の二次元電気泳動図を野生型と比較した結果、タンパク量の変動が著しい 10 以上のタンパク質スポットを見出した。これらは Nrk 遺伝子の欠損によって発現量が変動するタンパク質として重要と考えられる。さらに、二次元電気泳動の試行数を重ねることで、再現性が認められる普遍的なスポットを見極め、有意な変動性が認められるタンパク質の同定を行った。下図は胎盤組織由来のプロテオームを二次元電気泳動により分画した泳動像の野生型に対する変異型の比較である。上段は SYPRO Ruby タンパク質ゲルステインによる胎盤由来の全タンパク質の染色像であり、下段は Pro-Q Diamond タンパク質ゲルステインによるリン酸化タンパクの特異的検出シグナルを示している。これまでのところ、胎盤全組織由来のリン酸化基質の可能性が期待される十数個の検出スポットを取得した。以上のように、マウス胎盤組織中のプロテオミクス解析を総括的に行い、細胞増殖制御ならびに分娩誘発に与る Nrk の生理的意義の究明に展開させる目的で、これら検体の質量分析を行い発現タンパク質の量的変動を解析し、未知の Nrk と相互作用する細胞内分子を同定し、個々のタンパク因子の生物学的意味付けを現在検討しているところである。



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 1件)

Tanno, H., Shigematsu, T., Nishikawa, S., Hayakawa, A., Denda, K., Tanaka, T., and Komada, M. (2014) Ubiquitin-interacting motifs confer full catalytic activity, but not ubiquitin chain substrate specificity, to deubiquitinating enzyme USP37. *J. Biol. Chem.* **289**, 2415-2423

〔学会発表〕(計 2件)

2P-0452 分娩発来をもたらす胎盤特異的なプロテインキナーゼ Nrk が与るシグナル伝達機構の解明. 伝田公紀, 井田加奈子, 廣崎賢, 岡本直樹, 柳川享世, 林宜宏, 駒田雅之(東工大・院・生命理工)
第36回日本分子生物学会年会(20131204-20131204).
神戸国際会議場(兵庫・神戸)

3P-0833 プロテインキナーゼ Nrk による乳腺上皮細胞の増殖抑制. 柳川享世, 稲谷卓也, 伝田公紀, 駒田雅之(東工大・生命理工)
第36回日本分子生物学会年会(20131205-20131205).
神戸国際会議場(兵庫・神戸)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

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

傳田 公紀(DENDA, Kimitoshi)

東京工業大学・大学院大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号: 50212064

(2) 研究分担者

研究者番号:

(3) 連携研究者

駒田 雅之(KOMADA, Masayuki)

東京工業大学・大学院大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号: 10225568