

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861462

研究課題名(和文) 卵母細胞特異的に発現するTAp63 -Bnc1シグナルの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of TAp63alpha-Bnc1 signal in oocyte

研究代表者

坂本 雅弘 (SAKAMOTO, Masahiro)

東北大学・大学病院・技能補佐員

研究者番号：50645299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではTAp63 alphaが卵母細胞において、生殖細胞特異的に高発現するBasonuclin1(Bnc1)の遺伝子発現を制御するメカニズムに焦点を当てて、TAp63 alphaの役割について解析を試みた。卵母細胞にTAp63 alphaを過剰発現させたところ有意なBnc1の発現変化を認めなかった。質量分析器を用いてBnc1に結合する新規蛋白質候補を探索したところ、TAp63 alphaの発現を制御する蛋白質"X"を同定した。免疫沈降反応でもBnc1と標的蛋白質"X"は結合することから、Bnc1と"X"は協調してTAp63 alphaの発現を制御する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Basonuclin1 (Bnc1) gene is specifically expressed in germ cells and keratinocyte. We have focused on the mechanism to regulate Bnc1 expression level in mouse GV stage oocyte. Microinjection of TAp63 alpha mRNA into mature GV stage oocytes did not increase the Bnc1 gene expression. Using Mass Spectrography, We have identified the novel Bnc1-binding proteins and possibility that TAp63 alpha gene expression is regulated by Bnc1 and a novel Bnc1-binding protein "X".

研究分野：生殖医学

キーワード：生殖 卵成熟

1. 研究開始当初の背景

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る。卵母細胞における RNA やタンパク質の合成・貯蔵(卵成熟)は生物学的にも受精や初期胚形成に重要であるが、卵の質に直結する卵成熟と卵胞閉鎖を制御する詳細なメカニズムは未だ不明である。臨床現場において治療困難な早発卵巣不全(Premature ovarian failure: POF/Premature ovarian insufficiency: POI)では卵母細胞数が極度に減少している。そのメカニズムは不明であるが、さまざまな要因によって原始卵胞数が通常よりも減少したか、原始卵胞の形成が元々少なかったと推測されており、アポトーシスによる卵胞閉鎖と自己免疫、放射線、環境因子などの外的要因による卵胞の破壊が主な原因であると考えられている。閉経期前の卵胞は結果としてエストロゲン刺激に反応しにくいため卵胞が成熟しにくく、排卵誘発は容易ではないが、近年、残存卵胞を取り出し、体外培養で卵成熟させることが可能になってきた。そのため、臨床応用する上でも卵成熟の機序を分子レベルで理解することがますます重要になってきたが、未だ卵成熟の詳細なメカニズムは不明である。申請者らのグループはこれまでに精子や卵母細胞といった生殖細胞とケラチノサイト特異的に高発現する *Basonuclin1*(*Bnc1*)の機能を解析したところ、トランスジェニックノックアウトマウスを使用した実験結果から *Bnc1* 下流のシグナルが生殖細胞の機能維持と成熟過程の制御に必須であることが決定的となった。*p63* は *Bnc1* プロモーターに直接結合し、転写因子として下流の遺伝子を制御することが報告された。*p63KO* マウスでは、卵母

細胞特異的・時期特異的に発現する *p63* isoform である *TAp63alpha* が産生されず、卵母細胞のアポトーシスが抑制され、DNA 障害を受けた卵母細胞が排除されないため、結果的に不妊になる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、初期の卵母細胞特異的に発現する *TAp63alpha* の機能に着目し、*p63* の下流にある *Bnc1* をモデルとして、*TAp63alpha* による *Bnc1* の遺伝子発現制御を解析し、*Bnc1* シグナル伝達的一端について検討した。マウス卵母細胞を用いて *Bnc1* 遺伝子発現が *TAp63alpha* によって実際に制御されるか否かを解析し、*TAp63alpha* の生理的意義について分子レベル・遺伝子レベルで解明した。

3. 研究の方法

(1)卵母細胞の収集・固定法と *TAp63* の発現確認：*p63* には *TA* 型と *deltaN* 型が存在し、それぞれ *alpha*, *beta*, *gamma* の isoform を持つ。これまでに6つの *p63* isoform についてそれらの機能と生理学的意義、細胞特異性が解析されているが、*TA* 型と *deltaN* 型 *p63* の機能は異なるだけでなく、それぞれ相互に結合することがあり、それぞれの詳細な機能解析は難しい。卵母細胞においては *TAp63alpha* のみが発現し、初期の前胞状卵胞までしか発現していないと報告されている。そこでまず、卵母細胞における *TAp63alpha* の発現を解析するために使用する抗体と、1次卵胞からの卵母細胞の収集方法、および固定法を確認した。また、卵胞の長期培養については世界中でさまざまな方法が試みられているが、未だ培養法が確立されていない。今回、初期卵母細胞(一次卵胞)を長期間培養する方法を検討した。

(2)*TAp63alpha* による *Bnc1* 機能制御の解析：培養細胞を用いて *TAp63alpha* を発現させる実験は報告されているが、卵母細胞に発現さ

せる実験は報告されていない。TAp63alpha の mRNA を卵母細胞にマイクロインジェクションして、卵母細胞において p63 が Bnc1 の発現を制御するかを検討した。

TAp63alpha のプラスミド作製と mRNA 精製：マウス TAp63alpha のプラスミドを用いて mRNA を精製し、マウス卵母細胞に p63 mRNA をマイクロインジェクションするため、pRC/CMV/p63 プラスミドから p63 fragment を切り出し、pIVT -GFP vector に挿入した。pIVT vector は *in vitro* RNA 精製用のプラスミドであり、卵母細胞内でマイクロインジェクションされた mRNA から GFP タグ付きの目的の蛋白質が作製される (Ihara M, *et al*, Biol Reprod, 2008)。

Bnc1 mRNA 遺伝子発現の解析：TAp63alpha が Bnc1 プロモーターに結合し、Bnc1 mRNA の発現を活性化させるか否かを検討した。TAp63alpha を過剰発現させた卵母細胞を用いて RT-PCR を行い、Bnc1 の遺伝子発現量を比較検討した。また、免疫染色法で Bnc1 が卵母細胞内で増加するか否かを検討した。

4. 研究成果

(1)これまで報告されてあるようにパラホルムアルデヒド(PFA)による固定法で卵母細胞を固定・免疫染色した。培養細胞で使用されている抗体を数種類用いて培養細胞(293細胞)と共に出生4日目、13日目、6週目のマウス卵母細胞における TAp63alpha の局在を検討したところ、出生4日目の卵母細胞で TAp63alpha が核内に優位に局在し、成熟した卵母細胞では強く発現はしていないが細胞質と核内にほぼ均一に染色され、一部核内 dot 様構造に局在していた。これまで報告されている知見では、成熟卵母細胞では TAp63alpha は発現していないということであるが、本データが疑陽性であるのか更なる検討は必要である。一方、p63 の Pan 抗体を用いた免疫染色結果は報告されている結果

と同様の局在結果を示したが、この結果は全ての isoform を含むので、TAp63alpha だけの局在を意味しているわけではない。

未熟卵母細胞の長期培養：出生後4日目の卵巣から1次卵胞を収集し、卵母細胞のみでの長期培養をさまざまな条件で試みたが、有意な差を出せる結果を得ることはできなかった。卵母細胞のみでは数日で死滅してしまい、やはり顆粒膜細胞が付着した状態の COC (cumulus cell-oocyte complex) でないと長期培養は困難であった。

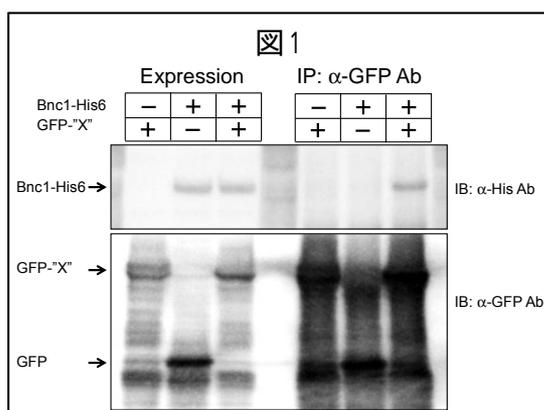
(2) 293細胞に TAp63alpha を過剰発現させた場合、コントロールと比較して細胞数が減少した。成熟卵母細胞に TAp63alpha-GFP mRNA をマイクロインジェクションして過剰発現させた場合、その局在はむしろ細胞質に優位であった。卵母細胞においてマイクロインジェクション1日後に Bnc1 の遺伝子発現量を比較検討した結果、Bnc1 の遺伝子レベルに有意な変化を認めなかった。卵母細胞は分裂・増殖することはなく、ヒトにおいては40年以上も初期卵胞から少しずつ成熟していくが、発育が停止している。従って卵母細胞を用いた実験では細胞増殖を行わないため、培養細胞で見られるような TAp63alpha による遺伝子発現レベルの制御を検討することは困難である可能性を見出した。

当初の予定とは異なるが、TAp63alpha と Bnc1 の関連性を免疫染色で検討するため、数種類の抗 Bnc1 抗体や GFP タグを付加させた Bnc1 を用いて Bnc1 の局在を検討したところ、PFA 固定で検出される局在と TCA 固定やエタノール固定で認められる局在では見え方が異なることが判明した。Bnc1 は細胞質と核内を頻回に移動することが判明しており、TCA 固定やエタノール固定では Bnc1 は瞬時に固定されるが、PFA 固定では核内蛋白の固定が終了するまでに蛋白質が核内を移動している可能性がある。また、TCA 固定では PFA 固定と

は立体構造変化が異なるため、抗体によって検出された可能性がある。従って、Bnc1に限らず、通常使用しないTCA沈殿を用いた免疫蛍光染色法を検討することで、これまで検出されなかった蛋白質の局在や存在を明らかにできる可能性がある。

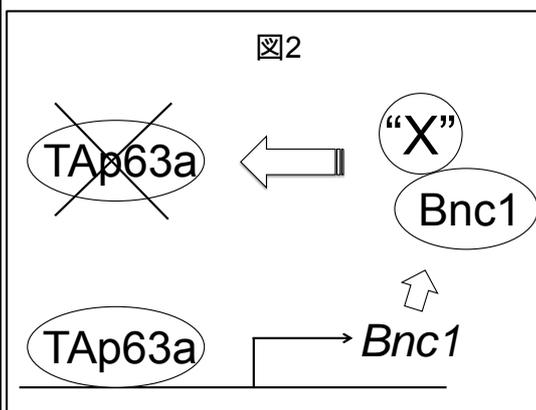
一方、成熟卵母細胞を10,000個収集し、質量分析器を用いてBnc1に結合する新規蛋白質候補をMS解析で探索したところ、TAp63alphaの発現に關与する蛋白質"X"が同定された。免疫沈降反応を用いた結合実験においてもBnc1と"X"は結合することが判明した。(図1)

新規Bnc1結合蛋白質"X"はあるシグナル伝達経路に關与することが判明しており、培養細胞において"X"を過剰発現させると、p63の発現量は低下して細胞増殖が抑制される。逆に"X"の発現を抑制するとp63alphaの発現が増強される。従って、当初p63-Bnc1シグナル伝達経路はDNAのメチル化によって細胞特異的に制御されている可能性を考えていたが、その分子メカニズムにおいては以下



のようなモデルが考えられる。TAp63alphaは初期卵胞の卵母細胞においてBnc1を発現させ、卵母細胞の成熟に關与するが、Bnc1結合蛋白質"X"と協調してTAp63alphaの発現を負に制御する(図2)

現在分子生物学的な生理的意義をまとめつつある。



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 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)

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:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
なし

6. 研究組織
(1)研究代表者
坂本 雅弘 (SAKAMOTO, Masahiro)
東北大学・大学病院・技能補佐員
研究者番号: 50645299

(2)研究協力者
井原 基公 (IHARA, Motomasa)