

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462471

研究課題名(和文) 加齢卵母細胞における核小体構造の解析とSUMO化の生理的意義の検討

研究課題名(英文) Analysis of nucleolus function and sumoylation in oocyte

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス卵母細胞を用いて新規Bnc1結合蛋白質を同定し、分子生物学的に解析した。そのうちSUMO E3リガーゼPias4が、卵母細胞の核小体様構造NLBにも局在するBnc1と結合し、Bnc1のSUMO化を促進することを見出した。Bnc1のSUMO化はSUMO-1特異的に513番目のリジンを修飾した。GV期卵母細胞を用いてBnc1の局在にSUMO化が関与するか検討したが、Bnc1の局在は核質から変化しなかった。Bnc1ノックアウトマウスの卵母細胞を用いてBnc1がc-Kitシグナルを介して卵胞発育を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Using 293 cell line and 10,000 mouse GV stage oocytes, novel Basonuclin1 (Bnc1)-binding proteins were identified. It is shown that SUMO E3 ligase Pias4 enhanced sumoylation of Bnc1, which localizes not only nucleoplasm but also Nucleolus-like body (NLB) in young mouse oocyte. Lysin 513 of Bnc1 was specifically modified with SUMO-1, but this sumoylation did not effect the localizational change of Bnc1 in adult GV stage oocyte. Using Bnc1 knockout mouse oocyte, we have shown that Bnc1 regulates folliculogenesis through c-kit signaling pathway.

研究分野：生殖

キーワード：Basonuclin1

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。不妊治療では必然的に染色体不分離などの染色体異常を持つ加齢卵を扱う機会が多い。加齢卵の卵母細胞や受精卵は一見正常であるので、体外受精や顕微授精後に行う胚移植の時点では染色体異常を持つ受精卵を判別することが難しい。21トリソミーの95%が母親由来であり、標準型の21トリソミーでは染色体不分離の80%が第一減数分裂期に引き起こされるが、その直接的な原因やメカニズムは未だ解明されていない。もしGV期の卵母細胞において卵の質を改善できれば、染色体不分離などの異常を軽減でき、ARTにおいてもより高率に健康児を得られる可能性がある。

最近、蛋白質の翻訳後修飾であるSUMO(small ubiquitin related modifier)化や脱SUMO化がスプライシングなどのRNAプロセッシングを制御することが判明し、SUMO化による蛋白質翻訳後修飾の生理的意義が再注目されつつある。私は、卵母細胞や初期胚においてもSUMO化がRNAの機能制御を介して遺伝子発現制御に重要な役割を果たす可能性を明らかにした(Ihara *et al.* Biol.Reprod.2008)。

一方、Basonuclin1(Bnc1)は生殖細胞とKeratinocyte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た(Ma J. *et al.* 2006)。我々はこれまでの予備的実験により、Bnc1がSUMO化されることを明らかにしてきた。GV期卵母細胞の核小体様構造(NLB: Nucleolus-like body)は受精直後の核の核小体形成に必須である。NLBが欠損すると第一分割で染色体分離異常を示す。NLBはリボゾーム合成以外の機能を持つことが示唆されているが、その詳細な機能は不明である。Bnc1は未熟卵母細胞においてNLBにも局在することが分かっているが、その生理的意義は不明である。

2. 研究の目的

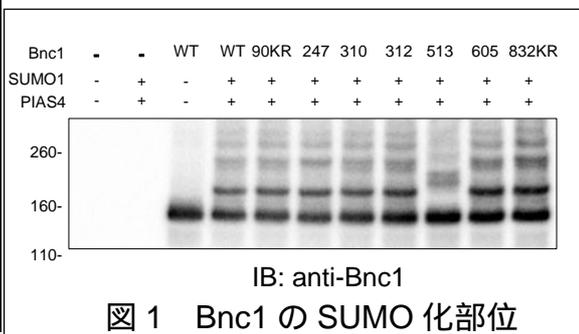
Bnc1が関連する細胞特異的シグナル伝達経路が明らかになれば、卵母細胞の質を改善し、加齢卵に多く認められる染色体分離異常や分裂停止の割合を軽減させる可能性がある。そこで、最終的に卵母細胞においてBnc1がどのような生理的機能を持つか検討する。

3. 研究の方法

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いる。(Ma J, *et al.*, Development, 2006)、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、結果的に卵母細胞におけるBnc1の機能を分子レベルで解析した。すなわち、(1)マウス卵母細胞を用いて新規Bnc1結合蛋白質を同定し、分子生物学的に解析する。また、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、(2)Bnc1のタンパク質翻訳後修飾SUMO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。また、Bnc1ノックアウトマウスでは早期に卵胞が退縮し、消失することから不妊になる。そこで、(3)Bnc1ノックアウトマウスの卵巣を用いて卵胞発育への影響を比較検討する。

4. 研究成果

Bnc1はNLBにも局在するので、NLB局在因子を探索するために、予備的実験としてまず新規Bnc1結合蛋白質が同定されるか否か検討した。293細胞とマウス卵母細胞10,000個のLysateをそれぞれ抗Bnc1抗体カップリングビーズと抗ラビット抗体カップリングビーズを用いて免疫沈降し、質量分析法によって新規Bnc1結合蛋白質の比較同定を試みた。卵母細胞では80個の新規結合蛋白質候補を同定した。そのうちの1つに、SUMO化のE3リガーゼであるPias4も同定され、Bnc1がSUMO化されることがMS解析結果からも示



唆された。Bnc1 には SUMO 化のコンセンサス配列 (ψ K X E/D) が 4 カ所存在する (247 番、312 番、513 番、832 番のリジン)。コンセンサス配列内のリジン塩基(K)をアルギニン塩基(R)に変異させた変異型プラスミドを用いて 293 細胞に発現させて Western blotting で解析したところ、そのうち 513 番目が SUMO-1 によって修飾されることが判明した (図 1)。最近新たに SUMO 化されるコンセンサス配列 (inverted SUMO 化配列) が同定されたため、それらのリジン (90 番、310 番、605 番) のアルギニン変異型 Bnc1 を用いて同様に解析したが、SUMO-2 によって修飾されるリジンの同定はできなかった。

SUMO 化による Bnc1 の局在制御を検討するため、GV 期卵母細胞に GFP タグを付加させた Bnc1 mRNA をマイクロインジェクションしたところ、C 末に付加させた Bnc1-GFP は卵母細胞の核内に移行しなかったが、N 末に付加した GFP-Bnc1 は核内移行したことから、GFP の位置によって Bnc1 の核内移行が阻害されることが判明した (図 2)。

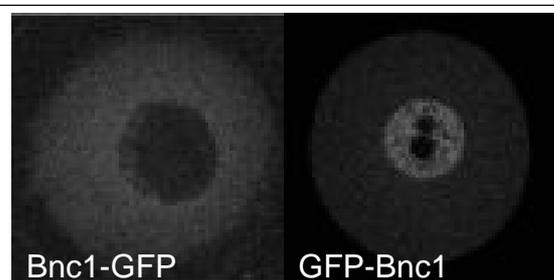


図 2 GFP の影響

N-GFP-Bnc1 のリジンをアルギニンに置換した変異型をそれぞれマイクロインジェクションしたが、K513R も野生型と同様に核質に局在し、NLB には局在しなかった。従って、ある程度成熟した卵母細胞では Bnc1 の局在は核質から変化せず、翻訳後修飾 SUMO 化の影響は受けないことが示唆された。

一方、ノックアウトマウスと野生型マウスのゴナドトロピン依存性に成熟する生後 14 日以降の仔マウスの卵巣を用いて卵胞発育を比較したところ、成熟したノックアウトマウスでは卵胞が退縮して不妊になるが (図 3)

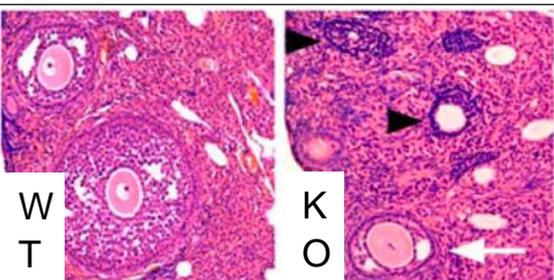


図 3 Bnc1 KO マウスにおける卵胞の退縮

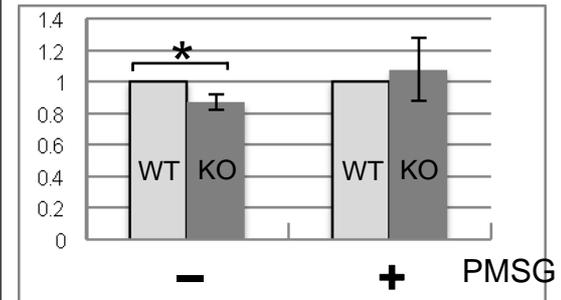
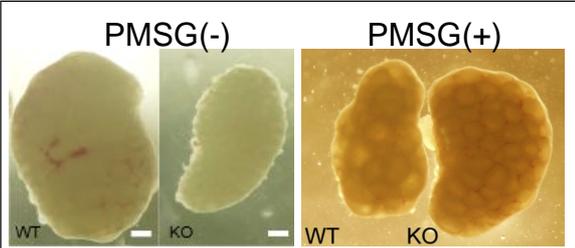


図 4 仔マウスの卵巣サイズ変化

5 週程度までのノックアウトマウスでは卵胞の発育が抑制されていた (図 4)。ゴナドトロピンで刺激したところ、ノックアウトマウスでは卵巣サイズが増大することから、Bnc1 ノックアウト仔マウスにおける卵胞発育抑制に Bnc1 が関与していることが示唆された。

卵母細胞を採取して遺伝子発現レベルを比較したところ、仔マウスの卵母細胞では *c-Kit* の遺伝子レベルが増加していたことから、幼時の卵胞発育抑制には *c-Kit* シグナル伝達経路が関与していることが示唆された。Bnc1 ノックダウンマウスを用いたマイクロアレイデータにおいても、*c-Kit* の遺伝子レベルが上昇していることから、Bnc1 が *c-Kit* の転写を制御することが示唆された。また、若年マウスの卵母細胞を用いた RNA の免疫染色でも Bnc1 ノックアウトマウス卵母細胞の新規合成 Total RNA 量が増加していた。従って、Bnc1 ノックアウトマウスの成熟マウスと幼仔マウスでの卵巣内環境は異なる可能性が示唆された。

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 1 件)

1. Kurosawa H, Utsunomiya H, Shiga N, Takahashi A, Ihara M, Ishibashi M, Nishimoto M, Watanabe Z, Abe H, Kumagai J, Terada Y, Igarashi H, Takahashi T, Fukui A, Suganuma R, Tachibana M, and Yaegashi N. Development of a new clinically applicable device for embryo evaluation which measures embryo oxygen consumption. Hum Reprod. 2016

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 井原基公, 坂本雅弘, 加藤恭丈, Hung Tseng, Richard M.Schultz, 五十嵐和彦, 立花眞仁, 八重樫伸生. 卵母細胞に高発現するBasonucl in1 のSUMO化はPias4 によって促進される.2017/4/16 第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会 リーガロイヤルホテル広島(広島市)
2. 井原基公, 坂本雅弘, 加藤恭丈, 星野由美, Hung Tseng, Richard M.Schultz, 五十嵐和彦, 立花眞仁, 八重樫伸生. 卵母細胞に高発現するBasonucl in1 のSUMO化はPias4 によって促進される.2016/11/4 第 61 回日本生殖医学会学術講演会 パシフィコ横浜(横浜市)
3. 井原基公, 坂本雅弘, 加藤恭丈, 星野由美, Hung Tseng, Richard M.Schultz, 五十嵐和彦, 立花眞仁, 八重樫伸生. 卵母細胞に高発現するBasonucl in1 のSUMO化はPias4 によって促進される.2016/10/15 第 54 回日本生殖医学会東北支部会 岩手医科大学創立 60 周年記念館(盛岡市)
4. 井原基公, 坂本雅弘, 加藤恭丈, Hung Tseng, Richard M.Schultz, 五十嵐和彦, 立花眞仁, 八重樫伸生. 卵母細胞に高発現するBasonucl in1 のSUMO化はPias4 によって促進される.2016/9/25 第 89 回日本生化学会大会 仙台国際センター(仙台市)

〔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 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

井原 基公 (IHARA, Motomasa)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号: 50403506

(2)研究分担者

立花 眞仁 (TACHIBANA, Masahito)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号: 30431571

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

宇都宮 裕貴 (UTSUNOMIYA, Hiroki)
東北大学・大学病院・准教授
研究者番号: 10359507

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()