

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 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：2011～2013

課題番号：23657086

研究課題名(和文) プロテインキナーゼNrkを介した胎盤による分娩誘発の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of induction of labor 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) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：X染色体にコードされるプロテインキナーゼNrkの生理的意義を解明するため、Nrk遺伝子欠損マウスを作製し解析した結果、遺伝子を欠くメス妊娠個体で胎盤過形成が生じ分娩不全に陥ることから、Nrkは哺乳動物妊娠過程に重要であり分娩誘発に必須であることを突き止めた。

本研究ではNrkの分娩発来における働きを明らかにするため、Nrk遺伝子欠損マウスの分子生理学的解析ならびにNrkと相互作用する因子の探索を行った。これまでNrk遺伝子欠損メスマウスにおいて周産期分娩不全の原因遺伝子は特定できていないが、Nrkの細胞機能に関与しうる遺伝子産物を複数同定しており、現在これらの候補となる因子の解析を進行中である。

研究成果の概要(英文)：Nrk(NIK-related kinase) is a functionally unknown Ser/Thr protein kinase. To elucidate the physiological roles of Nrk, we generated a strain of mice with targeted disruption of the Nrk gene in the X chromosome. The Nrk gene knockout causes overgrowth of the placenta, indicating that Nrk is a key regulator of placental cellular proliferation. In addition, when the Nrk-null fetuses were dominant, the pregnant dam failed to deliver offspring at term. Thus, Nrk appears to be important for performing parturition.

In order to investigate the molecular mechanisms leading to the Nrk knockout phenotype, protein expression levels in the Nrk knockout placenta were compared with those in wild type tissues by using high-performance two-dimensional electrophoresis methodology, and found several significant protein spots whose expression levels were enhanced or diminished significantly in the Nrk knockout placenta. Our examine whether placenta or fetus are essential for labor is now in progress.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：Ser/Thrキナーゼ ノックアウトマウス 胎盤 分娩 X染色体不活化

1. 研究開始当初の背景

Nrk は, germinal center kinase ファミリーのセリン/スレオニンキナーゼである。ヒト培養細胞を用いた解析から, Nrk が MAP キナーゼ経路の活性化やアクチン細胞骨格を制御に関与することが報告されているが, その生理機能は不明であった。そこで応募者らは Nrk ノックアウトマウスの作製と解析を行い, 以下の2つの顕著な表現型を見出した。(1) 胎盤の過形成: 胎児における Nrk 欠損により, 胎盤の海綿状栄養膜細胞 (spongiotrophoblast, 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 およびタンパク質レベル) しており, 海綿状栄養膜細胞における Nrk 欠損がその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。

以上の結果は, 胎児から母体に何らかの分娩誘発シグナルが発信されており, Nrk はこのシグナルの発信に不可欠な役割を担っていることを示している。Nrk 欠損により胎児と母体を結ぶ胎盤に形態異常が見られたことは, このシグナルが胎盤から出されていることを示唆している。

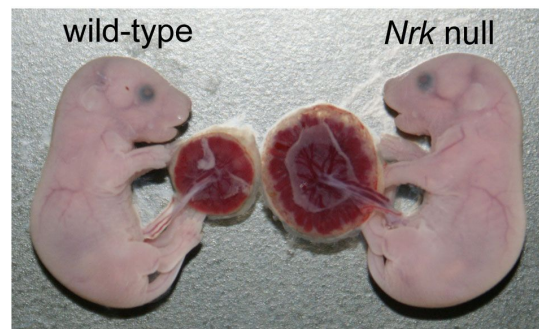
2. 研究の目的

上記の結果をふまえ, 本研究では胎児 (胎盤) による分娩誘発の分子機構を解析する。まず, (1) Nrk 欠損の胎児 (胎盤) をもつ妊娠マウスにおいて, 母体由来の既知の分娩誘発機構に異常が見られるか調べ, Nrk の関与する分娩誘発機構が既知の機構とリンクしているのか, それとも独立した機構なのか解明する。さらに, 胎盤において (2) Nrk と相

互作用するタンパク質の同定, (3) Nrk がリン酸化する基質タンパク質の同定, (4) Nrk によるシグナル伝達の下流で誘導される標的遺伝子の同定を行い, 分娩の誘発に至る Nrk のシグナル伝達経路を解明する。

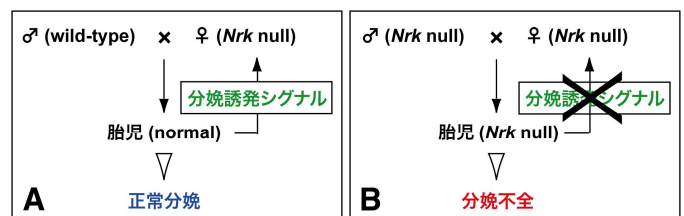
3. 研究の方法

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る。

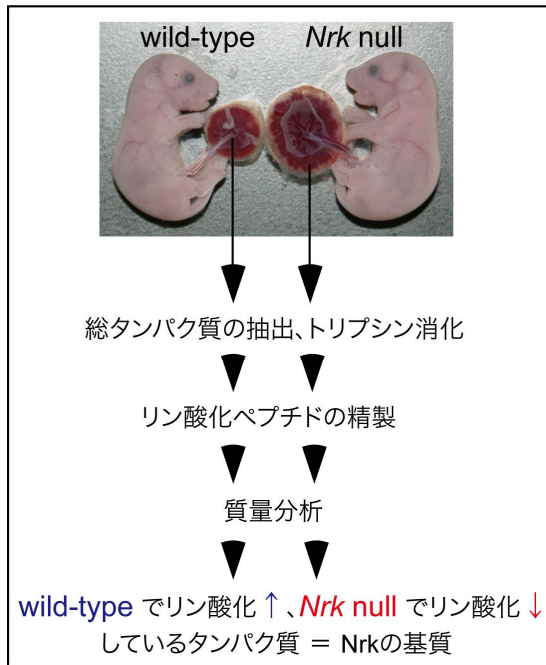


Nrk欠損マウス胎児の胎盤の過形成

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明する。そのため, (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, 同定する。さらに, Nrk 欠損胎盤における (3) リン酸化タンパク質の網羅的プロテオームと (4) 遺伝子発現プロファイル (DNA マイクロアレイ) の解析を行い, 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標的遺伝子を同定する (次ページ図)。



Nrk欠損による胎児由来の分娩誘発シグナルの喪失

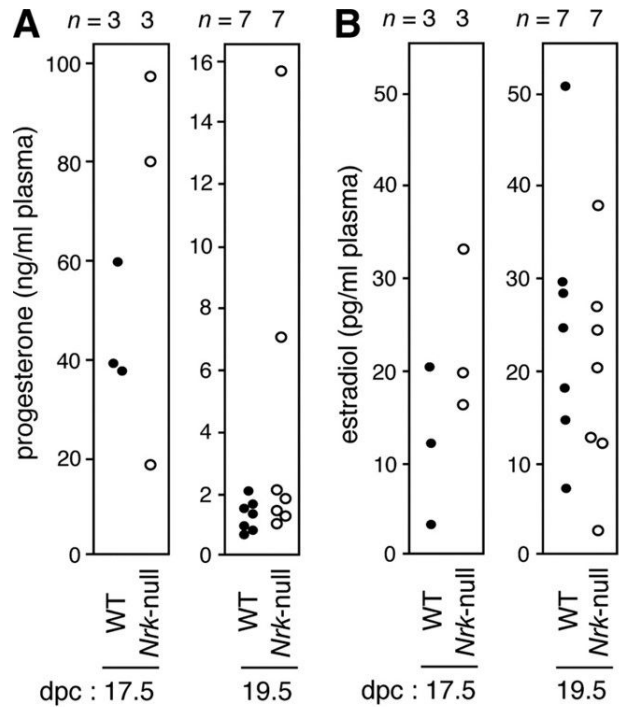


Nrk欠損胎盤のリン酸化プロテオーム

4. 研究成果

X染色体上にコードされるNrkは、MAPKカスケード中の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Ser/Thr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。

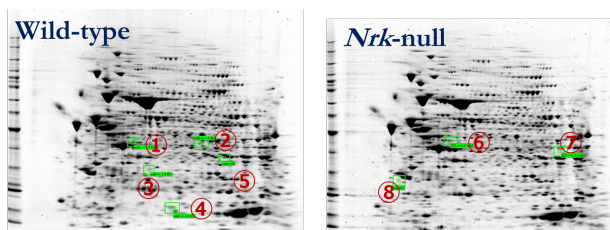
(1) 分娩は妊娠維持ホルモンであるプロゲステロン(P4)の母体血中レベルの低下と添えと同時に起こるエストラジオール(E2)により誘発される。そこでNrkによる分娩誘発とP4との関連性を調べた。これまでのところ、マウス妊娠後期におけるWTとKOに有意な差は認められなかった。従って、Nrkが齎すと考えられる分娩誘発メカニズムに、直接既知のP4制御が関与していないことが示唆された(右欄上図A, BはそれぞれP4, E2のマウス血中測定値を示す)。



(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と相互作用するタンパク質の同定を行った。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解析を進考中である。

(3) さらに、Nrkの遺伝子ノックアウトによって遺伝子産物量が変動するタンパク質の探索を行った。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欠損妊娠マウスから胎盤を取得し、直ちに胎盤組織内の海綿状栄養細胞層を単離し、タンパク質を抽出した。まず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。その後、毎回3個の胎盤を併せてタンパク量50μg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量を定量化するため、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認めた。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である。現在、二次元電気泳動の試行数を重ね再現性が認められる普遍的なドットを見極め、タンパク質の同定を行っているところである。本手法を用いてマウス胎盤組織中のプロテオミクス解析を行い、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発展させたい。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。これら検体の質量分析を行い発現タンパク質の変動を解析し、Nrk と相互作用する細胞内分子の同定を現在検討中である(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)。



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)

Denda K, Nakao-Wakabayashi K, Okamoto N, Kitamura N, Ryu JY, Tagawa Y, Ichisaka T, Yamanaka S, Komada M.

(2011) Nrk, an X-linked protein kinase in the germinal center kinase family, is required for placental development and fetoplacental induction of labor.

J Biol Chem. 2011 Aug

19;286(33):28802-28810.

doi: 10.1074/jbc.M111.258160.

(査読あり)

[学会発表](計 2件)

2P-0452 分産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(神戸)

12月3日(2013)

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(神戸)

12月5日(2013)

[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

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