

論文内容の要旨

氏名	佐藤 学 <sup>まなぶ</sup>
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	工第20号
学位授与の日付	平成21年3月21日
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当
学位論文題目	マウス卵巣プロテオーム解析及び生殖腺特異的発現遺伝子 gse の機能解析に関する研究
論文審査委員 (主査)	教授 松本 和也
(副主査)	教授 細井 美彦
(副主査)	教授 佐伯 和弘

哺乳動物の卵巣では、卵胞発育、卵母細胞の成熟、卵母細胞の減数分裂、排卵、黄体形成、そして黄体消失など複雑な生物学的現象がおきており、視床下部-脳下垂体-卵巣系で分泌される様々な因子により統合的な制御を受けている (Adashi, 1994; Matzuk et al., 2002; Matzuk and Lamb, 2002)。特に、性腺刺激ホルモンの卵胞刺激ホルモン (FSH) は、統制された卵胞発育や排卵前卵胞の顆粒膜細胞の分化に重要な役割を果たしている (Wayne et al., 2007)。一方、黄体形成ホルモン (LH) は、多様な細胞内シグナルを誘起して排卵前卵胞の排卵過程の開始を制御している (Russell and Robker, 2007)。また、FSH と LH は共同して、卵胞における遺伝子発現や形態変化に働いており、夾膜細胞、卵丘細胞、そして卵母細胞にも双方とも協調して制御している。しかし、いずれのホルモンが卵巣で起こす詳細な反応系はまだ不明な点が多い。近年、その反応を調べる方法として DNA アレイを用いたトランスクリプトーム解析が行なわれ一定の理解が得られていた。しかし、トランスクリプトーム解析の限界もあり、例えば翻訳制御を受けている遺伝子には未だ不明で、十分に解明されていない。そのため、タンパク質レベルで FSH 及び LH が卵巣に及ぼす影響を検討する必要があると考えられた。

そこで、本研究の第二章では、外因性の FSH (PMSG) と LH (hCG) の制御下で排卵前から排卵後に至る過程における卵巣組織のタンパク質の動態を調べることを目的に、外来性腺刺激ホルモン刺激後経時的に卵巣を採取し、2次元電気泳動法とマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/MS) を組み合わせたプロテオーム解析法によって、それら組織で発現するタンパク質を網羅的に解析した。その結果、1) 無処理区、PMSG (FSH) 投与 24、48 時間区、hCG (LH) 投与 10、20 時間区のゲルで共通したスポットは 1028 スポット得ることができた。また 253 スポット (24.6%) のタンパク質スポットが卵巣の周期で有意な発現量変化を示した ( $P < 0.05$ )。その中で 99 スポットのタンパク質を同定することができた。また、主成分分析及び階層クラスタリング分析により、hCG 投与が一過性のダイナミックなタンパク質発現を誘起することが明らかとなった。また、Western blot 解析によってタンパク質発現を解析しプロテオーム解析の有

効性を確認した。以上のことから、性腺刺激ホルモンに反応する卵巣の機能的、構造的変化における分子機序を理解する上で、本検討で得られたデータベース、卵巣機能を診断するバイオマーカーを探索する上で有用であると考えられた。

卵巣および精巣、すなわち生殖腺は次世代に遺伝情報を残すため生殖細胞（卵子と精子）を有する組織である。その起源は胎児期の未分化な細胞で特別な遺伝子が働き生殖細胞へと分化していく。この細胞が始原生殖細胞（primordial germ cells, PGCs）と呼ばれ、原腸陥入開始後の発生7日目に、約40個の細胞集団として現れる。PGCsは生殖隆起に向かって移動しながら増殖し、12.5日胚までにPGCsが生殖隆起内に入り生殖細胞へ文化、増殖し雌雄生殖腺を形成する。胎児精巣では減数分裂は起こさず増殖を繰り返して出生に至り、生後2週間後に精粗細胞が減数分裂を開始する。卵巣では13日胚になると体細胞分裂から減数分裂へ移行し出生までに第一減数分裂を完了する。このように生殖腺が雌雄に分化してから出生までにダイナミックな変化がある。胎児期における生殖細胞系列に関与する遺伝子は数多く報告されており、Blimpl、Stella、Fragilis、Nanos3、Dazl、Mvh、Oct4、Sox2、Nanogなど多くの遺伝子が多能性や未分化の維持に関与している。近年マウスにおいてBlimpl遺伝子が最も早くPGCsの運命決定に関与すると報告された（Saito et al., 2002）。しかし、何がこれらのプロセスを誘導する最初の引き金になるのかはまだ明らかにされていない。

第三及び四章では、我々の研究室で独自に単離した精巣および卵巣で特異的に発現する新規遺伝子 *gse* 遺伝子の機能を解析を進めた。この遺伝子は、初期胚における発生制御が母性遺伝子から胚性遺伝子支配に移行する ZGA (Zygotic gene Activation) 期に発現が変化する遺伝子群の探索を目的に行った蛍光ディファレンシャルディスプレイ法による解析 (Matsumoto et al., 2001) から同定されたものである。これまでに、*gse* 遺伝子は生殖細胞の減数分裂に関与することが示唆されている (Zhang et al., 2002)。また抗 GSE 抗体を用いたタンパク質レベルの解析で *gse* 遺伝子は全能性維持や細胞の分化に関与している可能性が示唆されている (Mizuno et al., 2006)、さら

に Yeast two-hybrid system によって GSE タンパク質と相互作用するタンパク質 GIAP (*gse* interacting protein) を単離した。GIAP はアルギニンメチル化酵素と予測される報告が最近されており (Phillip et al., 2008)、エピジェネティックな遺伝子の発現調節や多様性の決定に関与する遺伝子の可能性が示唆されている。しかし、未だ *gse* 遺伝子の機能は不明であり、その発現プロファイルも限定的な情報である。GIAP 遺伝子の発現プロファイルより得られる情報は *gse* 遺伝子の機能を類推する上で重要な知見を提供するものと考えられた。

まず、第3章で GIAP ペプチド抗体を作成し卵巣と精巣タンパクを用いて GSE タンパク質と GIAP タンパク質の相互作用を共免疫沈降法で確認を行った。その結果、生体内でも生化学的に相互作用することを確認した。また、卵巣と精巣の切片を用いて両タンパク質の免疫組織化学を行い、卵巣では二次卵胞以降の卵細胞質および核で、精巣では円形精子細胞および伸張精子細胞で共局在を確認した。この時期は生殖細胞の成長期にあたり減数分裂が進行中である。PRMT は RNA プロセッシング、転写調節、シグナル伝達や DNA 修復などの機能を持つことが知られており、減数分裂の時期に必要な機能であることから、これらダイナミックな細胞内プロセスに GIAP が関与しており、その機能を GSE が制御している可能性が示唆された。

次に、第4章では、不明である胚盤胞以降の胎児期から新生児における *gse* および GIAP 遺伝子の mRNA およびタンパク質レベルでの発現解析を行った。その結果、*gse-s* (*gse*-spliced isoform) のみ胎生 7.5 日目の PGCs が出現する時期に一過性の発現を認め、生殖腺に分化、増殖する 12.5 日以降 *gse(-s)* の発現を認めた。GSE タンパク質は胎生 7.5 日以降から GSE-S のみ発現し、12.5 日以降 GSE(-S) の発現を認めた。2 つの isoform を持つ *gse* 遺伝子は発現開始時期が異なることから異なる機能を持っている可能性が示唆された。GIAP 遺伝子は胎児期を通じて発現を示した。以上から GSE と GIAP は生殖細胞系列の特異的エピジェネティックな修飾に関与している可能性が示された。さらに、GSE は生殖腺への分化に関与する可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

現在の生命科学全体の研究の流れは、ポストゲノム時代に突入している。その中で、網羅的・系統的にタンパク質の機能やその関連性を分析するプロテオーム解析を利用した研究が、精力的に進められている。この背景には、まず遺伝子の最終産物であるタンパク質は、直接生理学的機能を発揮する分子であること、第2にタンパク質発現量の変動やタンパク質の分子修飾が、細胞・組織・個体レベルで生理機能に直接に関与していることが挙げられる。

また、多細胞生物を構成する細胞群の中で、生殖細胞は新しい個体を形成し、次世代に遺伝情報を継承する唯一の細胞系譜である。そのため、その生殖細胞としての能力を支える分子機構の理解は、生命科学において最も本質的で重要な課題の1つであり、生殖医学、生殖工学、再生医学の発展に寄与する基盤情報を提供すると期待されている。当研究室では、世界に先駆けて蛍光ディフュージョンディスプレイ法による胚性遺伝子支配に移行する ZGA (Zygotic gene Activation) 期に発現が変化する遺伝子群の探索から生殖腺特異的発現遺伝子 *gse* を単離しているが、まだその機能は十分に解明されておらず、得られている知見も限定的である。

以上の観点より、本研究は卵巣の排卵前から排卵後のプロセスにおける網羅的なタンパク質発現動態のプロテオーム解析および新規生殖腺特異的発現遺伝子 *gse* の基礎的知見を得ようとしたものであり、その成果は以下の通りである。

まず、2次元電気泳動法とマトリックス支援レーザー脱離イオン化 飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/MS) との組み合わせたプロテオーム解析法により 1028 スポット得ることに成功した。また 253 スポット (24.6%) のタンパク質スポットが卵巣の周期で有意な発現量変化を示し ( $P < 0.05$ )、その中で 99 スポットのタンパク質を同定した。また、主成分分析ならびに階層クラスタリング分析によって hCG 投与が一過性のダイナミックなタンパク質発現を誘起していることを明らかとした。また、Western blot によってタンパク質発現を解析しプロテオーム解析の有効性を確認した。本実験は、外因性の性腺刺激ホルモンで卵巣発育を制御するため、成熟卵巣では卵巣周期混在化に起因する正確なタンパク質発現動態の解析が困難であったが、それを克服し、卵巣全体のタンパク質発現動態をより正確に捉えていると考えられる。本実験で示したように、卵

巣におけるタンパク質の質的・量的変化を捉える網羅的なプロテオーム解析によって、卵巣機能を理解する上で重要な基礎的知見を提示していると考えられる。

第2に、生殖腺特異的発現遺伝子 *gse* の発現解析を行った。これまで獲得しているプロファイルは限定的であり、そのため、*gse* 遺伝子と分化系列細胞との関係の解明を目指した興味ある実験である。本実験では、これまで相互作用するタンパク質として GIAP が同定されていたが、そのペプチド抗体を作製し、相互作用を卵巣および精巣タンパク質を用いた共免疫沈降法によって生体内での相互作用の確認を試み成功した。また、卵巣および精巣での両タンパク質の共局在を確認することで相互作用の裏づけも行われており、減数分裂が起こっている生殖細胞の成長期に相互作用していることを明らかにした。用いた実験手法もすでに汎用されているもので、その結果も信頼できるものと考えられる。GIAP はアルギニンメチル化酵素活性を持つことが予測されており、GSE が、GIAP のアルギニンメチル化酵素の活性を制御していることを、Hahn らグループが生殖細胞系列特異的遺伝子 *Blimp1* とアルギニンメチル化酵素との相互作用の報告に基づいて考察している (Hahn et al., 2008)。今後、このタンパク質の酵素活性を詳細に調べることが、*gse* の機能を解明する糸口になると期待される。また、胎児期における *gse* ならびに GIAP の発現プロファイルにより始原生殖細胞 (PGCs) の出現時期と *gse* の一過性の発現時期が一致していることを明らかにした。また、雌雄生殖腺に分化後には再び *gse* の発現を認めていることから生殖細胞系列の維持や生殖腺への分化に関与する可能性を示唆している。GIAP の発現はハウスキーピング様であり胎児期における GSE との関連については課題が残る。生殖細胞系列の分子機構については依然明らかになっていない点が多いことから、生殖細胞特異的発現遺伝子である *gse* の本研究の結果がもつ生殖生理学的意義は重要であると考えられる。

以上のように、本論文は、分子生物学的手法によりマウス卵巣のタンパク質発現ならびに生殖細胞系列の分子機構の解明の端緒を示した研究として意義あるものであり、博士 (工学) 論文として価値あるものと認める。