

論文内容の要旨

論文題目 Nucleolus-like body in mouse oocytes

(マウス卵母細胞における核小体様構造体に関する研究)

氏名 井上 梓

【序論】

哺乳類の卵母細胞(成長卵)の核内には他の組織の細胞では見られない特徴的な構造体が存在する(図 1B)。この核内構造体は Nucleolus-like body (NLB;核小体様構造体) と呼ばれ、卵の成長過程で核小体が徐々に変化して形成される。NLB は卵および着床前初期胚特異的な構造体であり、体細胞の核小体とは形態も性質も大きく異なっている。体細胞の核小体はリボソームを合成する場であり、電子密度の異なるいくつかの領域に区画されており、それぞれの領域で rRNA の合成やプロセッシング、リボソームの構築などの異なるステップを担う(図 1C)。

その一方で NLB は全域に渡って電子密度が非常に高く均質な構造体であり、DNA を含まないため rRNA の転写活性がなくリボソーム合成を行っていない(図 1D)。NLB は図 1B のように哺乳類の卵において明瞭で非常に目立った構造であるため、古くから形態学的な観察はされていたものの、分子レベルの研究は進んでおらず NLB の機能や構成因子は未だ明らかになっていない。しかし近年、マウス及びブタの卵母細胞から NLB を顕微操作で除去すると、着床前で発生が停止することが示された(Ogushi *et al.*, 2008 *Science* 319: 613-619)。その発生停止の原因はいまだ不明なままであるが、この結果は NLB が哺乳類の初期発生に重要な役割を持つことを示しており、NLB の実体を明らかにすることは哺乳類の初期発生メカニズムの解明に貢献するものと思われる。本研究では、NLB という構造体の全貌解明を目指し、NLB 構成因子の同定と NLB 形成機構の解明、そして NLB の機能解析を試みた。

【結果・考察】

1. NLB 構成因子としての Nucleoplasmin 2 (NPM2) の同定と NLB 形成への関与

NLB の構成タンパク質を同定するために、成長

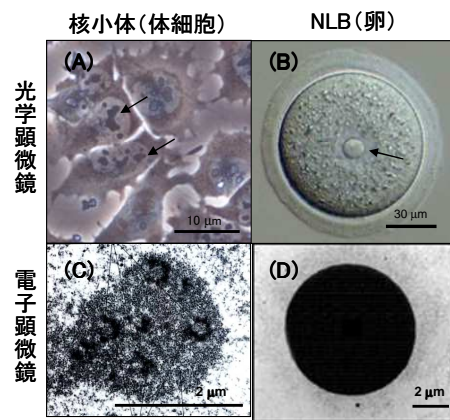


図1. 体細胞の核小体(A)とGV期卵のNLB(B)およびその電子顕微鏡写真(C:核小体, D:NLB)

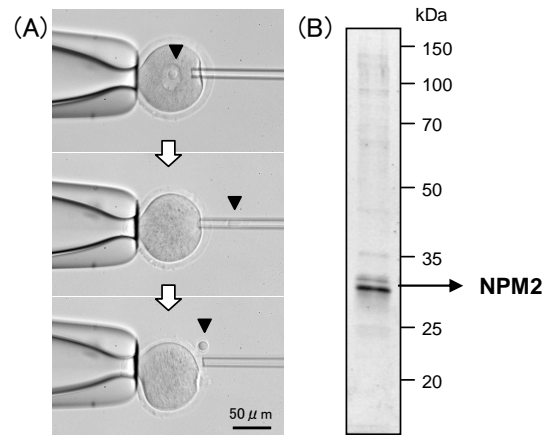


図2. (A) 顕微操作によるNLB単離法(矢頭:NLB) (B) MALDI-TOFMSによるNLB構成タンパク質の同定

卵から顕微操作を用いて NLB を単離した(図 2A)。SDS-PAGE で展開後、主なバンドを切り出し MALDI-TOFMS を用いて質量分析をおこなった結果、Nucleoplasmin 2 (NPM2) が同定された(図 2B)。NPM2 以外のバンドはほとんど検出されなかったことから、NPM2 は NLB の主要タンパク質であることが示唆された(図 2B)。これまでに NPM2 に関して、卵および着床前初期胚に特異的に発現し初期発生に必須な 207 aa のタンパク質であることがわかっているが、その機能は未だわかっていなかった。

NPM2 が NLB の構成タンパク質であることを、(i) イムノブロットングおよび (ii) GFP 融合タンパク質を用いて確認した。(i)については、顕微操作を用いて成長卵から NLB を単離後、NLB 除去卵と単離された NLB をそれぞれ抗 NPM2 抗体によるイムノブロットングに供した。その結果、NLB 除去卵にはほとんどシグナルが検出されなかった一方で、単離された NLB 群には未操作の卵と同程度のシグナルが検出された(図 3A)。(ii)については、NPM2 の cDNA の N 末端に GFP を融合したコンストラクト(GFP-Npm2) を作製し、試験管内転写した mRNA を成長卵に顕微注入したところ、GFP の蛍光は NLB に強く検出された(図 3B)。以上の結果から、NPM2 は NLB の構成成分であることが明らかになった。

NPM2 が NLB に局在する機構を調べるために、NPM2 配列内部に NLB 移行に関与するモチーフが存在する可能性を検証した。NPM2 の各ドメインの欠失変異体を作製し、それらの NLB 局在能を調べたところ、核移行シグナル(NLS)の他にリジン残基に富む C 末端の 16 個のアミノ酸(K-rich motif) が NLB 局在に必須であることがわかった(図 4)。さらに K-rich motif を核質に局在するタンパク質である MafG に融合させると MafG は NLB に局在するようになったことから、K-rich motif が NLB 移行シグナルとして機能することが示された。

NLB は卵の成長過程で核小体が徐々に変化して形成されるがその機構はわかっていない。NLB 形成への NPM2 の関与を調べるため、はじめに卵成長過程における NPM2 の発現量の変化とその細胞内局在をそれぞれ SDS-PAGE および GFP-Npm2 mRNA の顕微注入により調べた。その結果、NPM2 タンパク質は核小体に局在し卵成長過程で大きく増加することがわかった。また、弱変性条件下での SDS-PAGE では 150 kDa 以上の分子量に検出されることから、NPM2 は卵内で重合体として存在してい

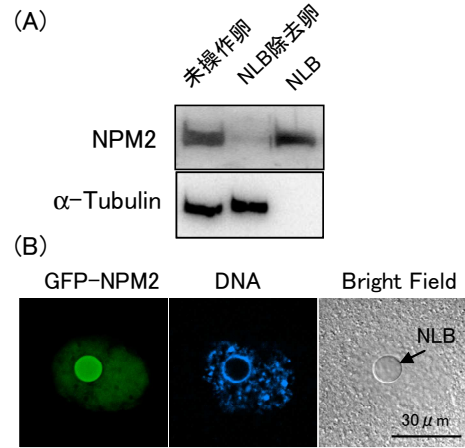


図3. (A)NLB単離後の抗NPM2抗体を用いたイムノブロットング(Tubulin は loading control) (B)GFP-NPM2の細胞内局在

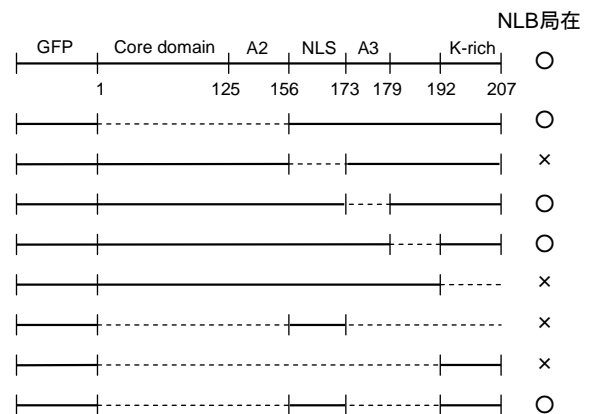


図4. NLB局在に関わるNPM2内領域の同定
A2; Acidic region 2, NLS; nuclear localization signal,
A3; Acidic region 3, K-rich; lysine rich motif
数字はNPM2のN末からのアミノ酸数

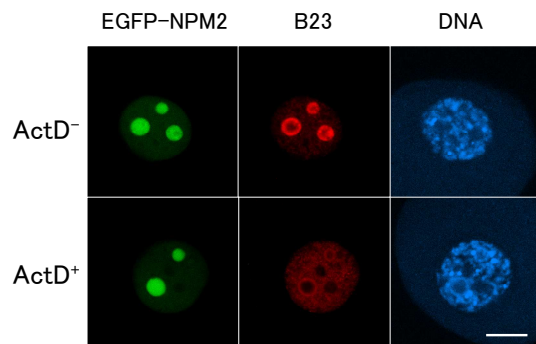


図5. Actinomycin D (ActD) 処理時の成長期卵における GFP-NPM2と核小体タンパク質B23の局在 (Bar = 20 μm)

ることが示唆された。体細胞において多くの核小体タンパク質は rRNA 合成依存的に核小体に局在することが知られているため、続いて成長期卵における NPM2 の核小体局在が rRNA 合成依存的なのかどうかを rRNA の転写阻害剤 Actinomycin D を用いて調べた。その結果、核小体タンパク質 B23 は核質に拡散して核小体に局在できなくなった一方で、NPM2 は核小体に留まった(図 5)。このことから、卵成長過程における NLB 形成の過程で、NPM2 が rRNA 合成非依存的に核小体に集積することが示唆された。

続いて RNAi を用いて NPM2 をノックダウンしたときの NLB 形成を調べた。NLB が構築される前の成長過程の卵に NPM2 に対する siRNA を顕微注入した後、体外成長系を用いて成長を完了するまで 12 日間培養した。その結果、コントロールの siRNA を導入した

卵では成長後に NLB が正常に形成された一方で、NPM2 発現抑制卵では NLB が有意に小さくなった(図 6)。この結果から、NPM2 は NLB 構築に必須であることがわかった。

以上より、卵成長過程における NLB 形成機構に関して図 7 のようなモデルを提示する。卵成長に伴い rRNA 合成活性が低下するが、そのときに核小体を構成していたタンパク質は核小体から減少していく。一方で NPM2 は K-rich motif を用いて rRNA 合成非依存的に核小体/NLB に集積する。それにより核小体タンパクと NPM2 が徐々に入れ替わり、最終的に NPM2 が主要に構成する NLB が構築されるものと思われる(図 7)。

2. NLB の機能解析

NLB は受精後の初期発生に必須であることが知られているが、その具体的な機能はわかっていない。そこで NLB の役割を明らかにするために、顕微操作により作製した NLB 除去卵の表現型を解析した。体外成熟後、第二減数分裂中期 (MII 期) に到達した NLB 除去卵を受精させたところ、雌性前核は正常に形成された一方で、雄性前核のクロマチン脱凝集遅延が観察された(図 8)。そのような胚では 1 細胞 M 期において雄性ゲノムが異常に凝集した染色体構造を生じ(図 8)、その後 2 細胞期以降徐々に卵割を停止することがわかった。精子内部のクロマチンは非常に凝集しており、受精後の前核形成時にその凝集は解かれる(脱凝集する)。NLB 除去卵の表現型から、成熟過程で細胞質に拡散した NLB 構成因子が卵細胞質に入り込んだ精子のクロマチン脱凝集に関与することが考えられた(図 10 参照)。

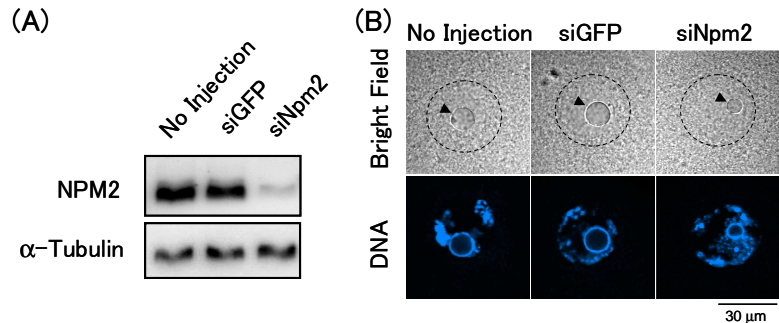


図6. NPM2発現抑制卵におけるNLB形成
(A) siRNAによるNPM2の発現量の変化を抗NPM2抗体を用いたイムノブロッティングにより確認した。(B) 卵成長後に形成されたNLB(矢頭)。点線は核を示す。

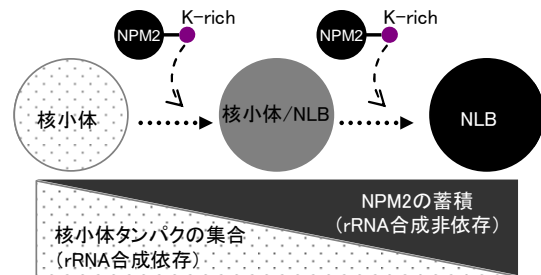


図7. NLB形成機構のモデル

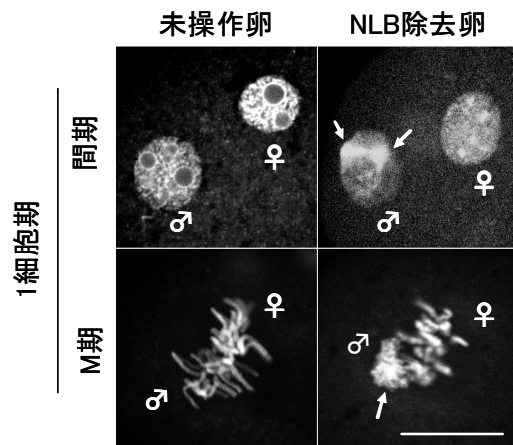


図8. 1細胞期における雄性前核(♂)および雌性前核(♀)のクロマチン形態(矢印;凝集したクロマチン), Bar = 30 μm

NLB の主要な構成タンパク質である NPM2 が精子クロマチン脱凝集に関与するかどうか調べるために、NLB 除去卵に NPM2 の mRNA を顕微注入したところ、雄性前核のクロマチン脱凝集異常が回復した。そして *in vitro* で合成し精製した NPM2 タンパク質を精子とインキュベートすると、精子のクロマチンが脱凝集することがわかった(図 9)。さらに、NPM2 ノックアウトマウス由来の受精卵を調べたところ、雄性前核のクロマチン脱凝集が遅延していることが確認された。以上の結果から、初期発生過程における NLB の役割として、成熟中に細胞質に拡散した NLB 構成因子の NPM2 が受精後の精子クロマチンの脱凝集を促進することで正常な雄性前核の形成に貢献することが明らかになった(図 10)。

最後に、NPM2 が成長卵において NLB に局在する意義を調べるために、図 6 の実験系を用いて NPM2 を核質に発現させた卵を作成した。すなわち、K-rich motif を欠損した変異 NPM2 (NPM2^{ΔK}) (図 4 参照) が NLB に局在できずに核質に留まることを利用して、NPM2^{ΔK} mRNA を siNpm2 と同時に顕微注入することで、内因性の NPM2 を NPM2^{ΔK} で置き換えた。その結果、他の実験群(図 6)および siNpm2 と同時に野生型 NPM2 mRNA を顕微注入したコントロール群では 78-98%の卵が正常に成長を完了した一方で、核質に NPM2^{ΔK} が発現した卵は 32%しか成長できなかった(図 11、 $P < 0.01$)。このことから、卵成長時に NPM2 が核質に局在してはいけないことが示唆された。成長卵における NLB の機能として、精子クロマチンリモデリング活性を持つ NPM2 が母性クロマチンに作用してしまうことを防ぐために NPM2 を隔離しておくという役割を持っているのかもしれない。

【結論】

長年の間謎に包まれていた卵に特徴的な NLB という構造体に関して、本研究では NPM2 がその主な構成タンパク質であることを見出し、NLB 形成機構に関して、NPM2 が K-rich motif を用いて rRNA 合成非依存的に成長期卵の核小体に蓄積することが NLB の構築に重要であることを明らかにした。そして受精後の機能として、成熟過程で細胞質中に拡散した NPM2 が精子クロマチンの脱凝集に関与していることを明らかにした。この成果は哺乳類において精子脱凝集関連因子を同定した初めての例であり、今後精子の脱凝集メカニズムのさらなる解明に繋がるであろう。NLB 内部に他にどのような因子が存在するのか、なぜ NLB のような高密度な構造体を形成する必要があるのかなどいくつかの興味深い疑問は残されているものの、本研究は NLB を分子生物学的に探求した初めての研究であり、NLB に関する知見をこれまでになく深めたといえる。

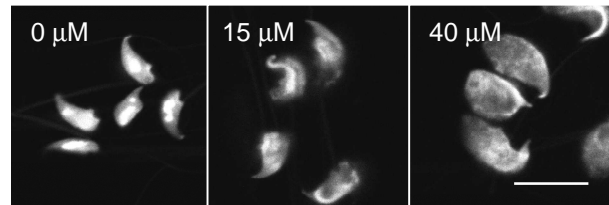


図9. 上記濃度のNPM2タンパク質と24時間インキュベートした後の精子のクロマチン(Bar = 10 μm)

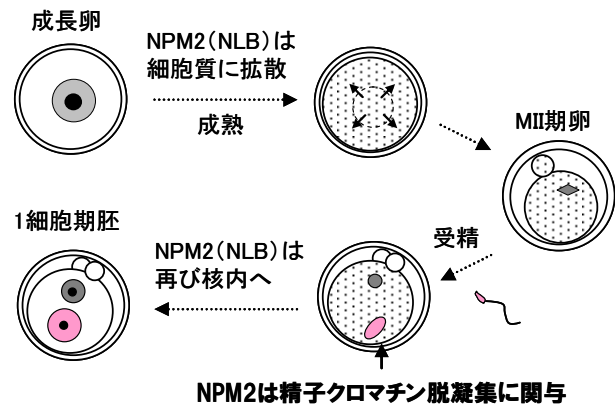


図10. NLB構成因子NPM2の機能

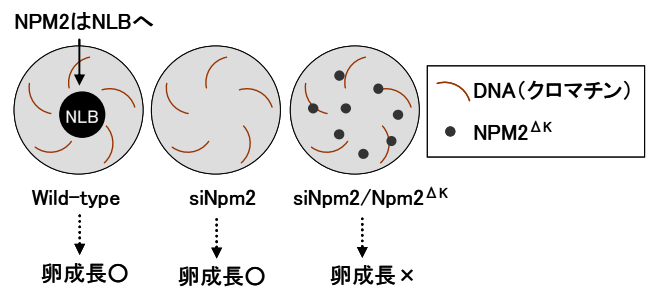


図11. 成長卵の核内におけるNLBの機能