

## 論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成 25 年度博士課程入学

小沼 あすか

(指導教員 内藤 邦彦)

論文題目 ブタ卵母細胞における核外移行システムの機能解析

卵母細胞は、従来から遺伝学、生殖学分野の研究に広く用いられているが、近年では受精卵を用いたゲノム編集技術によるゲノム改変個体の作出や、それを介した遺伝子の機能解析など、発生工学分野の研究も盛んに行われ、重要度が増している。哺乳類の卵母細胞は、胎児期から第一減数分裂前期で減数分裂を停止した状態で卵巣内に保持されており、この卵母細胞には体細胞核とは異なる独自の「核」である巨大な卵核胞 (GV) が形成されている。この状態は卵核胞期 (GV 期) と呼ばれるが、卵母細胞は GV 期のままで長期間維持され続け、性成熟以降に減数分裂を再開し受精能を獲得する。この哺乳類の卵母細胞において機能が明らかにされていない機構の一つに、核移行システムがある。一般的に 50 kDa 以上のタンパク質や核酸の核移行には核移行レセプターの関与が必要であり、各種の核移行レセプターはカーゴ (輸送対象物質) 内に存在する核内移行シグナル (NLS) や核外移行シグナル (NES) という一定の配列を認識して結合し、核内外への移行を行う。核移行システムの機能は、これまで主に体細胞を用いた研究によって明らかにされ、初期には両生類卵でも検討されたが哺乳類の卵母細胞における検討は現在でも非常に限られており、核移行システムに関与する因子が GV 期卵に存在し機能しているかも不明である。以上の背景より、本研究では多くの生殖学分野の研究に用いられ細胞内因子の機能解析手法も確立されているブタの卵母細胞を材料に用い、哺乳類の GV 期卵において核移行システムが機能しているか、さらにこのシステムが卵の時期により変動するか、また GV 期維持、減数分裂再開の制御機構に対して影響を与えるかについて解析することを目的とした。

第一章では発生工学的観点から、近年着目されているゲノム編集技術である CRISPR/Cas システムにおいて、核内で機能する Cas9 スクレアーゼの活性制御に核移行システムが関与するかを解析することにした。CRISPR/Cas システムではガイド RNA の認識するゲノム配列に Cas9 が DNA 2 本鎖切断を誘導することを利用して遺伝子変異を導入する。現在までに発生胚や体細

胞ではゲノム改変個体の作出に寄与しているが、GV期卵における検討は行われておらず、大分子である Cas9 が GV 期卵で核内移行し機能するかは不明である。そこでまずブタ GV 期卵に Cas9 をガイド RNA と共に顕微注射しゲノムへの変異導入を解析した。その結果、培養により核膜崩壊を起こした卵では 81%に変異が導入されたのに対し、GV 期そのまま維持した卵では変異の導入が全く確認されなかった。つまり、GV 期卵では核膜の存在によって、Cas9 の核 DNA への接触が制限されている可能性が示唆された。GV 期卵の Cas9 局在を解析するため改良緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 付加 Cas9 を卵内で発現させると、多くは Cas9 が GV 内よりも細胞質に多く存在しており、GV 期卵では導入された Cas9 は核移行システムに関連する原因によりその活性を制御されている可能性が考えられた。そこで核外移行レセプターエクスポーチン (XPO) 1 の特異的阻害剤である leptomycin B (LMB) 処理による Cas9 の局在と機能への影響を解析した。すると LMB 処理卵では GV 内の Cas9 存在量が無処理卵よりも増加することが確認され、さらに GV 期維持卵であっても核外移行阻害により 16.7%の卵でゲノムに変異が導入されていた。以上より、卵母細胞内でも核移行システムが機能していることが確認され、その働きにより核内で機能する因子の活性が制御され得ることが示唆された。また本検討を通し、発生工芸技術を用いる際に核移行システムの機能について考慮することの重要性が改めて示された。

第二章では、第一章で卵母細胞における核外移行機能の存在が示唆されたことから、核外移行レセプター XPO1、XPO6 に着目し、卵におけるそれぞれの発現や機能活性を詳細に検討した。まず内在性 XPO1、XPO6 タンパク質の発現を成長卵で検出すると、それぞれタンパク質が存在することが確認され、また卵成熟に伴いその量は減少することが示された。GV 期を維持した状態でタンパク質の合成を阻害すると XPO6 タンパク質量は減少したのに対し、XPO1 量は変化しなかったことから、GV 期維持卵では内在性 XPO1 は合成や分解による制御を受けずに安定して存在すること、一方 XPO6 は合成と分解のバランスによりその量が一定に保たれていることが示唆された。続いて GV 期卵の全 RNA より XPO1、XPO6 の cDNA をクローニングし、この配列を基に *in vitro* 合成した mRNA を各時期の卵に注入して過剰発現を行い、カーゴの卵内局在の変化を指標として XPO1、XPO6 の卵での機能を解析した。本実験では、これらの活性が卵の時期により変化する可能性についても解析する目的で、減数分裂を再開する能力を持つ成長期を終了した卵 (成長卵) に加え、この能力を持たない成長途中の卵 (成長途上卵)、および減数分裂を終了した卵 (前核期胚) も用いて解析した。なお、XPO1 のカーゴとしては snurportin-1 (SNUPN) と WEE1B を、XPO6 のカーゴとしては  $\beta$ -アクチン (ACTB) を用いた。カーゴに付加した EGFP の蛍光または免疫染色により、核と細胞質の局在比を算出したところ、XPO1

の過剰発現では全ての時期の卵で明確なカーゴの核内局在の減少が確認され、核外移行機能が示された。また、この核外移行活性は輸送するカーゴの種類や卵の時期によっても異なることが示唆された。一方、XPO6は成長卵でのみ核外移行機能が確認され、成長途上卵および前核期胚では機能が確認されなかった。この要因の探索として各時期の卵における内在性 XPO6、および外因性 XPO6 の発現を解析すると、成長途上卵ではタンパク質量が低く、XPO6 は卵の時期により分解制御を受け、アクチン局在を調節していることが示唆された。

第三章では、第二章で確認された GV 期卵における XPO1、XPO6 による核移行バランスの制御が、GV 期維持や減数分裂再開の制御機構に関与するかを検証した。実際に、減数分裂再開時に起きる卵核胞崩壊 (GVBD) の直前には、M 期/成熟促進因子 (MPF) や、MPF 活性の制御因子の局在変化が起こることが報告されており、これらの因子の活性制御には核移行システムの機能関与が示唆される。まず LMB の添加培養により XPO1 の機能阻害を行ったところ、無添加区より GVBD 率、成熟率が低下した。しかし培養時間の延長によりその効果はみられなくなったことから、XPO1 の阻害により GVBD の発現が遅延することが示唆された。反対に XPO1 過剰発現により機能促進を行うと、GVBD が早期化することが示された。その一因として、GV 内で MPF 活性を阻害している WEE1B を XPO1 が早期に核外移行させていることが考えられたため、WEE1B 活性維持条件下で WEE1B と XPO1 の共発現を行い、WEE1B 活性に対する XPO1 の効果を解析した。その結果、WEE1B 単独の過剰発現では多くの卵が GV 期で維持されたが、XPO1 の共発現により無注入区と同程度に GVBD が誘起された。この時導入された WEE1B のタンパク質量は減少する傾向がみられ、核外へ移行した WEE1B が分解されることでさらに活性が低下する可能性が考えられた。これらの結果より、XPO1 は WEE1B の核外移行制御を介して減数分裂再開の制御に関与することが明らかとなった。さらに生理的条件下では減数分裂再開能を持たない成長途上卵においても、XPO1 過剰発現により半数程度の卵で GVBD が誘起されることが確認された。つまり XPO1 による何らかの因子の局在制御のみで、成長途上卵にも減数分裂再開を誘起可能であることが示された。また、XPO6 の過剰発現では GVBD 開始時間は変化させずに GVBD に要する時間が短縮したことから、XPO6 はアクチンの核外移行を促進することにより GVBD の進行時間を制御していることが示唆された。以上より、XPO1、XPO6 の関与する核移行バランスの制御は、GV 期維持や減数分裂再開の制御機構に大きく関与していることが明らかとなった。

以上より、本研究は哺乳類の卵母細胞で核外移行レセプターの XPO1、XPO6 が機能するこ

と、さらにその機能が核内因子の活性や GV 期維持、減数分裂再開の制御機構において重要な役割を果たしていることを明確に示した初めての報告である。本研究で得られた核移行システム機能に関する知見は、遺伝学や生殖学分野とともに発生工学分野の発展にも役立つと考えられ、核移行システムの機能を応用することで発生工学技術の効率向上にも寄与すると期待される。