

## リン酸化 Ser/Thr 脱リン酸化酵素 PP2C $\beta$ の生殖機能における役割の解明

### [1] 組織

代表者：藤井 順逸  
(山形大学大学院医学系研究科)  
対応者：田村 眞理  
(東北大学加齢医学研究所)  
分担者：  
小林 孝安 (東北大学加齢医学研究所)  
木村 直子 (山形大学大学院農学研究科)

研究費：物件費40万円

### [2] 研究経過

#### 【目的】

子供を希望しても得られずに苦しむ夫婦は出産年齢の2割にも及ぶため、不妊症治療の成功率の向上はこうした夫婦の精神的・経済的負担を軽減し、さらに少子化対策にも繋がる。不妊症治療のための生殖医療や、産業動物の効率的生産をめざす動物繁殖学の分野では体外受精・培養が行われるが、その過程でさらされる様々な外的要因によって成功率は大きく影響される。こうした要因の中でも活性酸素による酸化障害は成功率に多大の影響を与えることが知られている。また加齢した母胎から得られた配偶子を用いた場合の成功率は著しく低く、それは配偶子の老化が原因と考えられている。この配偶子の老化にも活性酸素が重要な役割を果たしていることから、その機構解明が求められている。

細胞の増殖・分化においてはタンパク質のリン酸化・脱リン酸化が細胞内のシグナル伝達において中心的な役割を担っており、活性酸素は主に脱リン酸化酵素の活性制御に関係する事が近年明らかになってきた。しかし、配偶子や初期胚は小さいうえに複雑な過程が関与することから、一般細胞に比べて解明が遅れている。

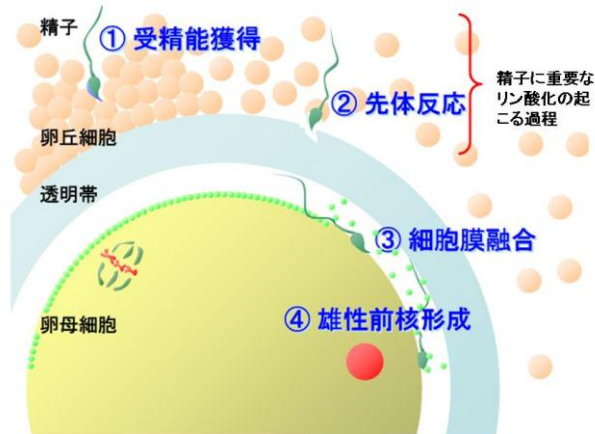
本研究は、リン酸化 Ser/Thr 脱リン酸化酵素として配偶子・初期胚発生における重要性が示唆されている PP2C  $\beta$  遺伝子改変マウスを用いて解析を行う

ことで、配偶子形成ならびに胚発生におけるリン酸化シグナル伝達経路と酸化ストレスの関係を調べ、配偶子の老化機構とその胚発生に与える影響を明らかにすることを目的とする。

#### 【概要】

本研究では、田村・小林らの作成した PP2C  $\beta$  遺伝子改変マウスと藤井らの所有する SOD1 遺伝子改変マウスを用いて、タンパク質のリン酸化・脱リン酸化と酸化ストレスとの関係について解析を行う。これまでに本遺伝子改変マウスを用いた解析から、PP2C  $\beta$  のヘテロ欠損マウスでは配偶子形成は正常に起こるが、ホモ欠損胚は2細胞期から8細胞期の間で死ぬことが分かっている。(Mech Dev, 2007)。

一方、藤井・木村は配偶子ならびに初期胚発生における酸化ストレスの影響を、抗酸化酵素の遺伝子の一つである SOD1 を欠損するマウスを用いて研究し、配偶子の機能や胚発生への影響を報告して来た (Mol Hum Reprod, 2010; Biol Reprod, 2012)。(図参照)



リン酸化と脱リン酸化が重要な役割を果たす受精過程

本研究では、PP2C  $\beta$  遺伝子欠損マウスの配偶子形成と受精・胚発生の過程について、酸化ストレスと老化の観点からさらに詳細な検討を行う。また、SOD1 欠損マウス由来の配偶子や初期胚を用いて、リン酸化・脱リン酸化の過程と、PP2C  $\beta$  遺伝子の果たす役

割について検討する。具体的には、次の3項目について調べ、両遺伝子の機能的関連を調べる。

(I) PP2C $\beta$  (-/-)胚が胎生致死となる原因を明らかにするために、初期胚の発生過程について解析する。

(II) 正常な生殖能を有する PP2C $\beta$ ヘテロ欠損マウスと、申請者らの所有する SOD1 欠損マウスを交配して、PP2C $\beta$ のヘテロ欠損マウスに酸化ストレスを負荷することで、配偶子や胚発生がどのような影響を受けるか調べる。

(III) floxマウスとCre-Tgマウスを交配することで、精巣特異的に PP2C $\beta$ を欠損するマウスを作製し、精子形成と精子の機能を解析する。

#### 【研究打合せ】

本研究を開始するに当たって、2013年3月に藤井が加齢医学研究所を訪れて研究打合せを行った。その後は、電話やe-mailなどにより随時連絡をとり、研究材料の提供を受けて、進行状況の確認ならびに計画についての打ち合わせを行ってきた。

#### [3] 成果

##### (3-1) 研究成果

(1) 研究ではPP2C $\beta$ 遺伝子改変マウスを用いるため、本年度は実験に供するマウスに関する緒手続きを行い、マウスを山形大学動物実験施設に搬入した。

1、山形大学における「組換えDNA実験に関する実験計画」の承認を得て、その後に「動物実験に関する実験計画」の承認を得た。

2、使用するマウスは、現在は中部大学応用生物学部・大西素子教授が飼育・管理されていることから、同機関から譲渡の承認を得て、9月までは必要なマウスの繁殖をお願いした。

3、10月にPP2C $\beta$ ヘテロ欠損マウスならびにコンディショナルノックアウトマウスの作成に必要なfloxマウスを中部大学から山形大学に搬送した。

4、山形大学動物飼育施設では業者以外からの搬入動物については検疫が義務付けられているため、繁殖を開始する前に検疫室にて2~3カ月の間飼育し、病原菌の検査を行った。その結果、感染が認められたため、2013年1月よりクリーニングを進めている。

クリーニングマウスが成長した段階で目的の遺伝子型を有するマウスをSPF飼育室に移して繁殖し、検討に供する予定である。

##### (3-2) 波及効果と発展性など

本研究は、田村・小林(東北大学加齢医学研究所)と藤井・木村(山形大学)との間で行う初めての行う共同研究として開始した。その後、大西素子教授(中部大学)が加わり、現在は3機関の共同研究として進めている。

本研究によって配偶子形成や受精・発生におけるリン酸化シグナルと酸化的障害を理解することで、生殖医療の向上や産業動物の効率的生産を可能とし、医療の発展や食材の安定供給による経済効果を社会にもたらすことが期待される。

#### [4] 成果資料

記載すべき成果はまだありません。