

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	佐久川直子
学位論文題目			
Isolation of the human <i>ePAB</i> and <i>ePABP2</i> cDNAs and analysis of the expression patterns (ヒト <i>ePAB</i> 遺伝子、ヒト <i>ePABP2</i> 遺伝子の単離およびその発現様式の解析に関する研究)			
共著者名			
宮本敏伸、佐藤 恒、石川麻希子、堀川道晴、林 博章、石川睦男、千石一雄			
未公表			
研究目的			
<p>今日の不妊症治療として体外受精(IVF)は欠くことができないが、その最大の問題点は複数個の胚移植による多胎妊娠である。近年は多胎妊娠の回避と妊娠率の向上のため通常より分割の進んだ着床時の stage である胚盤胞の単一胚移植が広く行われている。しかし、必ずしも全ての受精卵が胚盤胞まで分割するわけではなく、また全く分割さえしないケースも存在する。ヒトの卵割の詳細なメカニズムは未だ不明だが、思春期での卵母細胞の減数分裂の再開や初期胚の分割を制御するのは母由来の mRNA とされており、その翻訳活性の最初のステップは細胞質でのポリアデニル化である。この細胞質で新たに伸長された poly(A)tail に結合するタンパクが poly(A) binding protein (PABP) であり、これまで2つのグループが報告されている。<i>PABP1</i> は最初のグループでN末端側の4つの RNA recognition motif(RRM)とC末端側の PABP ドメインから構成され、卵母細胞と初期胚以外の全ての細胞に発現する。一方 <i>PABPNI</i> は単一の RRM からなり PABP ドメインを欠き、卵母細胞と初期胚を含む全ての細胞に発現する後者のグループである。embryonic poly(A)-binding protein (ePAB)は前者で、<i>Xenopus</i> の初期胚で優位に発現し poly(A)tail の伸長や母由来の mRNA の翻訳活性の調節が示唆されている。近年マウス <i>ePab</i> 遺伝子が報告され、卵形成及び着床前胚で優位に発現する (1)。また構造上後者の PABP と類似した embryonic poly(A)-binding protein 2 (ePABP2)がマウスなどで同定され、組織での発現は卵巣や初期胚に優位である(2)。今回我々はヒト <i>ePAB</i> および <i>ePABP2</i> 遺伝子を単離し、その組織発現パターンならびに卵母細胞、着床前胚における細胞レベルでの発現を解析したので報告する。</p>			

材 料 ・ 方 法

NCBI Genbank にてヒトゲノムにおいてマウス *ePab* とアミノ酸レベルで相同性を有する部位を検索し、プライマーを設定しヒト卵巣 cDNA library を用いて PCR を行い、PCR 産物をサブクローニングし DNA を抽出、シーケンス解析を施行した。さらに RACE 法により cDNA 全長を同定した。NCBI blast により cDNA の配列とヒトゲノム配列を比較し、全てのエクソン-イントロンボーダーを同定した。

次に Human multiple tissue cDNA パネルを用いて PCR を行いヒト成人組織における発現様式を解析した。さらに未受精卵および着床前胚を用いて細胞レベルでの発現を解析した。使用した卵は IVF 施行時に生じた臨床上不必要な、本来破棄されるヒト未受精卵および分割卵で、使用にあたり全ての患者から文書による同意および旭川医科大学倫理委員会の承認を得た。70 個の未受精卵および着床前胚から抽出した RNA を用いて RT 反応を施行し、未受精卵および着床前胚各々5 個分に相当する cDNA を用いて PCR を行った。ヒト *ePAB* と同様に *ePABP2* cDNA の単離、組織発現パターンを解析した。

成 績

ヒト *ePAB* は 330 個のアミノ酸をコードし、20 番染色体(20q12-q13.1)に位置する。14 のエクソンから構成され全長は 29.2kb であった。マウスとのアミノ酸レベルでの相同性は 72%、ヒト *PABP1* との相同性は 61%であった。マウス *ePab* は N 末端に 4 つの RRM と C 末端に PABP ドメインを有するが、ヒト *ePAB* では 3 つの RRM さらに PABP ドメインを欠いていた。マウス *ePab* 遺伝子には選択的スプライシングによりエクソン 11 を欠くバリエーションが存在したがヒトでは認めなかった。マウスでは卵巣特異的に発現がみられたがヒトでは卵巣以外でも発現していた。細胞レベルでは、マウスでは卵母細胞から 2 細胞期までの発現を認め、それ以降では消失していた。一方ヒト *ePAB* は未受精卵から胚盤胞胚まで全ての stage で発現していた。

ePABP2 は 282 個のアミノ酸をコードし 16 番染色体(16q24.3)に位置する。マウスとのアミノ酸の相同性は 68%、核酸レベルでは 45%であった。*ePABP2* 遺伝子は 7 つのエクソンで構成され全長は 3.2kb であり、構造においては *PABPNI* を含む typeII の PABP と同様、RRM は 1 つのみで PABP ドメインは認めなかった。TypeII の PABP の RRM における相同性は 75%であった。マウスでは卵巣特異的であったがヒトでは *ePAB* 同様、卵巣以外の組織にも発現していた。

考 案

PABP は N 末端側の 4RRMs と C 末端側の PABP ドメインで構成される。RRMs は poly(A) に結合し翻訳開始因子である eIF4G にも結合する。RRM1,2 は poly(A) に特異的であり RRM4 は非特異的な RNA 結合に関与する。C 末端領域は PABP 同士の相互作用に影響し poly(A) に結合するのに必要とされる(3)。また C 末端領域は mRNA の安定、核輸送、PABP 自体の mRNA の翻訳抑制への関与が報告されており、ヒト *ePAB* の C 末端領域の欠損はこれらに何らかの影響があると考えられる。

マウスでは卵母細胞の成熟から胚初期の分割まで母由来の遺伝子活性に制御され、2 細胞期から胚自身の遺伝子活性が始まる。マウス *ePab* の発現は排卵前の卵母細胞に認められその後徐々に減少し 4 細胞以降は認められないが、マウス *PABP1* は、8 細胞期頃から発現が強くなり胚盤胞でより顕著となる。*ePab* から *PABP1* への発現のシフトはマウスの母由来から胚自身の遺伝子活性の移行の時期に一致し、マウス *ePab* の母由来の遺伝子発現の制御への関与が示唆される。ヒトの胚の翻訳活性は 4~8 細胞期から始まる。ヒト *ePAB* は卵母細胞から胚盤胞まで発現するが、特に 2~8 細胞期で強く胚盤胞では著減した。しかしマウスと異なり性腺特異的な発現を認めないことから、ヒト *ePAB* が母由来 mRNA の翻訳活性に関連する可能性については更なる解析が必要と思われる。

PABPN1 は mRNA プロセッシングにおける poly(A)tail のサイズを調節する核タンパクである。マウス *ePabp2* は構造上 PABPN1 と類似し *ePab* 同様卵巣および初期胚に特異的なタンパクであり、新たな細胞質 RNA 結合タンパクとして *ePab* 同様母由来の mRNA の翻訳活性の調節に関与する可能性が示唆されている。ヒト *ePABP2* は *ePabp2* の RRM に最も類似していた。

結 論

本研究において、卵分割に関与する可能性のある遺伝子ヒト *ePAB* 及び *ePABP2* を単離した。マウスと異なりその発現は卵巣特異的ではなかった。しかしながら、卵母細胞から胚盤胞の卵割期に優位に発現する新たな PABP ファミリーである可能性が示唆され、今後さらなる解析が必要と思われる。

引用文献

1. Seli E, Lalioti MD, Flaherty SM, Sakkas D, Terzi N, Steitz JA. An embryonic poly(A)-binding protein (ePAB) is expressed in mouse oocytes and early preimplantation embryos. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:367-372.
2. Good PJ, Abler L, Herring D, Sheets MD. Xenopus embryonic poly(A) binding protein 2 (ePABP2) defines a new family of cytoplasmic poly(A) binding proteins expressed during the early stages of vertebrate development. Genesis 2004; 38: 166-175.
3. Melo EO, Dhalia R, de Sa CM, standae N, de Melo Neto OP. Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain. J Biol Chem 2003; 278: 46357-46368.

参考文献

1. Miyamoto T, Sato H, Yogev L, Kleiman S, Namiki M, Koh E, Sakugawa N, Hayashi H, Ishikawa M, Lamb DJ, Sengoku K. Is a genetic defect in Fkbp6 a common cause of azoospermia in humans? Cell Mol Biol Lett. 2006; 11(4): 557-69.
2. Miyamoto T, Young S. Yu, Sato H, Hayashi H, Sakugawa N, Ishikawa M, Sengoku K. Mutational analysis of the human *MBX* gene in four Korean families demonstrating microphthalmia with congenital cataract. Turk J Pediatr. 2007; 49: 334-336.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	佐久川 直子
<p>審査委員長 藤 枝 憲 二 ㊞</p> <p>審査委員 立 野 正 敏 ㊞</p> <p>審査委員 千 石 一 雄 ㊞</p> <p>審査委員 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Isolation of the human ePAB and ePABP2cDNAs and analysis of the expression patterns</p> <p>(ヒト ePAB 遺伝子、ヒト ePABP2 遺伝子の単離および その発現様式の解析に関する研究)</p>			
<p>体外受精の最大の問題点は複数個の胚移植による多胎妊娠である。通常より分割の進んだ着床時の stage である胚盤胞の単一胚移植が多胎妊娠の回避と妊娠率の向上に寄与することが知られている。しかし、その成績は不十分である。またヒトでの卵割の分子機構について不明な点が多い。</p> <p>論文提出者は、思春期での卵母細胞の減数分裂再開や初期胚分割を制御する母由来の mRNA の翻訳活性の最初のステップである細胞質でのポリアデニル化に注目し、卵割の分子機構を明らかにする研究を行った。Poly(A) binding protein (PABP) は、新たに伸長された poly(A) tail に結合するタンパクであるが、近年マウスにおいて embryonic</p>			

poly(A)-binding protein(ePab)遺伝子が、卵形成・着床前胚で優位に発現し、また構造上 PABP と類似した embryonic poly(A)-binding protein 2 (ePABP2)が、卵巣・初期胚に優位に発現していることが明らかにされた。そこで、論文提出者は、このマウス cDNA をもとにヒト ePAB および ePABP2 遺伝子を単離し、その組織発現を検索した。

ヒト ePAB 遺伝子は、全長 29.2kb で 20 番染色体(20q12-q13.1)に局在し、14 ケのエクソンからなり、330 個のアミノ酸をコードし、マウスとのアミノ酸レベルでの相同性は 72%、ヒト PABP1 との相同性は 61% であった。マウス ePab は N 末端に 4 つの RNA recognition motif(RRM) と C 末端に PABP ドメインを有するが、ヒト ePAB では 3 つの RRM さらに PABP ドメインを欠いていた。マウス ePab 遺伝子には選択的スプライシングによりエクソン 11 を欠くバリエーションが存在したがヒトでは認めなかった。マウスでは卵巣特異的に発現がみられたがヒトでは卵巣以外でも発現していた。細胞レベルでは、マウスでは卵母細胞から 2 細胞期までの発現を認め、それ以降では消失していた。一方ヒト ePAB は未受精卵から胚盤胞胚まで全ての stage で発現していた。

ePABP2 遺伝子は 282 個のアミノ酸をコードし 16 番染色体(16q24.3)に局在した。マウスとのアミノ酸の相同性は 68%、核酸レベルでは 45% であった。ePABP2 遺伝子は 7 つのエクソンで構成され全長は 3.2kb であり、構造においては PABPN1 を含む typeII の PABP と同様、RRM は 1 つのみで PABP ドメインは認めなかった。TypeII の PABP の RRM における相同性は 75% であった。マウスでは卵巣特異的であったがヒトでは ePAB 同様、卵巣以外の組織にも発現していた。

今回単離したヒト ePAB, ePABP2 遺伝子は、その構造、組織局在、またその機能がマウスと異なることが示されたが、卵母細胞から胚盤胞の卵割期に優位に発現する新たな PABP ファミリーである可能性も示唆され、ヒトにおける卵割に関わる因子同定への糸口となるものであり、その意義は大きい。

試問審査においても、非常に適切で論理的解答がなされ、関連する分野においても十分な知識を有していることが確認された。

以上の結果から、申請者の論文は医学博士の学位に値するものと判定された。