

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05979

研究課題名(和文) 初期胚のタンパク質分解におけるN末端則経路に関する研究

研究課題名(英文) N-end rule pathway of protein degradation in early development.

研究代表者

黒坂 哲 (Kurosaka, Satoshi)

近畿大学・先端技術総合研究所・准教授

研究者番号：30625356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス卵母細胞および初期胚においてアルギニル化されるタンパク質の検出に成功し、これらの中でN末端則経路を介して分解されることが予想できる11種類のタンパク質を発見することができた。しかしながら、研究期間内にこれらのタンパク質の動態を明らかにするには至らなかった。また、ATE1を欠失した卵母細胞を得ることができなかったため、アルギニル化が起こらない胚の解析を実施することができなかった。以上のように、本研究では当初の目的を達成することはできなかったが、ATE1が雌性配偶子形成に必須であることが示唆されたのは本研究の成果のひとつであり、今後の研究の発展が期待できるものであると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

受精直後の胚は卵細胞質に蓄積された母性タンパク質を利用して発生を進めるが、それと同時に母性タンパク質を分解することも必要である。N末端則経路を介したタンパク質の分解はこれまで初期胚では調べられておらず、本研究においてそのターゲットの候補となるタンパク質を検出できたことは、初期発生におけるタンパク質分解メカニズムの研究の発展につながるものであると考える。また、本研究では、ATE1が雌性配偶子形成に必須である可能性を提示した。これらの成果は、配偶子や初期胚の今後の研究に貢献できる可能性があるほか、生殖医療や家畜生産の現場での応用につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, arginylated proteins were detected in mouse oocytes and preimplantation embryos by LC-MS/MS. Eleven of them were identified as the candidates of the targets of the proteolysis via N-end rule passway. However, we were not able to do future analyses on the behavior or degradation of those proteins. We were not able to analyze the embryo derived from ATE1-depleted oocytes, because we failed to obtain ATE1-depleted oocytes from ATE1-CKO mice. The results obtained are not enough to achieve the purpose of this study. However, one of our results suggests that ATE1 is essential for female gametogenesis, providing interesting direction for the future study.

研究分野：細胞生物学、発生生物学、生殖生物学

キーワード：N末端則経路 アルギニル化 初期胚

## 1. 研究開始当初の背景

受精卵は、高度に分化した細胞である配偶子（精子と卵子）の融合により形成される全能性細胞である。分化細胞同士の融合により全能性（個体発生能）を有する未分化細胞が形成されることは生物学における非常に興味深い現象であり、人為的に全能性を誘導した John Gurdon の研究成果は山中伸弥による iPS 細胞の樹立とともに 2012 年度のノーベル賞の受賞対象となった。分化細胞が全能性を獲得するメカニズムは未だ解明されていないが、その過程にはクロマチン構造の変化、胚ゲノム由来の遺伝子発現、母性 mRNA の分解、母性タンパク質の分解といった現象が含まれる。これらの現象それぞれに関する研究の推進が基礎と応用の両面において大きな意味をもつことは上記から明らかである。

受精直後の胚は卵細胞質に蓄積された母性タンパク質を利用して発生を進めるが、それと同時に母性タンパク質を分解することも必要であり、これは全能性獲得の過程のひとつであると考えられている。N 末端則とは、タンパク質の寿命がアミノ末端（N 末端）残基に依存するという法則で、真核生物で広く保存されている。特に N 末端残基がアルギニンであるペプチドは、主要なタンパク質分解経路であるユビキチン-プロテアソーム経路によって急速に分解されることが知られており、その反応はアルギニル化とよばれる翻訳後修飾により促進される。アルギニル化は、アルギニン転移酵素（ATE1）のはたらきによって、タンパク質にアルギニンがペプチド結合する翻訳後修飾であり、ATE1 は発生に必須である。アルギニル化を介してユビキチン-プロテアソーム系でタンパク質を急速に分解するというメカニズムは、単時間に劇的な変化が必要な初期胚発生や全能性獲得の特性と合致すると思われるが、初期胚発生におけるアルギニル化についての報告は現在のところ皆無である。全能性獲得という極めて重要な生命現象において、多くの生物で保存されているタンパク質分解経路および必須な翻訳後修飾の重要性を明らかにすることは、学術的に大きな意義をもつ。

また、本研究によってアルギニル化・N 末端則経路の重要性が示されることになれば、初期胚における ATE1 タンパク質の量を人為的にコントロールすることで胚の発生能を向上させる可能性を提示することができる。これは動物生産や生殖医療に大きく貢献するものである。

## 2. 研究の目的

本研究は、初期胚発生における母性タンパク質分解への N 末端則経路のかかわりを明らかにすることで、全能性獲得メカニズムの解明に迫ることである。

## 3. 研究の方法

研究目的を達成するため、本研究では 1) アルギニル化を受けて N 末端則経路を介して分解されるタンパク質の同定、2) アルギニル化が起こらない胚すなわち ATE1 を欠失した胚の解析を試みた。

### 1) マウス卵および初期胚において N 末端則経路を介して分解されるタンパク質の同定

代表者のこれまでの研究で、第二減数分裂中期（MII 期）のマウス卵母細胞に ATE1 がアルギニル化を受けてユビキチン-プロテアソーム系で分解されるタンパク質が卵子中に存在することが予想できる。そこで、マウス卵母細胞および初期発生の各発生段階の体外受精胚においてアルギニル化されているタンパク質を検出し、これらの中で N 末端則経路を介して分解されるタンパク質の同定を試みた。また、これらのタンパク質がユビキチン-プロテアソーム系で分解される可動かを調べるため、プロテアソーム阻害剤 MG132 の存在下で培養された胚のプロテオーム解析も実施した。供試した卵母細胞および初期胚のステージは、卵核胞期（GV 期、PMSG 投与後 44-46 時間）、第二減数分裂中期（MII 期、hCG 投与後 14 時間）、前核期（PN 期、媒精後 6 時間）、2 細胞期初期（E2C 期、媒精後 21 時間）、2 細胞期後期（L2C 期、媒精後 34 時間）、4 細胞期（4C 期、媒精後 40 時間）、8 細胞期（8C 期、媒精後 55 時間）であり、アルギニル化タンパク質は Triple TOF 5600+システム（SCIEX）を用いた質量分析により検出した。

### 2) ATE1 を欠失した胚の解析

ATE1 ノックアウト胚は ATE1 ヘテロマウス同士の交配でえることができるが、このような胚の場合、卵細胞質中に母親由来の ATE1 を持ち込むことが予想される。そこで、本研究では完全に ATE1 を欠失した胚を得るために、生殖細胞特異的 ATE1 コンディショナルノックアウト（ATE1-CKO）マウスを用いた。ATE1-CKO マウスは、生殖細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する（TNAP-Cre）マウスと ATE1 に loxP 配列を挿入した（ATE1-fllox）マウスとの交配で作製した。ATE1 欠失胚の発生能は、ATE1-CKO マウスの生殖能および ATE1 欠失胚の体外発生能で評価した。

#### 4. 研究成果

##### 1) マウス卵および初期胚において N 末端則経路を介して分解されるタンパク質の同定

各ステージの卵母細胞および初期胚において、ペプチドの N 末端がアルギニル化されているタンパク質の検出を試みたところ、GV 期で 15 種類、MII 期で 21 種類、PN 期で 25 種類、E2C 期で 29 種類、L2C 期で 32 種類、4C 期で 19 種類のタンパク質が候補として検出された。これらの中で、アルギニル化された次のステージでは検出されなかったもの、あるいはアルギニル化された次のステージではアルギニル化されていない形でのみ検出されたものが N 末端則経路を介した分解のターゲットの有力候補となる。本実験の結果、アルギニル化の後に N 末端則経路を介して分解されることが予想されるタンパク質は、MII 期でアルギニル化されて前核期で分解されるものが 4 種類、E2C 期でアルギニル化されて L2C 期で分解されるものが 3 種類、L2C 期でアルギニル化されて 4C 期で分解されるものが 4 種類であった (表 1)。

表 1. アルギニル化の後、N 末端則経路を介して分解されることが予想されるタンパク質

Stages	Protein	Gene	Sites
MII期でアルギニル化 ↓ 前核期では分解	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase, mitochondrial	Mecr	E147
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 4	Ppil4	D145
	Secernin-3	Scrn3	K335
	Transducin-like enhancer protein 6	Tle6	N323
2細胞期初期でアルギニル化 ↓ 2細胞期後期では分解	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6pdx	E416
	MAGUK p55 subfamily member 4	Mpp4	E356
	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7	Chd7	S2608
2細胞期後期でアルギニル化 ↓ 4細胞期では分解	Stress-70 protein, mitochondrial	Hspa9	E222
	Predicted pseudogene 5478	Gm5478	D279
	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	Srrm1	S635
	Kinase D-interacting substrate 220	Kidins220	L1361

MG132 存在化で培養された胚を用いたプロテオーム解析も実施したが、上記の結果をサポートする結果は得られなかった。MG132 自体が胚の発生に大きな悪影響を与えており、アルギニル化やそこから誘導されるタンパク質分解が正しく検出できない可能性が考えられるので、プロテアソームを阻害した胚ではなく、ATE1 を欠失させた胚を用いた解析が必須である。

##### 2) ATE1 を欠失した胚の解析

ATE1-CKO 雌マウスと野生型雄マウスを交配し、ATE1-CKO 雌マウスの生殖能力を調べたところ、ほとんどの ATE1-CKO 雌マウスは正常な生殖能力を有していた。また、ATE1-CKO マウス由来の卵母細胞を用いた体外受精胚の発生を調べたところ、雌個体間の排卵数にばらつきはあったが、受精卵の胚盤胞への発生率は正常であった (表 2)。このことは、卵細胞質中の ATE1 が発生に必須ではないということを示していると考えられるが、このマウスの作製に用いた TNAP-Cre マウスにおいて、目的遺伝子のノックアウト率が 60%程度であるという報告もあり、ATE1-CKO マウスにおいて ATE1 の欠失が十分に起こっていない可能性も考えられる。そこで、ATE1-CKO マウスの MII 期卵母細胞における ATE1 の発現を免疫蛍光染色で調べたところ、全ての卵母細胞で ATE1 の発現がみられた (図 1、表 3)。このことから、ATE1-CKO マウスの全ての生殖細胞で ATE1 の欠失が起こっているわけではなく、欠失が起こらなかった生殖細胞のみが卵母細胞まで成長して排卵されていたことが考えられ、ATE1 が雌性配偶子形成に必須であるという新たな可能性が示唆された。表 2 で示す通り、ATE1-CKO 雌マウスの個体間で胚卵数にばらつきが見られるが、これは各マウスでのノックアウトの効率を反映している可能性がある。

本研究では、マウス卵母細胞および初期胚においてアルギニル化されるタンパク質の検出に成功し、これらの中で N 末端則経路を介して分解されることが予想できる 11 種類のタンパク質を発見することができた。しかしながら、研究期間内にこれらのタンパク質の動態を明らかにするには至らなかった。また、ATE1-CKO マウスから ATE1 を欠失した卵母細胞を得ることができなかったため、アルギニル化が起こらない胚の解析を実施することができなかった。以上のように、本研究では当初の目的を達成することはできなかったが、ATE1 が雌性配偶子形成に必須であることが示唆されたのは本研究の成果のひとつであり、今後の研究の発展が期待できるものだと考える。

表 2. ATE1-CKO マウス由来の卵母細胞を用いた体外受精胚の体外発生能

	No. of Oocytes		No. of Embryos Developed to	
	Ovulated	Fertilized (%)	2-cell (%)	Blastocyst (%)
#1	21	12 (57.1)	12 (100.0)	12 (100.0)
#2	0	NA	NA	NA
#3	42	39 (92.9)	35 (89.7)	31 (79.5)
#4	17	12 (70.6)	12 (100.0)	11 (91.7)
#5	35	7 (20.0)	6 (85.7)	2 (28.6)
#6	37	23 (62.2)	23 (100.0)	22 (95.7)
#7	27	26 (96.3)	25 (96.2)	23 (88.5)
#8	39	32 (82.1)	28 (87.5)	30 (93.8)
#9	4	4 (100.0)	4 (100.0)	4 (100.0)
#10	18	13 (72.2)	12 (92.3)	11 (84.6)
#11	15	13 (86.7)	13 (100.0)	12 (92.3)
#12	7	7 (100.0)	7 (100.0)	3 (42.9)
#13	7	5 (71.4)	5 (100.0)	5 (100.0)
#14	20	13 (65.0)	13 (100.0)	8 (61.5)
#15	5	4 (80.0)	3 (75.0)	4 (100.0)
#16	0	NA	NA	NA
#17	19	14 (73.7)	NA	9 (64.3)
#18	49	40 (81.6)	NA	27 (67.5)
#19	31	23 (74.2)	NA	10 (43.5)
#20	30	23 (76.7)	NA	13 (56.5)
#21	15	9 (60.0)	NA	4 (44.4)

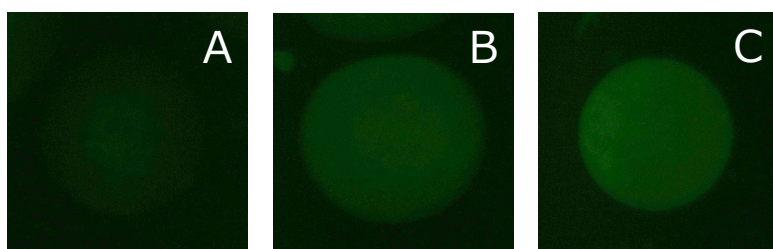


図 1. マウス卵母細胞における ATE1 の発現

A: ネガティブコントロール（一次抗体なし）、B: 野生型、C: ATE1-CKO

表 3. MII 期卵母細胞における ATE1 の発現率

	No. of oocytes	
	collected	expressed ATE1 (%)
WT (n=2)	32	32 (100)
CKO #1	18	18 (100)
CKO #2	23	23 (100)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Satoshi Kurosaka, Kokoro Noma, Kouhei Nagai
2. 発表標題 Protein arginylation implies the protein degradation via N-end rule pathway in mouse oocytes and preimplantation embryos.
3. 学会等名 The International Symposium "Totipotency and Germ Cell Development"
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒坂 哲
2. 発表標題 タンパク質のアルギニル化と生殖・発生
3. 学会等名 全能性プログラム：デコーディングからデザインへ 第5回公開シンポジウム
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安齋 政幸  (Anzai Masayuki)  (30454630)	近畿大学・先端技術総合研究所・教授    (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------