

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658292

研究課題名（和文）哺乳動物初期胚における全能性の分子制御機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms underlying the reprogramming process of the totipotent fertilized eggs in mammals

研究代表者

松本 和也 (MATSUMOTO KAZUYA)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：20298938

研究成果の概要(和文):生物個体を構成する 200 種類以上の細胞に自律的に分化できる能力(全能性)を持つ細胞は受精卵と一部の初期胚に限定されている。しかしながら、全能性の分子制御機構は、未だ解明されていない。本研究では、未受精卵・受精卵・初期胚の経時的な差次的プロテオーム解析により、全能性の獲得・維持・喪失と関連すると考えられる時期に発現量が変化するタンパク質を同定し、タンパク質の分子ネットワークの基礎的知見を獲得した。

研究成果の概要(英文): After fertilization, erasure of the oogenic program and reprogramming by establishing the embryonic programs into totipotent zygote are co-ordinately regulated. However, molecular mechanisms underlying the reprogramming process are not well understood. Understanding of the involvement of proteins in the degradation of maternal mRNA and proteins, and also the onset of ZGA at the maternal-to-zygotic transition helps elucidate molecular mechanisms governing the remodeling of the oocyte into the totipotent zygote and may also have implications for regulation of pluripotency.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：分化全能性、受精卵、初期胚、リプログラミング、プロテオーム

## 1. 研究開始当初の背景

受精によって獲得される分化全能性は、生殖生理学的に重要な生命現象であるにもかかわらず、分化した細胞では発現しない転写因子 Oct3/4 の関与以外、未だ十分に解明さ

れていない。近年、内部細胞塊より樹立された胚性幹細胞(ES細胞)の分化多能性の維持に関与する遺伝子として、転写因子 Sox2 や Nanog が同定された。Oct3/4 は、胚盤胞期における最初の分化決定(内部細胞塊と栄養外

胚葉)に関与し、Nanog は内細胞塊やエピブラストの分化多能性の維持とその後の原始内胚葉への分化に関与すると考えられている。さらに、ES細胞の分化多能性の維持に関わる遺伝子として、stat3、klf4、c-mycなどがある。しかしながら、DNAチップを用いたトランスクリプトーム解析では、分化多能性の維持に関与するこれらの遺伝子の発現は初期胚では低いかほとんど発現していないことが認められた (Wilhelmine N. et al. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 73: 33-38. 2008)。したがって、分化全能性は、多能性維持の分子機構とは別の分子機構によって制御されていると考えられている。

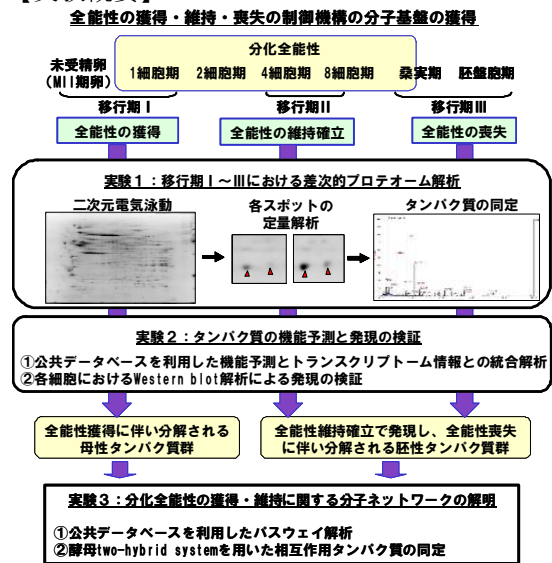
初期胚では mRNA とタンパク質の発現が一致しないケースが多いことも認められており、DNA アレイなどの網羅的なトランスクリプトーム解析だけでは、分化全能性の分子制御機構を解明する基盤となる知見に迫ることが難しいことが考えられる。一方、我々は、未受精卵、1細胞期、2細胞前期、2細胞後期、4細胞期、8細胞期、桑実期、胚盤胞期の各発生段階の初期胚でプロテオーム解析を行った結果、その主成分分析より未受精卵で蓄積されている母性タンパク質は、受精後(1細胞期)には急激に分解・修飾されること(移行期I)、2細胞期では胚性遺伝子の活性化後タンパク質の変化(修飾あるいは分解)が起き(移行期II)、そして桑実期から胚盤胞期にはさらに大規模なタンパク質の変化(移行期III)が起きる現象を見出した。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記移行期I~IIIに特徴的な発現プロファイルを示すタンパク質群の同定をさらに進め、その分子ネットワークに関する知見を獲得して、最終的に分化全能性を制御する分子機構の基礎的知見を集める。

## 3. 研究の方法

### 【実験概要】



本研究では、上記の実験概要に示すように、実験1：移行期I~IIIにおける差次的プロテオーム解析、実験2：タンパク質の機能予測と発現の検証、実験3：分化全能性の獲得・維持に関する分子ネットワークの基盤構築に関する実験を実施することで、初期胚の持つ分化全能性の分子制御機構の基盤解明に向けた基礎的知見を獲得する。まず、実験1では、タンパク質の移行期I(未受精卵—1細胞期胚)、移行期II(4細胞期胚—8細胞期胚)、移行期III(桑実期胚—胚盤胞期胚)における差次的プロテオーム解析を行い、各移行期で発現量が変化するタンパク質を同定する。次に、実験2では、公共データベースを利用した機能予測とトランスクリプトーム情報との統合解析とともに、Western blot解析により初期胚での発現を検証することで、初期胚におけるタンパク質の機能予測と発現を検証する。実験3では、公共データベースによる解析あるいは酵母Two-hybrid systemの解析から、実験1・2で同定・検証したタンパク質間の相互作用を明らかにし、分化全能性の獲得・維持・喪失に関する分子ネットワークを解明する。

## 4. 研究成果

これまで、マウス着床前初期胚を対象としたDNAチップを使った網羅的なトランスクリプトーム解析から、mRNAレベルにおけるダイナミックな遺伝子発現の変化は、1細胞期から2細胞期(「mRNA移行期I」)、4細胞期から8細胞期(「mRNA移行期II」)の2つの移行期のみ認められた (Zeng et al., 2004; Hamatani et al., 2004)。しかしながら、マウス初期胚における分化全能性の獲得と喪失の時期と一致しないため、mRNAレベルから全能性を俯瞰的に捉えるには難しいことが指摘され

ていた。我々は、プロテオーム解析に基づくタンパク質の変動に関する研究から、初期胚における生理学的現象を俯瞰的に捉えてみると、3つの移行期の存在を認めた。まず、母性タンパク質の分解・修飾が行われる「タンパク質移行期Ⅰ」では全能性獲得が、胚性遺伝子の発現が終わる「タンパク質移行期Ⅱ」では全能性の維持が、ダイナミックな代謝能の変化が起きる「タンパク質移行期Ⅲ」では全能性喪失が起きることが示唆された。本研究では、各タンパク質移行期Ⅰ～Ⅲにおいて発現・修飾・分解などにより大きく変化するタンパク質群の同定をさらに進め、その分子ネットワークを解明して、最終的に分化全能性を制御する分子機構の基礎的知見の獲得を行った。

まず、平成23年度は、未受精卵・受精卵・初期胚の経時的な差次的プロテオーム解析により発生過程の特徴を示すタンパク質が同定した。さらに、タンパク質発現変化を俯瞰するため、各発生段階で有意な発現変動を示すタンパク質群について、多変量解析（階層クラスタリングおよび主成分分析）やWestern blot解析による各タンパク質の発現と定量性を検証した。平成24年度は、獲得したタンパク質情報から、公共データベース及び酵母 two-hybrid systemを用いた相互作用タンパク質を同定し、分化全能性の獲得・維持に関する分子ネットワークに関する基礎的知見を獲得した。具体的には、脱アデニレーション機能を持つ nocturnin の母性 mRNA 分解への関与、母性タンパク質分解における初期胚特異的プロテアソーム形成シャペロン ZPAC の同定、さらに能動的 DNA 脱メチル化に関する ZGA の同定が挙げられる。

以上の結果から、分化全能性を持つ受精卵が形成されるエピジェネティック・リプログラムに対する母性 mRNA 分解・母性タンパク質分解の関与機構の存在が認められた。今後、本研究成果として同定された因子が受精卵や初期胚で果たす機能を解明し、受精卵が分化全能性を獲得する分子メカニズムの理解に貢献することが期待できる。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計9件）

(1) Hatanaka Y, Shimizu N, Nishikawa S, Tokoro M, Shin SW, Nishihara T, Amano T, Anzai M, Kato H, Mitani T, Hosoi Y, Kishigami S, Matsumoto K. GSE is a maternal factor involved in active DNA demethylation in zygotes. PLoS One. 査読有 2013, 8(4):e60205. DOI: 10.1371/journal.pone.0060205.

(2) Lee AR, Kishigami S, Amano T, Matsumoto K, Wakayama T, Hosoi Y. Nicotinamide: a Class III HDACi Delays In Vitro Aging of Mouse Oocytes. J Reprod Dev. 査読有 2013 (Accepted)

(3) Nishikawa S, Hatanaka Y, Tokoro M, Shin SW, Shimizu N, Nishihara T, Kato R, Takemoto A, Amano T, Anzai M, Kishigami S, Hosoi Y, Matsumoto K. Functional Analysis of Nocturnin, a Circadian Deadenylase, at Maternal-to-zygotic Transition in Mice. J Reprod Dev. 査読有 2013 (Accepted)

(4) Shin SW, Shimizu N, Tokoro M, Nishikawa S, Hatanaka Y, Anzai M, Hamazaki J, Kishigami S, Saeki K, Hosoi Y, Iritani A, Murata S, Matsumoto K. Mouse zygote-specific proteasome assembly chaperone important for maternal-to-zygotic transition. Biol Open. 査読有 2013, 2(2):170-182. DOI: 10.1242/bio.20123020.

(5) Sugimoto H, Kida Y, Miyamoto Y, Kitada K, Matsumoto K, Saeki K, Taniguchi T, Hosoi Y. Growth and development of rabbit oocytes in vitro: effect of fetal bovine serum concentration on culture medium. Theriogenology. 査読有 2012, 78(5):1040-1047. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2012.04.007.

(6) Yamochi T, Kida Y, Oh N, Ohta S, Amano T, Anzai M, Kato H, Kishigami S, Mitani T, Matsumoto K, Saeki K, Takenoshita M, Iritani A, Hosoi Y. Development of interspecies cloned embryos reconstructed with rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) oocytes and cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) fibroblast cell nuclei. Zygote. 査読有 2012, 5:1-9.

(7) Iwamoto D, Kasamatsu A, Ideta A, Urakawa M, Matsumoto K, Hosoi Y, Iritani A, Aoyagi Y, Saeki K. Donor cells at the G1 phase enhance homogeneous gene expression among blastomeres in bovine somatic cell nuclear transfer embryos. Cell Reprogram. 査読有 2012, 14(1):20-28. DOI: 10.1089/cell.2011.0035.

(8) Inoue E, Murakami S, Fujiki T, Yoshihiro T, Takemoto A, Ikegami H, Matsumoto K, Nakagawa M. Predicting Three-way Interactions of Proteins from

Expression Profiles Based on Correlation Coefficient. *IP SJ Transactions on Bioinformatics*. 査読有 2012, 5: 34-43. DOI: <http://dx.doi.org/10.2197/ipsjtbio.5.34>

(9) Miyamoto K, Nagai K, Kitamura N, Nishikawa T, Ikegami H, Binh NT, Tsukamoto S, Matsumoto M, Tsukiyama T, Minami N, Yamada M, Ariga H, Miyake M, Kawarasaki T, Matsumoto K, Imai H. Identification and characterization of an oocyte factor required for development of porcine nuclear transfer embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有 2011, 108(17):7040-7045. DOI: 10.1073/pnas.1013634108.

〔学会発表〕(計 23 件)

(1) Yuki Hatanaka, Natsumi Shimizu, Kotaro Morita, Satoshi Nishikawa, Takuji Nishihara, Rie Kato, Chika Higuchi, Tomoko Amano, Masayuki Anzai, Satoshi Kishigami, Hiromi Kato, Tasuku Mitani, Yoshihiko Hosoi, Kazuya Matsumoto. GSE is a maternal factor required for DNA demethylation in early embryos. 第 35 回日本分子生物学会 福岡国際会議場 2012 年 12 月 11 日～14 日

(2) Kohtarō Morita, Yuki Hatanaka, Natsumi Shimizu, Satoshi Nishikawa, Takuji Nishihara, Rie Kato, Chika Higuchi, Tomoko Amano, Satoshi Kishigami, Hiromi Kato, Tasuku Mitani, Yoshihiko Hosoi, Kazuya Matsumoto. Expression of GSE Proteins in Primordial Germ Cells. 第 35 回日本分子生物学会 福岡国際会議場 2012 年 12 月 11 日～14 日

(3) Natsumi Shimizu, Yuki Hatanaka, Chika Higuchi, Seungwook Shin, Satoshi Nishikawa, Takuji Nishihara, Rie Kato, Atsushi Takemoto, Kotaro Morita, Kohei Nagai, Tomoko Amano, Satoshi Kishigami, Masayuki Anzai, Yoshihiko Hosoi, Kazuya Matsumoto. The Involvement of Ubiquitin-Proteasome System in Transcription Regulation in Early Mouse Embryos. 第 35 回日本分子生物学会 福岡国際会議場 2012 年 12 月 11 日～14 日

(4) Chika Higuchi, Natsumi Shimizu, Yuki Hatanaka, Seungwook Shin, Satoshi Nishikawa, Takuji Nishihara, Rie Kato, Atsushi Takemoto, Kotaro Morita, Kohei Nagai, Tomoko Amano, Satoshi Kishigami, Masayuki Anzai, Yoshihiko Hosoi, Kazuya Matsumoto. The Involvement of

Ubiquitin-Proteasome System in the Major ZGA in Early Mouse Embryos. 第 35 回日本分子生物学会 福岡国際会議場 2012 年 12 月 11 日～14 日

(5) Rie Kato, Mikiko Tokoro, Satoshi Nishikawa, Yuki Hatanaka, Natsumi Shimizu, Takuji Nishihara, Atsushi Takemoto, Chika Higuchi, Kotaro Morita, Tomoko Amano, Satoshi Kishigami, Tasuku Mitani, Yoshihiko Hosoi, Kazuya Matsumoto. Identification of a Candidate Factor which is interacting with Histone H3.3 in Early Mouse Embryo. 第 35 回日本分子生物学会 福岡国際会議場 2012 年 12 月 11 日～14 日

(6) Satoshi Nishikawa, Yuki Hatanaka, Natsumi Shimizu, Takuji Nishihara, Rie Kato, Atsushi Takemoto, Chika Higuchi, Kotaro Morita, Satoshi Kishigami, Tomoko Amano, Kazuhiro Saeki, Yoshihiko Hosoi, Kazuya Matsumoto. PARN Deadenylase Causes Instability of Maternal Poly (A)+ mRNAs in Early Mouse Embryos. 第 35 回日本分子生物学会 福岡国際会議場 2012 年 12 月 11 日～14 日

(7) Yuki Hatanaka, Natsumi Shimizu, Kotaro Morita, Satoshi Nishikawa, Takuji Nishihara, Rie Kato, Atsushi Takemoto, Chika Higuchi, Tomoko Amano, Masayuki Anzai, Satoshi Kishigami, Kazuhiro Saeki, Yoshihiko Hosoi, Kazuya Matsumoto. Maternal GSE, germ-cell specific gene, involves in active DNA demethylation in early mouse embryos. *Germ Cells*. Cold Spring Harbor, New York, USA. 2012 年 10 月 2 日～6 日

(8) Natsumi Shimizu, Yuki Hatanaka, Chika Higuchi, Seung-Wook Shin, Satoshi Nishikawa, Takuji Nishihara, Rie Kato, Atsushi Takemoto, Kohtarō Morita, Tomoko Amano, Satoshi Kishigami, Tasuku Mitani, Kazuhiro Saeki, Yoshihiko Hosoi, Kazuya Matsumoto. A role of ubiquitin-proteasome system in early mouse embryos. *Germ Cells*. Cold Spring Harbor, New York, USA. 2012 年 10 月 2 日～6 日

(9) 守田昂太郎、畑中勇輝、清水なつみ、西川慧、西原卓志、加藤里恵、武本淳史、樋口智香、天野朋子、安齋政幸、岸上哲士、佐伯和弘、細井美彦、松本和也 Rhophilin-2 は GABARAP と相互作用し、RhoB 制御下において初期胚の第一分裂に関与している 第 19 回日本胚移植研究会 富山大学黒田講堂 2012

年 9 月 27 日～28 日

(10) 畑中勇輝、守田昂太郎、清水なつみ、西川慧、西原卓志、加藤里恵、武本淳史、樋口智香、天野朋子、安齋政幸、岸上哲士、佐伯和弘、細井美彦、松本和也 ヒストンシヤペロンと考えられる GSE は、マウス受精卵における能動的 DNA 脱メチル化に關与している 第 105 回日本繁殖生物学会大会 筑波大学大学会館 2012 年 9 月 5 日～8 日

(11) 清水なつみ、樋口智香、畑中勇輝、申承旭、西川慧、西原卓志、加藤里恵、武本淳史、守田昂太郎、天野朋子、岸上哲士、佐伯和弘、細井美彦、松本和也 マウス初期胚におけるユビキチン-プロテアソーム系分解系の役割 第 105 回日本繁殖生物学会大会 筑波大学大学会館 2012 年 9 月 5 日～8 日

(12) 加藤里恵、野老美紀子、西川慧、畑中勇輝、清水なつみ、西原卓志、武本淳史、樋口智香、守田昂太郎、天野朋子、岸上哲士、佐伯和弘、細井美彦、松本和也 マウス初期胚における H3.3 と相互作用因子の候補である FAF1 の機能解析 第 105 回日本繁殖生物学会大会 筑波大学大学会館 2012 年 9 月 5 日～8 日

(13) 守田昂太郎、畑中勇輝、清水なつみ、西川慧、西原卓志、加藤里恵、武本淳史、樋口智香、天野朋子、安齋政幸、岸上哲士、佐伯和弘、細井美彦、松本和也 Rhophilin-2 は GABARAP と相互作用し、RhoB 制御下において初期胚の第一分裂に關与している 第 105 回日本繁殖生物学会大会 筑波大学大学会館 2012 年 9 月 5 日～8 日

(14) 畑中勇輝、守田昂太郎、清水なつみ、西村愛美、西川慧、西原卓志、加藤里恵、武本淳史、天野朋子、安齋政幸、岸上哲士、佐伯和弘、細井美彦、松本和也 GSE は受精直後の胚における能動的脱メチル化に關与している。第 30 回日本受精着床学会大会 グランキューブ大阪 2012 年 8 月 30 日～31 日

(15) 清水なつみ、樋口智香、畑中勇輝、西川慧、西原卓志、加藤里恵、武本淳史、守田昂太郎、天野朋子、岸上哲士、安齋政幸、佐伯和弘、細井美彦、松本和也 マウス初期胚におけるユビキチン-プロテアソーム経路の果たす役割の検討 第 30 回日本受精着床学会大会 グランキューブ大阪 2012 年 8 月 30 日～31 日

(16) 加藤里恵、西川慧、畑中勇輝、清水なつみ、西原卓志、武本淳史、守田昂太郎、天野朋子、岸上哲士、佐伯和弘、細井美彦、松本

和也 マウス初期胚における H3.3 と相互作用する因子の検討 第 30 回日本受精着床学会大会 グランキューブ大阪 2012 年 8 月 30 日～31 日

(17) 西川慧、畑中勇輝、清水なつみ、西原卓志、加藤里恵、武本淳史、守田昂太郎、岸上哲士、天野朋子、佐伯和弘、細井美彦、松本和也 マウス着床前初期胚における poly(A)mRNA の制御に關する研究 第 30 回日本受精着床学会大会 グランキューブ大阪 2012 年 8 月 30 日～31 日

(18) Yuki Hatanaka, Satoshi Nishikawa, Natsumi Shimizu, Takuji Nishihara, Rie Kato, Tomoko Amano, Satoshi Kishigami, Kazuhiro Saeki, Yoshihiko Hosoi, Kazuya Matsumoto. Involvement of GSE in Reprogramming of Primordial Germ Cells. 第 34 回日本分子生物学会 パシフィコ横浜 2011 年 12 月 13 日～12 月 16 日

(19) Natsumi Shimizu, Seungwook Shin, Hyangheun Lee, Satoshi Nishikawa, Yuki Hatanaka, Takuji Nishihara, Rie Kato, Tomoko Amano, Satoshi Kishigami, Kazuhiro Saeki, Yoshihiko Hosoi, Kazuya Matsumoto. The involvement of ubiquitin-proteasome in the zygotic gene activation in early mouse embryos. 第 34 回日本分子生物学会 パシフィコ横浜 2011 年 12 月 13 日～12 月 16 日

(20) Satoshi Nishikawa, Yuki Hatanaka, Natsumi Shimizu, Takuji Nishihara, Atsushi Takemoto, Satoshi Kishigami, Tomoko Amano, Kazuhiro Saeki, Yoshihiko Hosoi, Kazuya Matsumoto. Expression and Functional analyses of 5-deadenylase in Early Mouse Embryos. 第 34 回日本分子生物学会 パシフィコ横浜 2011 年 12 月 13 日～12 月 16 日

(21) 畑中勇輝、西川慧、清水なつみ、西原卓志、加藤里恵、天野朋子、岸上哲士、佐伯和弘、細井美彦、松本和也 初期胚及び始原生殖細胞のリプログラミング過程における GSE 及び新規遺伝子 GIAP の発現解析 第 104 回日本繁殖生物学会大会 いわて県民情報交流センター・アイーナ 2011 年 9 月 15 日～17 日

(22) 清水なつみ、申承旭、西川慧、畑中勇輝、李香欣、西原卓志、加藤里恵、天野朋子、岸上哲士、佐伯和弘、細井美彦、入谷明、松本和也 ユビキチン-プロテアソーム系のマウス初期胚における転写制御の関与 第 104 回日本繁殖生物学会大会 い

わて県民情報交流センター・アイーナ 2011  
年 9 月 15 日～17 日

(23) Seung-Wook Shin, Mikiko Tokoro,  
Satoshi Nishikawa, Yuki Hatanaka,  
Hyang-Heun Lee, Natsumi Shimizu, Takuji  
Nishihara, Rie Kato, Tomoko Amano, Kazuya  
Matsumoto. Inhibition of the  
ubiquitin-proteasome system leads to  
delay of the onset of ZGA gene expression  
in early mouse embryos. 44th Annual  
Meeting of the Japanese Society of  
Developmental Biologist. Okinawa  
Convention Center 2011 年 5 月 18 日～21  
日

〔図書〕(計 1 件)

(1) 松本和也、細井美彦、京都大学学術出版、  
胚発生プログラムの遺伝的制御、2011、総ペ  
ージ数:11.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

名称：牛の判別方法及び牛の判別用キット  
発明者：松本和也、池上春香、武本淳史、小  
林栄治

権利者：近畿大学、家畜改良センター

種類：特許

番号：特願 2012-8036

出願年月日：2012 年 01 月 18 日

国内外の別：国内

名称：牛の判別方法及び牛の判別用キット

発明者：松本和也、森本康一、池上春香

権利者：近畿大学

種類：特許

番号：特願 2011-263214

出願年月日：2011 年 12 月 01 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 和也 (MATSUMOTO KAZUYA)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：20298938

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し