

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292189

研究課題名(和文) 受精卵のエピジェネティック・リプログラミングへのプロテアソーム分解系の関与機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of involvement of UPS during the maternal-to-zygotic transition

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、哺乳動物受精卵のエピジェネティック・リプログラミングに対するユビキチン-プロテアソーム分解系(UPS)的に生殖細胞に終末分化した卵細胞から受精によって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・リプログラミングの分子制御機構に関する知見を獲得した。その結果、UPSに依存した母性タンパク質の分解によって卵母細胞中の転写因子の機能が抑制される分子機構が受精によって受精卵が全能性を持つ細胞になる母性-胚性移行期に機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：During the maternal-to-zygotic transition (MZT), maternal mRNAs and proteins are degraded and numerous genes are zygotically activated. We have previously shown that the transient inhibition of ubiquitin-proteasome system (UPS) after fertilization leads to a delay in the initiation of zygotic transcription and impaired full-term development in mouse. These results suggest that the degradation of maternal proteins by UPS during MZT is crucial for developmental reprogramming. However, the maternal proteins, which are degraded by UPS during MZT and can contribute to the zygotic transcription and normal development, have not been identified. In this study, we identified such maternal proteins, which is involved in the SUMO modification, and screened several candidates by examining the effects of their overexpression on preimplantation development of mouse embryos. These results suggests that a nuclear SUMO ligase is a candidate as maternal proteins degraded by UPS during MZT.

研究分野：分子発生生物学

キーワード：分化全能性 プロテアソーム分解系 受精卵 母性タンパク質

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物では、受精後に母性から胚性に移行する時期(maternal-to-zygotic transition, MZT)のエピジェネティック・リプログラミングを経て、生殖細胞に究極に分化した卵から動物個体を構成する全ての細胞に自律的に分化することのできる分化全能性(totipotency)を持つ受精卵が形成される(Stitzel & Seydoux, Science 316:407-408 [2007])。この MZT において、母性 mRNA 分解・母性タンパク質分解・胚性遺伝子の活性化が協働することが受精卵のエピジェネティック・リプログラミングに重要であると考えられている(Li et al., Development 137:859-870 [2010])。しかしながら、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・胚性遺伝子の活性化の詳細な関与機構は未だ不明である。

これまで、我々は、その分子制御機構は明らかになっていないものの、マウス初期胚の胚性遺伝子活性化の開始にユビキチン・プロテアソーム分解系(UPS)が関与することを初めて報告した(Shin et al., J Reprod Dev. 56:655-663 [2010])。また、マウス初期胚の MZT において 20S プロテアソーム形成に重要な役割を果たすシャペロンタンパク質を新規に同定し、受精卵における母性タンパク質分解には体細胞と異なる 20S プロテアソーム形成機構が存在することを初めて明らかにしている(Shin et al., Biology Open 2:170-182 [2012])。これらのことは、ユビキチン・プロテアソーム分解系(UPS)による母性タンパク質分解が受精後のエピジェネティック・リプログラムにおいてクロマチンリモデリングに関与し、その後胚性遺伝子の活性化が開始する機構が存在する可能性を示唆する。事実、培養細胞でヒストン脱メチル化酵素 JMJD2A(JHDM2A)はプロテアソーム分解系で分解されることからエピジェネティックとユビキチン・プロテアソーム分解系(UPS)との関連性が認められ(Kooistra et al., Nature Review 13:297-311 [2012])。またヒト胚性幹細胞(ES 細胞)の幹細胞機能維持にはプロテアソーム分解系が重要な役割を持つことが報告されている(Vilchez et al., Nature 488:304-308 [2012])。

2. 研究の目的

本研究では、哺乳動物受精卵のエピジェネティック・リプログラムに対するユビキチン・プロテアソーム分解系(UPS)的に生殖細胞に終末分化した卵細胞から受精によって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・リプログラムの分子制御機構に関する知見を獲得する。

特に、哺乳動物受精卵のエピジェネティック・リプログラムに対するユビキチン・プロテアソーム分解系(UPS)の意義とその関与機構を明らかにするため、プロテアソーム分

解系によってどのような種類の母性タンパク質が選択的に分解され、その分解される母性タンパク質が受精直後の DNA 脱メチル化やヒストン修飾に關与する分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験 1: ユビキチン・プロテアソーム分解系(UPS)により選択的に分解される母性タンパク質群の同定

ユビキチン・プロテアソーム分解(UPS)系の標的となる母性タンパク質群を同定するために、[実験] 20S プロテアソーム複合体のサブユニットタンパク質と相互作用するタンパク質を卵巣及び卵母細胞 cDNA ライブラリーを使った酵母 Two-hybrid system により探索した。具体的には、pGilda LexA ベクターに標的母性タンパク質の遺伝子を組み込んだプラスミドの構築、同遺伝子を組み込んだ pGilda-融合遺伝子を使った酵母菌株(EGY48)の形質転換、pGilda-融合遺伝子を導入し形質転換した酵母菌株(transformed EGY48)に卵巣あるいは卵母細胞 cDNA ライブラリーを導入してダブルの形質転換株を作製し、これらの形質転換株を選択培地の SD/Gal/Raf(-UHTL)X-Gal, BU-salt 液体培地で培養して、相互作用を示す形質転換株の選択、形質転換株からの相互作用を示すタンパク質をコードする遺伝子の単離、BLAST 等によるデータベース検索から 20S プロテアソーム複合体のサブユニットタンパク質と相互作用すると考えられる候補遺伝子を標的とする母性タンパク質群(以下、標的母性タンパク質)として同定した。さらに、[実験] 独自の獲得している卵母細胞のプロテオーム解析データに加えて、すでに公開されている卵母細胞と 2 細胞期のプロテオーム解析データベースを統合し、これらのデータベースを用いたバイオインフォマティクス解析によっても、標的母性タンパク質の同定を行った。

(2) 実験 2: ユビキチン・プロテアソーム分解系(UPS)の標的母性タンパク質群のエピジェネティック修飾(ヒストン修飾・DNA メチル化等)における機能解析

[実験] 標的母性タンパク質の過剰発現による受精卵における標的母性タンパク質の機能解析: 蛍光標識した in vitro 転写 mRNA の顕微注入による標的母性タンパク質の過剰発現法を用いて、胚発生に關与する標的母性タンパク質の機能解析を行った。

[実験] 標的母性タンパク質の mRNA 及びタンパク質の発現プロファイルの検討: 標的母性タンパク質については、mRNA レベルでの発現プロファイルを獲得した。同時に、受精前後の初期胚における発現プロファイル解析を Western blot 解析・免疫細胞化学的解析により実施した。

(3) 実験 3: 標的母性タンパク質によって

オープンクロマチン構造に変換される DNA 領域の特定

標的母性タンパク質をロックアウトマウスの受精卵と野生型マウスの受精卵を用いて、標的母性タンパク質抗体を用いたクロマチン免疫沈降シーケンシング (Cip-seq.) 法によって、オープンクロマチン構造に変換されている DNA 領域を検出する。各マウスから得た受精卵を formaldehyde で処理してタンパク質と DNA 間ならびにタンパク質相互間をクロスリンクさせ、次に溶解して得た初期胚のクロマチンを超音波処理により約 200~500 bp 程度の DNA サイズに切断する。この調整した可溶性クロマチンを、標的母性タンパク質やそれと相互作用するタンパク質の抗体で免疫沈降後、次世代シーケンサーによって解析し、データベースにより当該領域における遺伝子群を同定した。

4. 研究成果

(1) 実験1: ユビキチン-プロテアソーム分解系 (UPS) により選択的に分解される母性タンパク質群の同定

[実験] マウス MII 期卵母細胞の cDNA ライブラリーを使って酵母ツーハイブリットシステムによって 20S プロテアソーム複合体のサブユニット Rpn11 のコードするマウス PSMD14 タンパク質と相互作用する候補因子を同定し、さらに [実験] MII 期卵母細胞で発現しているが、受精後にその発現量が減少する母性タンパク質で、且つユビキチン修飾されているタンパク質のリスト化を既報データリスト及び公共データベースからバイオインフォマティクス解析により行った。[実験] 及び [実験] の結果リストアップされたタンパク質群 (474 個) は、受精後にユビキチン修飾を受けて UPS によって分解する母性タンパク質の候補となりうると考えられた。さらに、これら候補タンパク質をコードする遺伝子について遺伝子オンロジー解析と ZGA との関連性から転写制御に関与する因子で MII 卵母細胞から受精卵の mRNA プロファイルによって絞り込みを行った結果、最終的に標的母性タンパク質の候補として合計 8 個の遺伝子を同定した。

(2) 実験2: ユビキチン-プロテアソーム分解系 (UPS) の標的母性タンパク質群のエピジェネティック修飾 (ヒストン修飾・DNA メチル化等) における機能解析

[実験] 8 個の標的母性タンパク質の候補遺伝子について蛍光標識発現ベクターを構築し、各候補遺伝子の過剰発現が初期胚の発生に及ぼす影響を検討した。その結果、過剰発現によって 2 細胞期から 4 細胞期への発生が阻害する標的母性タンパク質の遺伝子 1 個を同定した。この遺伝子産物は、アルギニン残基のメチル化による SUMO リガーゼ活性を持つタンパク質であり、その機能によって転写

因子の機能阻害に関与していることが予測された。そこで、当該候補遺伝子の SUMO リガーゼ活性に関するドメインを変異させた蛍光標識過剰発現ベクターを受精に導入した結果、野生型が持つ初期胚発生に及ぼす影響が観察されなかった。

[実験] この候補遺伝子は、卵母細胞では mRNA レベルで高い発現量を示すが、受精後急激に発現量が減少することが明らかになり、また当該タンパク質は GV 期の卵母細胞や 1 細胞期において、核に局在することが観察された。以上のことから、UPS が関与するマウス受精卵のエピジェネティック・リプログラミングの分子制御機構として、ユビキチン-プロテアソーム分解系 (UPS) 依存した母性タンパク質の分解によって卵母細胞中の転写因子の機能が抑制されることで全能性を持つ細胞としての転写制御機構が確立される可能性が示唆された。

(3) 実験3: 標的母性タンパク質によってオープンクロマチン構造に変換される DNA 領域の特定

実験1及び実験2の結果から、受精卵が全能性を獲得する分子機構の一つとして、卵母細胞中の転写因子がユビキチン-プロテアソーム分解系 (UPS) によって分解されるプロセスが存在する可能性が示唆された。そこで、アルギニン残基のメチル化による SUMO リガーゼ活性を持つタンパク質の標的となる SUMO 修飾されるタンパク質の同定を、卵母細胞で転写因子として機能する遺伝子群で且つ SUMO 修飾を受ける遺伝子の同定を公共データベースからバイオインフォマティクス解析によって複数個同定した。現在、これらの転写因子が結合するクロマチン領域の同定を行っている。今後、これらの結果から、受精卵の分化全能性獲得に関連してクロマチン構造が変換される DNA 領域の同定が期待される。

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 7 件)

Miyamoto K, Tajima Y, Yoshida K, Oikawa M, Azuma R, Allen GE, Tsujikawa T, Tsukaguchi T, Bradshaw CR, Jullien J, Yamagata K, Matsumoto K, Anzai M, Imai H, Gurdon JB, Yamada M. Reprogramming towards totipotency is greatly facilitated by synergistic effects of small molecules. Biol Open., 2017, 査読有, 6(4):415-424., DOI: 10.1242/bio.023473.

Amano T, Anzai M, Matsumoto K. The Clock mutation reduces reproductive performance of mice by affecting the

implantation capacity: Maternal Clock mutation is not the only factor affecting implantation. *Theriogenology*, 2016, 査読有, 86(7):1670-1684., DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.05.027.

Sugimoto H, Kida Y, Oh N, Kitada K, Matsumoto K, Saeki K, Taniguchi T, Hosoi Y. Production of somatic cell nuclear transfer embryos using in vitro-grown and in vitro-matured oocytes in rabbits. *Zygote.*, 2015, 査読有, 23(4):494-500., DOI: 10.1017/S0967199414000082.

Nishihara T, Hashimoto S, Ito K, Nakaoka Y, Matsumoto K, Hosoi Y, Morimoto Y. Oral melatonin supplementation improves oocyte and embryo quality in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Gynecol Endocrinol.*, 2014, 査読有, 30(5):359-362. DOI: 10.3109/09513590.2013.879856.

Shimizu N, Ueno K, Kurita E, Shin SW, Nishihara T, Amano T, Anzai M, Kishigami S, Kato H, Mitani T, Hosoi Y, Matsumoto K. Possible role of ZPAC, zygote-specific proteasome assembly chaperone, during spermatogenesis in the mouse. *J Reprod Dev.*, 2014, 査読有, 60(3):179-186.

Ishizuka Y, Nishimura M, Matsumoto K, Miyashita M, Takeo T, Nakagata N, Hosoi Y, Anzai M. The influence of reduced glutathione in fertilization medium on the fertility of in vitro-matured C57BL/6 mouse oocytes. *Theriogenology.*, 2013, 査読有, 80(5):421-426., DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.07.002.

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.*, 2013, 査読有, 8(4):e60205. DOI: 10.1371/journal.pone.0060205.

[学会発表](計 11 件)

守田 昂太郎、野老 美紀子、樋口 智香、内堀 翔、塚口 智将、永井 宏平、安齋 政幸、山縣 一夫、細井 美彦、宮本 圭、松本 和也、マウス前核期胚の核内において Peroxiredoxin (Prdx) が過酸化水素の

消去に關与する、第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月 17 日~20 日、宮崎大学・木花キャンパス(宮崎県、宮崎市)

樋口 智香、清水 なつみ、守田 昂太郎、内堀 翔、塚口 智将、永井 宏平、安齋 政幸、山縣 一夫、細井 美彦、宮本 圭、松本 和也、マウス胚におけるプロテアソーム系の一過性の阻害は胚性ゲノム活性化の開始を遅延し、産仔への発生を損なう、第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月 17 日~20 日、宮崎大学・木花キャンパス(宮崎県、宮崎市)

Higuch C, Shimizu N, Nishihara T, Morita K, Uchibori S, Tsukaguchi T, Nagai K, Anzai M, Kishigami S, Hosoi Y, Matsumoto K. Involvement of ubiquitin-proteasome system in the onset of transcription in mouse embryos. Cold Spring Harbor Laboratory meeting, Germ Cells. , 2014 年 10 月 7 日~11 日, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (USA)

Morita K, Nishihara T, Higuchi C, Uchibori S, Yamaguchi R, Tsukaguchi T, Nagai K, Anzai M, Kishigami S, Hosoi Y, Matsumoto K. Interaction of PGC7/Dppa3/Stella and Peroxiredoxin 1 in early mouse embryos. Cold Spring Harbor Laboratory meeting, Germ Cells. , 2014 年 10 月 7 日~11 日, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (USA)

樋口 智香、清水 なつみ、畑中 勇輝、西原 卓志、武本 淳史、守田 昂太郎、内堀 翔、永井 宏平、天野 朋子、岸上 哲士、細井 美彦、松本 和也、マウス 2 細胞期胚におけるユビキチン・プロテアソーム系の役割、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日~6 日、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

清水 なつみ、畑中 勇輝、樋口 智香、西原 卓志、武本 淳史、守田 昂太郎、内堀 翔、永井 宏平、天野 朋子、岸上 哲士、安齋 政幸、細井 美彦、松本 和也、マウス初期胚における転写開始機構へのユビキチン・プロテアソーム系の関与、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日~6 日、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

畑中 勇輝、清水 なつみ、守田 昂太郎、樋口 智香、岸上 哲士、小倉 淳朗、松本 和也、マウス初期胚の DNA 脱メチル化機構における母性 GSE タンパク質の役割、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12

月3日～6日、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

守田 昂太郎、畑中 勇輝、清水 なつみ、西原 卓志、武本 淳史、樋口 智香、内堀翔、天野 朋子、永井 宏平、岸上 哲士、加藤 博巳、三谷 匡、細井 美彦、松本 和也、マウス始原生殖細胞で発現するGSEタンパク質の能動的DNA脱メチル化への関与、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日～6日、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

樋口 智香、清水 なつみ、畑中 勇輝、西原 卓志、武本 淳史、守田 昂太郎、内堀 翔、永井 宏平、天野 朋子、岸上 哲士、細井 美彦、松本 和也、マウス2細胞期胚におけるユビキチン・プロテアソーム系の役割、第106回日本繁殖生物学会大会、2013年9月12日～14日、東京農工大学農学部府中キャンパス(東京都、府中市)

清水 なつみ、畑中 勇輝、樋口 智香、西原 卓志、武本 淳史、守田 昂太郎、内堀 翔、永井 宏平、天野 朋子、岸上 哲士、安齋 政幸、細井 美彦、松本 和也、マウス初期胚における転写開始機構へのユビキチン・プロテアソーム系の関与、第106回日本繁殖生物学会大会、2013年9月12日～14日、東京農工大学農学部府中キャンパス(東京都、府中市)

守田 昂太郎、畑中 勇輝、清水 なつみ、西原 卓志、武本 淳史、樋口 智香、内堀 翔、天野 朋子、永井 宏平、岸上 哲士、加藤 博巳、三谷 匡、細井 美彦、松本 和也、マウス始原生殖細胞におけるGSEタンパク質の発現解析、第106回日本繁殖生物学会大会、2013年9月12日～14日、東京農工大学農学部府中キャンパス(東京都、府中市)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.waka.kindai.ac.jp/kigyoworks/public/pdf_works/works_pdf_15.pdf

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

三谷 匡 (MITANI Tasuku)

近畿大学・先端技術総合研究所・教授

研究者番号：10322265

天野 朋子 (AMANO Tomoko)

近畿大学・生物理工学部・講師

研究者番号：60388585

(平成25年度)

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし