

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：34204

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640063

研究課題名(和文) 受精卵におけるタンパク質ノックダウン法の開発

研究課題名(英文) Development of protein knockdown method in zygote

研究代表者

中村 肇伸 (Nakamura, Toshinobu)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授

研究者番号：80403202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、オートファジーを利用した新規タンパク質ノックダウン法を開発することを目的とした。まず、ライソソームとの結合に必要なペプチドとプロテインAを融合させたタンパク質を作製し、EGFP mRNAとともに受精卵にマイクロインジェクションを行った。その結果、EGFPタンパク質が分解できることが明らかとなった。次に、受精卵に豊富に存在するStellaを標的としたが、Stellaタンパク質の分解はほとんど起こらなかった。Stellaは、受精卵の核内に局在し、クロマチンと結合することが明らかになっている。したがって、本研究で開発した方法は、核に局在するタンパク質には適用できないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we try to develop a novel method for protein knockdown. We produced chimeric protein consisting of lysosome binding peptide and protein A. When this fusion proteins were microinjected to zygote with EGFP mRNA and anti-EGFP antibody, EGFP proteins were efficiently degraded. Next, we examined whether this method are applicable to endogenous Stella proteins, a maternal proteins localized in nucleus. However, Stella proteins were not degraded after microinjected with a fusion proteins and anti-Stella antibody. These data suggested that this method is applicable to cytoplasmic proteins, but not to nuclear proteins.

研究分野：生殖細胞

キーワード：タンパク質ノックダウン

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の個体発生が正常に進行するためには、精子と卵子のエピゲノム情報が受精後にリプログラミングされ、遺伝子発現が時空間的に制御される必要がある。この過程では、ゲノム全体の脱メチル化、母性タンパク質の分解、母性 RNA の分解、および胚性遺伝子の活性化が重要であることが明らかにされている。しかし、受精後のリプログラミング機構の解析は、その重要性にも関わらず、未解明な部分が多く残されている。これは、受精卵における適切な遺伝子解析法が存在しないことが原因であると考えられる。特定の遺伝子の機能を解析する方法としては、相同遺伝子組み換えによる候補遺伝子のノックアウトが使われてきた。しかし、受精卵や着床前胚で機能するような遺伝子のノックアウトマウスは胎生致死である可能性が高い。その場合、組織特異的ノックアウトマウスを用いた解析が必要となり、膨大な時間と経費を要する。また、受精卵には卵子から持ち越されるタンパク質が大量に存在し、RNA 干渉法を用いることができない。これらの問題を解決するために、本研究では特異的にタンパク質を分解するシャペロン介在性オートファジーを利用したタンパク質ノックダウン法を開発することを目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、細胞が有するタンパク質分解系であるオートファジーを利用した新規タンパク質ノックダウン法を開発することを目的とする。本研究により、受精卵において特異的にタンパク質をノックダウンすることが可能になれば、リプログラミングの分子機構の解明に大きく寄与すると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、ライソソームの結合に必要なペプチドとプロテイン A とを融合させたキメラタンパク質を作製した。次に、これらのキメラタンパク質を標的タンパク質に対する抗体とともに受精卵にマイクロインジェクションし、標的タンパク質が分解するかどうかを検討した。

4. 研究成果

まず、ライソソームとの結合に必要なペプチドとプロテイン A を融合させたキメラタンパク質を作製し、EGFP mRNA および EGFP 抗体とともに受精卵にマイクロインジェクションを行った。その結果、ほぼ全ての胚が死滅した。これは、市販の抗体に添加されているアジ化ナトリウム等の防腐剤の影響が考えられた。そこで、EGFP 抗体を精製することにより、添加剤を除いたところ、死滅する胚はほとんど認められなくなった。さらに、EGFP 抗体により、EGFP タンパク質が効率よく分解できることが明らかとなった。

次に、この方法が内在性のタンパク質に適

用できるかどうかを検討した。そのために、受精卵に豊富に存在する Stella のノックダウンを試みた。その結果、受精卵において Stella タンパク質の分解はほとんど認められなかった。Stella は、受精卵の核内に局在し、クロマチンと結合することが明らかになっている。また、抗体分子は分子量を考慮すると、核膜を通過できないことが考えられる。これらのことから、本研究で開発した方法は、細胞質に局在するタンパク質のノックダウンに有効であり、核に局在するタンパク質には適用できないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件) 全て査読有

Funaki S, Nakamura T, Nakatani T, Umehara H, Nakashima H, Okumura M, Oboki K, Matsumoto K, Saito H, Nakano T, Global DNA hypomethylation coupled to cellular transformation and metastatic ability. *FEBS Lett*, 589, 2015, 4053-4060
DOI: 10.1016/j.febslet.2015.11.020.

Matsuzaki H, Okamura E, Takahashi T, Ushiki A, Nakamura T, Nakano T, Hata K, Fukamizu A, Tanimoto K, *De novo* DNA methylation through 5' -segment of the *H19* ICR maintains its imprint during early embryogenesis, *Development*, 142, 2015, 3833-3844
DOI: 10.1242/dev.126003.

Arakawa T, Nakatani T, Oda M, Kimura Y, Sekita Y, Kimura T, Nakamura T, Nakano T, Stella controls chromocenter formation through regulation of Daxx expression in 2-cell embryos, *Biochem Biophys Res Commun*, 466, 2015, 60-65
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.08.106.

Kunoh T, Wang W, Kobayashi H, Matsuzaki D, Togo Y, Tokuyama M, Hosoi M, Koseki K, Wada S, Nagai N, Nakamura T, et al, Human Dynactin-Associated Protein Transforms NIH3T3 Cells to Generate Highly Vascularized Tumors with Weak Cell-Cell Interaction, *PLoS ONE*, 10, 2015, e0135836
DOI: 10.1371/journal.pone.0135836.

Inoue K, Oikawa M, Kamimura S, Ogonuki N, Nakamura T, et al, Trichostatin A specifically improves the aberrant expression of transcription factor genes in embryos produced by somatic cell nuclear transfer, *Scientific Rep*, 5, 2015, 10127
DOI: 10.1038/srep10127.

Nakatani T, Yamagata K, Kimura T, Oda M, Nakashima H, Horii M, Sekita Y, Arakawa T, Nakamura T, et al, Stella preserves maternal chromosome integrity by inhibiting 5hmC-induced H2AX accumulation, EMBO Rep, 16, 2015, 582-589
DOI: 10.15252/embr.201439427.

Xu X, Smorag L, Nakamura T, et al, *Dppa3* expression is critical for generation of fully-reprogrammed iPS cells and maintenance of *Dlk1-Dio3* imprinting. Nature Commun, 6, 2015, 6008
DOI: 10.1038/ncomms7008

Tsuji A, Nakamura T, et al, Biotin-deficient diet induces chromosome misalignment and spindle defects in mouse oocytes, Biosci Biotechnol Biochem, 79, 2015, 292-299
DOI: 10.1080/09168451.2014.968090.

Funaki S, Nakamura T, et al, Inhibition of maintenance DNA methylation by Stella, Biochem Biophys Res Commun, 453, 2014, 455-460
DOI: 10.1016/j.bbrc. 2014.09.101.

Shiromoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Daiba A, Chuma S, Katanaya A, Katsumata A, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Nakamura T, et al, GPAT2, a Mitochondrial Outer Membrane Protein, in piRNA Biogenesis in Germline Stem Cells, RNA, 19,6, 2013, 803-810
DOI: 10.1261/rna.038521.113.

Nakashima H, Kimura T, Kaga Y, Nakatani T, Seki Y, Nakamura T, et al, Effects of Stella on DNA methylation dynamics during primordial germ cell development, Biol Reprod, 88, 5, 125, 2013, 1-9
DOI: 10.1095/biolreprod.112.105932.

[学会発表](計 35 件)

Goto Y, Furuta A, Suzuki K, Kohda T, Ikawa M, Nakamura T, Critical function of Klf17 for the zygotic genome activation in mice, International Symposium on "Epigenome dynamics and regulation in germ cells", 2016 年 2 月 18 日、京都大学百周年時計台記念館 (京都市)

後藤 悠比、鈴木 健士、古田 明日香、幸田 尚、伊川 正人、中村 肇伸、全能性細胞で特異的に発現する Klf17 の初期発生における必要性、BMB2015、2015 年 12 月

2 日、神戸ポートピアホテル (兵庫県・神戸市)

Okai S, Usui F, Hasegawa M, Nakamura T, et al, High-affinity, poly-reactive IgA is required for gut homeostatic maintenance to prevent colitis in mice, BMB2015、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートピアホテル (兵庫県・神戸市)

Okai S, Usui F, Hasegawa M, Nakamura T, et al, High-affinity, poly-reactive IgA is required for gut homeostatic maintenance to prevent colitis in mice, 第 44 回日本免疫学会学術集会、2015 年 11 月 18 日、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

中村 肇伸、全能性細胞で特異的に発現する遺伝子群の機能解析、神戸大学農学部 第 33 回インターゲノミクスセミナー、2015 年 11 月 13 日、神戸大学大学院農学研究科 (兵庫県・神戸市)

辻 愛、中村 肇伸、柴田 克己、Vitamin B1 栄養が卵子の質におよぼす影響、第 54 回日本栄養・食糧学会 近畿支部大会、2015 年 10 月 10 日、神戸大学農学部 (兵庫県・神戸市)

Suzuki K, Goto Y, Furuta A, Kohda T, Ikawa M, Nakamura T, Critical functions of totipotent-cell specific genes Klf17 and Btg4 in zygotic reprogramming, The 40th Naito Conference Epigenetics, 2015 年 9 月 16 日、シャトレーゼガトーキングダムサッポロ (北海道・札幌市)

鈴木 健士、後藤 悠比、古田 明日香、伊川 正人、中村 肇伸、全能性細胞で高発現する Btg4 の初期発生における必要性 「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」第 3 回若手勉強会、2015 年 7 月 22 日、ラフォーレ修善寺 (静岡県・伊豆市)

荒川 達彦、中谷 庸寿、小田 昌朗、木村 康義、関田 洋一、木村 透、中村 肇伸、仲野 徹、初期胚のクロマチン再構成におけるヒストンシャペロンの役割、「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」第 3 回若手勉強会、2015 年 7 月 22 日、ラフォーレ修善寺 (静岡県・伊豆市)

中谷 庸寿、山縣 一夫、木村 透、小田 昌朗、中島 啓行、堀 真由子、関田 洋一、荒川 達彦、中村 肇伸、仲野 徹、マウス受精卵における Stella の雌性ゲノム保護とその初期胚発生への重要性、第 9 回

日本エピジェネティクス研究会年会、
2015年5月25日、学術総合センター
橋講堂（東京都・千代田区）

Tsuiji A, Nakamura T, Shibata K,
Biotin-deficient diet induces
abnormal oocyte in mouse, 12th Asian
Congress of Nutrition, 2015年5月16
日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

中村 肇伸、仲野 徹、全能性細胞で高発
現する遺伝子群の機能解、CREST「エピゲ
ノム研究に基づく診断・治療へ向けた新
技術の創出」研究領域 第4回領域会議、
2015年2月21日、千里ライスサイエン
スセンター（大阪府・吹田市）

仲野 徹、中村 肇伸、エピゲノム成立の
分子メカニズムの解明と制御、CREST「エ
ピゲノム研究に基づく診断・治療へ向
けた新技術の創出」研究領域 第4回領域
会議、2015年2月21日、千里ライスサ
イエンスセンター（大阪府・吹田市）

辻 愛、中村 肇伸、他、マウスにおける
ピオチン欠乏は卵子の質を劣化させる、
第13回日本栄養改善学会近畿支部学術
総会、2014年12月7日、京都女子大学
（京都府・京都市）

中村 肇伸、他、Asymmetry in histone H2B
O-GlcNAcylation between paternal and
maternal chromatin of mouse zygotes、
第37回日本分子生物学会年会、2014年
11月26日、パシフィコ横浜（神奈川県・
横浜市）

荒川 達彦、中谷 庸寿、関田 洋一、木村
透、中村 肇伸、他、初期胚のクロマチン
再構成におけるヒストンシャペロンの役
割、第37回日本分子生物学会年会、2014
年11月26日、パシフィコ横浜（神奈川
県・横浜市）

岡井 晋作、臼井 文人、野村 慎太郎、中
村 肇伸、他、腸炎モデルマウスに対する
腸管 IgA 抗体の作用機序の解明
第37回日本分子生物学会年会、2014年
11月26日、パシフィコ横浜（神奈川県・
横浜市）

中村 肇伸、受精卵における胚性遺伝子の
活性化機構の解明、「生殖細胞のエピゲノ
ムダイナミクスとその制御」第2回公開
シンポジウム、2014年11月1日、九州
大学・病院キャンパス・コラポステーシ
ョン1（福岡県・福岡市）

Nakamura T, et al, Asymmetry in histone
H2B O-GlcNAcylation between paternal

and maternal chromatin of mouse
zygotes, Cold Spring Harbor Laboratory
meeting EPIGENETICS & CHROMATIN,
September 9, 2014 (New York, USA)

Nakatani T, Yamagata K, Kimura T, Oda
M, Nakashima H, Hori M, Sekita Y,
Arakawa T, Nakamura T, et al, Stella
preserves maternal chromosome
integrity by inhibiting
5hmC-dependent H2AX accumulation,
Cold Spring Harbor Laboratory meeting
EPIGENETICS & CHROMATIN, September 9,
2014 (New York, USA)

⑳ 井上 貴美子、及川 真実、上村 悟氏、
越後貫 成美、中村 肇伸、他、トリコス
タチン A 処理による体細胞核移植クロー
ン胚の転写因子関連遺伝子発現の改善
について、第107回日本繁殖生物学会大
会、2014年8月21日、帯広畜産大学（北
海道・帯広市）

㉑ 荒川 達彦、中谷 庸寿、関田 洋一、木
村 透、中村 肇伸、他、初期胚のクロマ
チン再構成におけるヒストンシャペロ
ンの役割、第3回大阪大学医学系研究科
若手研究フォーラム、2014年7月30日、
大阪大学銀杏会館（大阪府・吹田市）

㉒ 鈴木 健士、後藤悠比、中村 肇伸、全
能性細胞で高発現する Btg4 の機能解析、
「生殖細胞のエピゲノムダイナミクス
とその制御」第2回若手勉強会、2014年
7月16日、つくばグランドホテル（茨城
県・つくば市）

㉓ 後藤悠比、鈴木 健士、中村 肇伸、着床
前胚における Klf17 の重要な役割、「生
殖細胞のエピゲノムダイナミクスとそ
の制御」第2回若手勉強会、2014年7月
16日、つくばグランドホテル（茨城県・
つくば市）

㉔ 中村 肇伸、他、受精卵におけるヒスト
ン H2B の N-アセチルグルコサミン修飾、
第8回日本エピジェネティクス研究会年
会、2014年5月26日、伊藤国際学術研
究センター（東京都・文京区）

㉕ 備前 典久、金子 祥子、鹿川 哲史、中
村 肇伸、他、胎生の進行に伴う神経幹
細胞・前駆細胞のアストロサイト分化能
獲得へのメチル化シトシンヒドロキシ
ラーゼ Tet3 の関与、第7回神経発生討
論会、2014年3月13日、大阪大学銀杏
会館（大阪府・吹田市）

㉖ 金子 祥子、備前 典久、鹿川 哲史、中

村 肇伸、他、メチル化シトシンヒドロキシラーゼ Tet3 による胎生期培養神経幹細胞・前駆細胞のニューロン分化促進作用、第 7 回神経発生討論会、2014 年 3 月 13 日、大阪大学吹田キャンパス銀杏会館(大阪府・吹田市)

- ⑳ 中村 肇伸、仲野 徹、受精卵におけるヒストン H2B の N-アセチルグルコサミン修飾とその意義、CREST「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」第 3 回領域会議・キックオフミーティング、2014 年 1 月 31 日、福岡ガーデンパレス(福岡県・福岡市)
- ㉑ 仲野 徹、中村 肇伸、エピゲノム成立の分子メカニズムの解明と制御、CREST「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」第 3 回領域会議・キックオフミーティング、2014 年 1 月 31 日、福岡ガーデンパレス(福岡県・福岡市)
- ⑳ 中村 肇伸、受精卵におけるヒストン H2B の N-アセチルグルコサミン修飾とその意義、「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」第 1 回公開シンポジウム、2013 年 11 月 14 日、大阪大学微生物病研究所谷口記念講堂(大阪府・吹田市)
- ㉓ 後藤 悠比、鈴木 健士、中村 肇伸、全能性細胞で高発現する Klf17 の機能解析「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」第 1 回若手勉強会、2013 年 11 月 14 日、大阪大学微生物病研究所谷口記念講堂(大阪府・吹田市)
- ㉔ 鈴木 健士、後藤 悠比、中村 肇伸、全能性細胞で高発現する Btg4 の機能解析「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」第 1 回若手勉強会、2013 年 11 月 14 日、大阪大学微生物病研究所谷口記念講堂(大阪府・吹田市)
- ㉕ 中村 肇伸、受精卵における能動的 DNA 脱メチル化の制御機構の解明、大阪大学蛋白質研究所セミナー「DNA メチル化の制御機構」、2013 年 11 月 1 日、大阪大学蛋白質研究所一階講堂(大阪府・吹田市)
- ㉖ 中谷 庸寿、木村 透、小田 昌朗、中島 啓行、中村 肇伸、仲野 徹、マウス受精卵における 5mC から 5hmC への変換の制御機構、2013 年 5 月 30 日、第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂(奈良県・奈良市)
- ㉗ 舟木 壮一郎、中村 肇伸、奥村 明之進、仲野 徹、エピジェネティクスな変化と癌 ゲノムの低メチル化が細胞の腫瘍化に及ぼす影響、第 113 回日本外科

学会定期学術集会、2013 年 4 月 11 日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

〔図書〕(計 5 件)

中村 肇伸、医学書院、生体の科学「着床前胚と始原生殖細胞における DNA メチル化リプログラミング」、2015、7 ページ

中村 肇伸、学研メディカル秀潤社、細胞工学「母性因子を用いた iPS 細胞の樹立効率と質の改善」、2015、8 ページ

Nakamura T, Nakano T, Springer, Stella and zygotic reprogramming. In "Epigenetic Mechanisms in Cellular Reprogramming", Epigenetics and Human Health series, Meissner A and Walter J Eds, 2015, p31-42

中村 肇伸、羊土社、実験医学「DNA メチル化はヒトの初期胚で消去される」、2014、2 ページ

中村 肇伸、学研メディカル秀潤社、細胞工学「受精後のエピジェネティック制御」、2014、5 ページ

〔その他〕

ホームページ掲載

中村肇伸准教授らの共同研究が『Nature communications』に掲載されました

<http://www.nagahama-i-bio.ac.jp/research/>

プレスリリース

中村肇伸准教授らの共同研究について

<http://www.nagahama-i-bio.ac.jp/research/>

新聞報道

日本経済新聞、「質の高い iPS 作製」; 京都新聞、「高品質 iPS 細胞作製」; 北日本新聞、「質の高い細胞作製」; 千葉日報、「質の高い iPS 細胞作製」; 愛媛新聞、「卵細胞遺伝子で良質 iPS 作製」; 徳島新聞、「質の高い iPS 作製に成功」; 中日新聞、「質高い iPS 細胞作製」; 毎日新聞、「質高い iPS 細胞作製」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 肇伸 (NAKAMURA TOSHINOBU)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授

研究者番号: 80403202