学位論文審査結果の報告書

氏　　名　　樋口　智香

生年月日　　昭和・(平成)　2　年　12　月　15　日

本籍（国籍）　　岡山県

学位の種類　　博　　士　（　工　学）

学位記番号　　生　第　45　号

学位授与の条件　　学位規程第５条該当
（博士の学位）

論文題目　　マウス初期胚における母性タンパク質分解が発生の制御で果たす役割に関する研究

学位論文受理日　　平成　30　年　1　月　24　日

学位論文審査終了日　　平成　30　年　2　月　7　日

審査委員

（主　査）　松本　和也　教授

（副主査）　細井　美彦　教授

（副主査）　三谷　匡　教授

（副　査）　　印

（指導教員）　松本　和也　教授

論 文 内 容 の 要 旨

生殖細胞に終末分化した卵と精子が融合した受精卵は、エピジェネティックなリプログラミングの過程を経て、分化全能性を獲得し、初期胚の特定の時期まで、それを維持している。この分化全能性の獲得と維持のために重要な事象が、母性から胚性への移行（maternal to zygotic transition, MZT）である。この移行時期には、卵子形成の際に蓄積される母性由来の mRNA やタンパク質の分解、さらに胚性ゲノム活性化（zygotic genome activation, ZGA）と呼ばれる胚性ゲノムの転写が起きる（Schier AF., 2007)。これらは協調的に働くことが知られている（Lee MT et al., 2014)。特に母性タンパク質の分解は、真核細胞の主要なタンパク質分解機構であるユビキチン・プロテアソーム系（ubiquitin-proteasome system, UPS）が関与することが知られている（DeRenzo C et al., 2004)。これらの詳細な分子機構を理解することは、全能性獲得への重要な知見を提供するものと考えられる。

我々は、これまでに UPS がマウス初期胚における minor ZGA の開始に重要であることを示している（Shin SW et al., 2010)。また、マウス卵母細胞特異的に発現するプロテアソーム形成シャペロンタンパク質 Zygote-specific proteasome assembly chaperone （ZPAC）による胚性 20S プロテアソームの形成は初期胚発生に必要であることを明らかにしている（Shin SW et al., 2012)。このことから、MZT 時期においてプロテアソームによる分解系が重要であることが示されている。さらに、人工多能性幹細胞や胚性幹細胞といった多能性幹細胞において、UPS が多能性維持や細胞内リプログラミングを制御することが明らかとなっている。このことから、UPS が関与する分化全能性をもつ細胞へと転換される自然リプログラムの分子機構の理解は、終末分化した細胞を人工的にリプログラム化する技術の向上に貢献することが期待される。しかしながら、プロテアソーム分解系による母性タンパク質分解を介した ZGA の開始制御の分子機構は未だ不明である。そこで、本研究では、MZT 時期における母性タンパク質分解による ZGA の制御機構を明らかにすることを目的に、プロテアソーム活性の阻害が、2 細胞期の胚性遺伝子発現に及ぼす影響、さらに過剰発現法を用いた母性タンパク質の過剰発現による検討を行った。

まず、第2章では、マウス2細胞期胚におけるUPSがmajor ZGAで果たす役割について検討した。これまでに我々は、プロテアソーム阻害剤MG132による、マウス受精直後におけるプロテアソーム活性の一過性の阻害が、RNA ポリメラーゼIIの核への移行と、リン酸化を阻害し、その結果、minor ZGAの開始の遅延を引き起こすことを明らかにした（Shin SW et al., 2010; 清水、博士論文、2013）。この結果は、UPSの阻害によって、クロマチンリモデリングが正確に起きていないことを示唆している。また、minor ZGA及びmajor ZGAの転写機構は、クロマチン状態の根本的な違いから、その転写活性化機構の違いが示されている（Wu J et al., 2016）。これらのことから、マウス2細胞期におけるmajor ZGAの制御でUPSが果たす役割の重要性を明らかにすることを目的に、2細胞期における一過性のMG132処理が、major ZGAの遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。プロテアソーム活性を阻害しながらも、胚発生に影響を及ぼさない条件として、第一分裂時期の時間を元に2細胞期を初期・中期・後期（0-6, 6-12, 12-18時間）に分け、全て5μMのMG132処理区として設定した。まず、2細胞期におけるMG132処理が、プロテアソームの活性を一過性に阻害することを検証するために、MG132処理胚におけるポリユビキチン化タンパク質の発現を調べたところ、一過性に蓄積され、処理後は減少することが認められた。また、同阻害が着床前胚発生に及ぼす影響を調べた結果、2細胞期において一過性にMG132処理した胚は、胚盤胞期胚まで発生することが明らかとなった。以上の結果から、同処理条件は、一過性にプロテアソーム活性を抑制しながらも、発生に影響を及ぼさない条件であることが示された。次に、2細胞期における一過性のプロテアソーム阻害が、major ZGAの遺伝子発現に及ぼす影響について、定量的PCR解析により検討した。第一分裂後18時間では、それぞれ2細胞期に発現上昇するmajor ZGAの遺伝子の発現量は、無処理区と比較して全体的に減少しており、処理後の第一分裂後26時間では、発現量が増加することが示された。以上の結果から、マウス2細胞期においてUPSは、major ZGAの開始制御に関与している可能性が示唆された。

次に、第3章では、母性タンパク質の過剰発現が、MZTの進行に及ぼす影響について検討した。卵母細胞において合成された母性タンパク質は、卵子形成、また受精後の分割時期の発生に必要である。その役割を果たしたタンパク質

は、UPS によって分解される。しかしながら、UPS によって分解され、ZGA の制御に関与する母性タンパク質は明らかとなっていない。そこで、受精後の UPS による母性タンパク質分解が関与する ZGA の制御機構の解明を目的に、受精卵におけるタンパク質の過剰発現法を用いて、胚発生に関与する母性タンパク質の探索を行った。まず、バイオインフォマティクス解析から、8 つの"受精後、UPS により分解され、転写抑制に関連する母性候補タンパク質"を同定した。続いて、受精卵において各母性候補タンパク質の過剰発現が、着床前胚発生に及ぼす影響について検討した。その結果、4 細胞期への発生を有意に抑制するタンパク質として、Protein inhibitor of activated STAT y (PIASy)を同定した。また、マウス卵母細胞及び初期胚における、PIASy の発現プロファイルを調べたところ、卵母細胞において高発現しており、受精後、UPS によって分解されることが示された。このことから、胚発生を進行するために、MZT における UPS による PIASy の分解が重要である可能性が示唆された。

PIASy は、SUMO リガーゼ活性の機能をもつタンパク質である。そこで、SUMO リガーゼ活性が胚発生を阻害するか調べるために、SUMO リガーゼ不活化変異体（MUT）を過剰発現した受精卵の胚発生を検討した。その結果、MUT の過剰発現は、胚発生に影響を及ぼさないことが明らかとなった。このことから、受精後の PIASy の過剰発現による胚発生停止の一因は、SUMO リガーゼ活性の機能の亢進であることが示唆された。次に、PIASy の過剰発現が ZGA に及ぼす影響について調べるために、RNA シークエンス解析を行った。PIASy を過剰発現した 2 細胞期では、対照区と比較して、ZGA 時期に発現する遺伝子群の発現量が有意に減少していたことから、ZGA が起こっていないことが明らかとなった。以上の結果から、受精後の PIASy の分解は、ZGA に必要であり、その後の正常な胚発生に必要であることが示唆された。

本研究から、マウス 2 細胞期において UPS によるタンパク質分解が、胚性遺伝子発現の開始に重要な役割を果たしていることが明らかとなり、さらに、全能性を獲得するために必要な母性から胚性への移行時期において、胚性遺伝子発現が起こるために重要な、UPS によって分解される特定のタンパク質を明らかにした。

論 文 審 査 結 果 の 要 旨

終末分化した卵と精子が融合した受精卵は、自律的に個体を構成する全ての細胞に分化可能な能力である分化全能性を獲得する。哺乳動物における受精時の全能性獲得の分子機構の解明は、体細胞クローン技術の向上や、再生医療分野への応用などに貢献することから、生命科学において重要な課題である。全能性獲得過程では、母性から胚性への移行（maternal to zygotic transition, MZT）する過程を経る必要があり、この時期には、母性由来の mRNA やタンパク質の分解と胚自身のゲノムからの転写が起きる胚性遺伝子の活性化（zygotic genome activation、ZGA）の現象が存在している。また、ZGA は、マウスでは、1 細胞期に起こる minor ZGA と 2 細胞期におこる major ZGA は独自の分子機構で起こることが明らかになっている。一方、母性タンパク質の分解には真核細胞のタンパク質分解機構であるユビキチン・プロテアソーム系（ubiquitin-proteasome system, UPS）が関与することが認められている。これまでに、著者らの研究室では、マウス初期胚における UPS の働きが minor ZGA の開始に必要であること（Shin SW *et al.*, 2010)、さらに初期胚において特異的なプロテアソーム複合体形成機構が存在することを示して（Shin SW *et al.*, 2012)、MZT における UPS によるタンパク質分解系の重要性を明らかにしてきた。しかしながら、UPS による母性タンパク質分解を介した ZGA の詳細な分子制御機構の解明が課題となっていた。そこで、本論文では、MZT 時期における母性タンパク質分解が ZGA の分子制御機構で果たす役割を明らかにすることを目的に、以下に示す 2 つの研究アプローチで研究を展開した。

まず、第 2 章では、マウス 2 細胞期胚における UPS が major ZGA で果たす役割について、プロテアソーム活性の阻害により検討した。著書らの研究室では、これまでにマウス受精卵におけるプロテアソーム活性の一過性の阻害は、RNA ポリメラーゼ II の DNA へのリクルートを遅延させ、その結果、minor ZGA の開始を遅延させることを報告している（清水、博士論文、2013)。このことは、UPS の阻害によって、クロマチンリモデリングが正確に起きていないことを示唆している。また近年、minor ZGA 及び major ZGA の転写活性化機構には違いがあることが示されている。以上のことから、マウス 2 細胞期における UPS が major ZGA の制御で果たす役割を明らかにすることは、ZGA の分子制御機構のさらなる理解に繋がると考えられた。そこで、2 細胞期における一過性のプロテアソーム阻害剤 MG132 処理が、major ZGA の遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。