

論文内容の要旨

氏名	しん せん うく 申 承 旭
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	生第25号
学位授与の日付	平成22年9月15日
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当
学位論文題目	マウス初期胚におけるユビキチン-プロテアソーム系の機能に関する研究 (Studies on function of ubiquitin - proteasome system in early mouse embryo)
論文審査委員 (主査)	教授 松本和也
(副主査)	教授 細井美彦
(副主査)	教授 佐伯和弘

After fertilization, two programming events, i.e., deprogramming with erasure of the oogenic program as oocytes and reprogramming with establishment of the embryonic program as totipotent zygotes, are coordinately regulated (Evsikov & Marin de Evsikova, 2009; Matsumoto et al, 1994; Schultz, 1993; Stitzel & Seydoux, 2007). This process, called maternal-to-zygotic transition (MZT), consists mainly of the elimination of maternal mRNAs, the degradation of maternal proteins, and the transcription of zygotic genes (DeRenzo & Seydoux, 2004; Evsikov et al, 2006; Evsikov & Marin de Evsikova, 2009; Matsumoto et al, 1994; Schultz, 1993; Stitzel & Seydoux, 2007). The ubiquitin-proteasome system (UPS) is required for the degradation of such maternally stored proteins (DeRenzo & Seydoux, 2004). However, the mechanisms underlying the structure and functions of the UPS at the maternal-to-zygotic transition are poorly understood.

To understand the mechanism governing entry of oocytes to totipotent zygotes during the MZT of early mouse embryos, we obtained genes whose expression was specifically changed at the MZT by an mRNA differential-display analysis between oocytes at the MII stage and embryos at the late one-cell stage (Matsuoka et al, 2008; Mizuno et al, 2006). Of the genes identified, one was a mouse gonad-specific expressed gene that we named DD2-2, which is not functionally characterized, but only shown to be preferentially expressed in the mouse oocyte (Joshi et al, 2007; Sakurai et al, 2005). DNA sequences of DD2-2 reveal the open reading frame of 1056 bps encoding a 351 amino acid protein with a predicted molecular mass of 41.5 kDa.

In chapter 2, to understand the function of DD2-2 gene in mouse tissues and early embryos, we performed expression profile analysis of DD2-2 gene in mouse tissues and early embryos. As a result, mRNA of DD2-2 was expressed in the ovary and testis. Furthermore, we also confirmed that DD2-2 protein was expressed in the ovary and testis using the anti-DD2-2 antibody. Transcripts and proteins of DD2-2 were found in spermatogonia of mouse testis and full growing oocytes of mouse ovary.

These observations were confirmed in transgenic mice carrying integrated mouse DD2-2 promoter-driven enhanced green fluorescent protein (EGFP) cDNA. In mouse early embryos, the DD2-2 gene showed a unique expression profile, in which the level of DD2-2 mRNA and protein at oocytes transiently increased at the two-cell stage and then drastically decreased by four- and eight-cell stages, respectively. Correlating with the western blot analysis results, cytoplasmic distribution of DD2-2 was observed in GV and MII stage oocytes and after fertilization, intensive signals of proteins were diffusely detected in the cytoplasm and nucleus at the one- and two-cell stages. As development proceeded, the DD2-2 signals were barely detectable at the four- and eight-cell stages, respectively. These results suggest that DD2-2 may play a role in the mouse gonads and MZT in early embryos.

DD2-2 was specifically expressed in mouse gonads and early embryos. However, the function of DD2-2 in mouse gonads and early embryos is not elucidated. In chapter 3, to investigate the genes which interact with DD2-2, we performed a yeast two-hybrid system with mouse ovary cDNA library. Furthermore, we performed expression profile analysis of interacting gene with DD2-2 in mouse tissues and early embryos. As a result, we identified POMP (proteasome maturation protein) (also called as Ump1 or proteasemblin) and Ft11 (ferritin light chain 1) as a protein interacting with DD2-2. Here, we focused on the POMP protein. Interaction between DD2-2 and POMP in two-cell embryos at 24 h post insemination (hpi) was confirmed in the reciprocal experiment by co-immunoprecipitation using each specific antibody. Furthermore, we observed in a yeast two-hybrid system that DD2-2 protein interacted at its N-terminal region with POMP protein, although specific domains were not detected in this region. In expression profile analysis in adult mouse tissues, POMP was expressed in all examined adult mouse tissues including testis and ovary. Especially, using immunohistochemical staining, intensive signals of POMP proteins were detected in spermatogonia and full growing oocytes like DD2-2. In expression profile of POMP in mouse early embryos, the amount of POMP mRNA decreased

gradually from oocytes to the four-cell stage, whereas relative abundance of POMP protein in oocytes and fertilized zygotes also decreased at the eight-cell stage. We confirmed that DD2-2 was co-localized with POMP in GV, 1-cell of 6 hpi, and 2-cell of 24 hpi. DD2-2-POMP interaction, their subcellular co-localized in oocytes and early embryos. Interestingly, we found an accumulation of DD2-2 and POMP appearing as dots in the nucleus. Taken together, DD2-2, which is POMP a binding protein, may play a role in the assembly of 20S proteasome in mouse early embryos.

In chapter 4, to investigate the functions of DD2-2 and POMP in early mouse embryos, we examined effect of knockdown of DD2-2 or POMP gene on development of mouse embryos, and also effect of knockdown of each gene expression of cell cycle-associated protein and maternally effect proteins. As a result, antisense knockdown of DD2-2 or POMP expression caused embryonic arrest at the one-cell stage. These embryos failed to degrade cyclin B1, Mos, and two maternal-effect gene products, OOG1 and ZAR1, and significantly increased the accumulation of polyubiquitinated forms of those proteins. Furthermore, antisense knockdown of DD2-2 caused a significant reduction of POMP levels in early mouse embryos, followed by a reduction in 20S proteasomes. DD2-2 and POMP were specifically associated with unprocessed  $\beta$ -subunits as well as  $\alpha$ -subunits of 20S proteasomes, but not with 19S regulatory particles in early mouse embryos. Taken together, these findings indicate that DD2-2 is required for the assembly of embryonic 20S proteasomes, which mediate progression of the MZT initiating normal development.

In conclusion, we identified a proteasome maturation protein (POMP) stabilizing protein, DD2-2, and showed that it is required for degradation of maternal proteins at the MZT, which is essential for normal embryonic development.

## 論文審査結果の要旨

初期胚の受精後、胚発生の支配が母性から胚性に以降する時期 (Maternal-to-zygotic transition, MZT) において、母性プログラムからの脱プログラム化と胚性プログラムへのリプログラム化が起きると考えられている。この時期には、卵母細胞に蓄積された母性 mRNA や母性タンパク質の分解、そして胚性遺伝子の発現 (胚性遺伝子の活性化) が起こることが知られている。そして、MZT は受精卵が分化全能性を獲得する時期であることから、母性 mRNA や母性タンパク質の分解、そして、胚性遺伝子の活性化の分子制御機構の解明は分化全能性制御の分子機構を理解する上でも重要な意義を持っている。これまで、胚性遺伝子の活性化に関しては様々な研究が行われているものの、まだその明確な分子制御機構は明らかになっておらず、さらに母性タンパク質の分解機構に関する知見は非常に限られている。

タンパク質の分解機構の一つとして、ユビキチン-プロテアソーム系 (Ubiquitin-proteasome system, UPS) がある。この UPS は、タンパク質に付加されたユビキチン鎖をプロテアソームが認識し、ATP 依存的で迅速かつ不可逆的に標的タンパク質を分解するシステムである。また、様々な組織や細胞で存在する UPS は、細胞周期制御、DNA 修復、細胞死、免疫応答、シグナル伝達、転写制御、代謝、品質管理、発生などの様々な生命活動に重要な役割を果たしている。しかしながら、受精卵や初期胚においては、UPS の存在は示されているものの、母性タンパク質の分解機構における UPS の機能及びその構造は未だ明らかになっていない。

本論文は、マウス初期胚における MZT 時期に発現が変化する遺伝子群 (DD 遺伝子) の同定に関する実験から単離・同定した機能未知遺伝子 DD2-2 に着目してその機能解析を行った結果、受精直後のタンパク質の分解機構や ZGA 開始機構に UPS が深く関与しており、さらに初期胚における UPS 活性の安定的な維持に DD2-2 が関わっていることを明らかにした論文となっている。その内容は、以下の通りである。

まず第 2 章では、発現プロファイル解析から、DD2-2 はマウス精巣と卵巣で特異的に発現しており、さらに精巣では精原細胞、卵巣では卵母細胞で局在することを認めた。一方、マウス GV 期卵から発現している DD2-2 は、受精後 24 時間で特異的にその発現が増加するが、受精後 36 時間にはその発現は急激に減少し、それ以降の初期胚では殆ど発現していないことを認めた。さらに、初期胚では、DD2-2 タンパク質は細胞質や核内で局在しており、核内ではドットの形で局在していることを観察した。これらのことから、DD2-2 は受精卵においては MZT 時期において特異的に何らかの機能を果たすことを示唆した。

次に第 3 章では、卵巣 cDNA ライブラリーを用いた酵母 two-hybrid system 法によ

る DD2-2 と相互作用するタンパク質の探索を行い、発現解析から、マウス初期胚での DD2-2 の機能を予測した。その結果、DD2-2 は 20S プロテアソームの形成に関与する分子シャペロン POMP (Proteasome maturation protein) と相互作用することを認めた。また、免疫沈降実験の結果、初期胚においても DD2-2 は POMP と相互作用することを明らかにした。発現プロファイル解析から、POMP は調べた全てのマウス組織で発現しているものの、精巣の精原細胞及び卵巣の卵母細胞で発現局在が認められた。卵及び初期胚では、POMP は GV 期卵から受精後の初期胚で発現しているが、その後発生が進むに従ってその発現量も減少することを認めた。さらに、POMP は初期胚の細胞質や核内で DD2-2 と共局在し、核内では DD2-2 と同様にドット様に局在していることも観察した。以上のことから、マウス初期胚において DD2-2 は POMP と相互作用し、プロテアソームの形成に重要な役割を果たす可能性を示した。

第 4 章では、マウス初期胚における UPS によるタンパク質の分解機構や ZGA 開始機構に関して調べた。初期胚で DD2-2 と POMP をそれぞれノックダウンした胚は、1 細胞期で胚停止し、停止した胚はユビキチン化タンパク質が分解されず蓄積していたことを認めた。さらに、停止した胚では、細胞周期関連タンパク質 (Cyclin B1, Mos) のみならず、母性タンパク質 (OOG1, ZAR1) が分解されず、ユビキチン化されていることが明らかにした。一方、プロテアソーム阻害剤 MG132 で処理した胚では ZGA の開始が遅れることを認めた。以上のことから、UPS が母性タンパク質の分解に加えて、胚性遺伝子の活性化にも関与していることを示した。さらに、DD2-2 をノックダウンした胚では POMP のタンパク質量が減少し、さらに 20S プロテアソームサブユニットタンパク質量が減少することを認めるとともに、DD2-2 は POMP と同様に 20S プロテアソームサブユニットと相互作用することや前駆体の  $\beta$  サブユニットと相互作用することから、DD2-2 は POMP の安定性に関与する可能性を示し、そして DD2-2 と POMP は共に 20S プロテアソームの形成に関わっていることを明らかにした。

以上のように、本論文は、マウス初期胚の MZT 時期において UPS のタンパク質分解機構が母性タンパク質の分解と胚性遺伝子の活性化に関与していることを初めて明らかにするとともに、新規に同定した DD2-2 がタンパク質分解機構を持つ 20S プロテアソーム形成に POMP とともに初期胚特異的に関わっていることを初めて認めており、博士 (工学) 論文として価値あるものと認める。