

哺乳動物初期胚におけるタンパク質分解機構の機能解明に向けた研究の現状と今後の展望

樋口 智香¹, 清水 なつみ², 天野 朋子^{1,2}, 松本 和也^{1,2}

要約

哺乳類では、着床前の初期胚の発生過程で、母性から胚性への移行時期 (maternal to zygotic transition, MZT) に、胚発生に重要な現象である胚性ゲノムの活性化 (zygotic gene activation, ZGA) が起きる。この ZGA の開始には、母性の mRNA やタンパク質の分解が必要であり、特に母性タンパク質の分解には、オートファジーやユビキチン・プロテアソーム経路 (ubiquitin proteasome system, UPS) によるタンパク質分解機構が関与していることが明らかにされている (1)。オートファジーは、栄養飢餓への応答やタンパク質の品質管理などのさまざまな生理学的過程で働いている。また、UPS は真核細胞において選択的なタンパク質分解を行い、細胞周期、シグナル伝達、細胞死など基本的な細胞の恒常性の維持に関与している。さらに、オートファジー及び UPS に関連する遺伝子の発現やタンパク質の機能を阻害すると、初期胚発生の遅延や胚停止することも報告されている (2, 3)。このことから、タンパク質分解機構は初期胚の発生に重要な役割を果たしていることが示唆される。

そこで、本稿ではオートファジー及び UPS の分子機構を概説し、次に初期胚においてオートファジー及び UPS が果たす役割に関する最近の知見をまとめる。特に、我々の研究室で研究しているマウス初期胚の発生における UPS の関与について焦点をあて、初期胚におけるタンパク質分解のメカニズム解明への今後の研究について展望する。

キーワード: MZT、オートファジー、ユビキチン・プロテアソーム経路

1. 緒言

胚発生は、卵と精子が受精することにより始まる。受精後の発生では母性型から胚性型に移行する時期が存在する。この母性から胚性への移行 (maternal to zygotic transition, MZT) は、母性の mRNA とタンパク質の分解、及び胚性ゲノムの活性化 (zygotic gene activation, ZGA) を伴うため、発生の中でも重要な現象の一つとなっている (図 1) (4, 5, 6)。MZT は様々な生物種で認められており、生物種によってその開始時間や長さは異なることも知られている (6)。

卵子は卵巣内で形成される際に、受精後の発生に備えて多くの母性の mRNA やタンパク質を蓄積する。受精後の初期胚の発生では、これらの分解にもなって胚性ゲノムの転写が開始される。特に、ZGA は、MZT で重要な現象であることが明らかになっている。

ZGA は、minor ZGA と major ZGA に分けられる。マウスでは、minor ZGA は 1 細胞期の G2 期頃に開始するものの、転写活性がとても低く、新たに転写産物が翻訳されることはない (4)。一方、major ZGA は 2 細胞期の初期から始まり、ダイナミックな転写と翻訳が行われる (図 1) (4)。さらに、母性の mRNA 及びタンパク質は分解が阻害されると、ZGA が開始されず、発生が停止することも明らかになっている (1)。つまり、ZGA の開始には母性の mRNA とタンパク質の分解が必要となっている。

原稿受付 2012 年 12 月 3 日

本研究は近畿大学生物理工学部戦略的研究 No.10-IV-7, 2011 の助成を受けた。

1. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科, 2. 近畿大学大学院生物理工学研究科生物学専攻, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

母性 mRNA 分解の分子機構は十分に明らかになっていないが、標的 RNA の 3' 非翻訳領域に制御タンパク質や microRNA が結合することにより誘導されるとの報告もある (1, 7)。一方、母性タンパク質の分解には、体細胞のタンパク質分解機構として知られているオートファジー とユビキチン・プロテアソーム経路 (ubiquitin proteasome system, UPS) が働いている可能性が示されている (2, 3)。

本稿では、哺乳動物初期胚で機能するタンパク質分解機構に関して現在まで得られている知見を紹介し、さらに我々が研究対象としている UPS の役割に焦点をあて、今後の研究の展開について論じる。

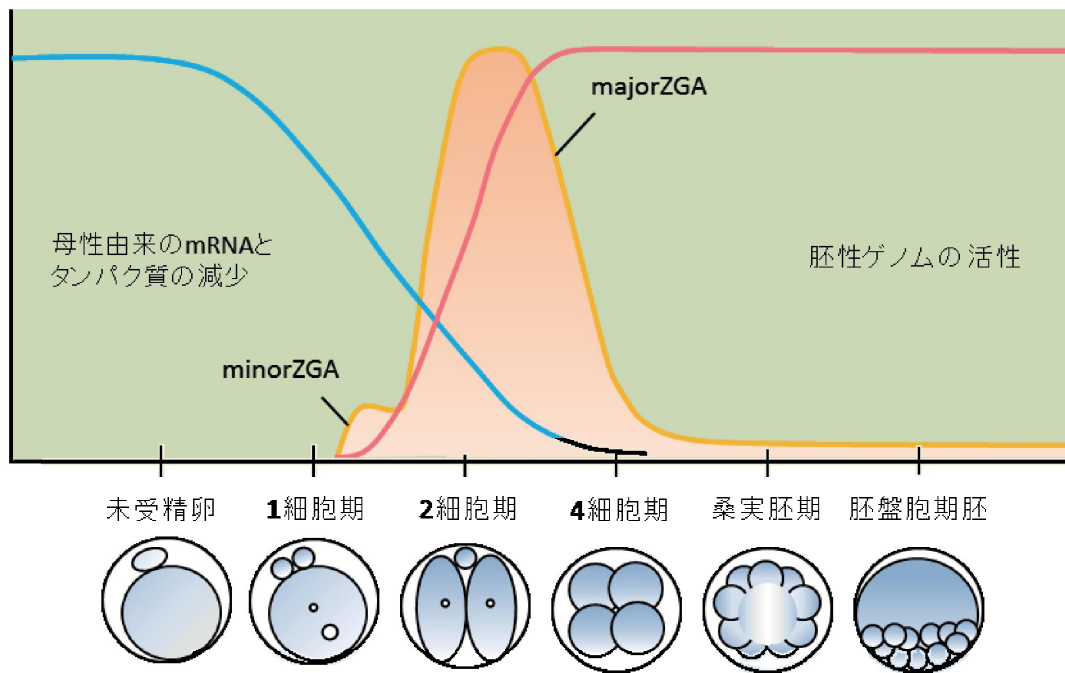


図1 マウス初期胚における MZT の模式図

2. オートファジーによるタンパク質分解機構とその初期胚での役割

2. 1 オートファジーによるタンパク質分解機構

オートファジーは真核生物に高度に保存されている大規模な細胞内分解系である。オートファジーにはメカニズムの違いにより、マクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジーの3種類がある (8)。マクロオートファジーの研究は盛んにおこなわれており、一般にオートファジーと呼ばれるものはマクロオートファジーのことである (8)。オートファジーによるタンパク質分解では、脂質二重膜構造の隔離膜が細胞質成分を取り囲み、オートファゴソームを形成する (8, 9)。そこにリソソームが融合し、オートリソソームを形成する (8, 9)。このリソソームには多数の分解酵素が含まれており、それによって内容物が分解される (8, 9)。そして、内容物はアミノ酸へ分解され、栄養飢餓時のグルコース生成、タンパク質合成や TCA 回路でのエネルギー源として再利用される (図2・上) (8)。オートファジーは当初、飢餓応答が主な役割とされていた。しかし、研究が発展するにつれ、タンパク質の品質管理、抗原提示、細胞内侵入細菌や不良なミトコンドリアの除去など、多くの重要な役割を担っていることが明らかとなった。

2. 2 オートファジーの初期胚での役割

近年、全身のオートファゴソームが蛍光標識されるトランスジェニックマウス (GFP-LC3 マウス) が開発された (3)。過剰排卵処置を行った GFP-LC3 雌マウスから採取した未受精卵、および GFP-LC3 雌マウ

スと野生型の雄マウスとを交配して得た胚における観察から、オートファジーの活性は未受精卵では低い
 が、受精後 4 時間以内に急激に高まるということが明らかにされている (3)。これは受精がオートファジーを起
 こす引き金となっていることを示唆している。また現在、様々なオートファジー関連遺伝子
 (autophagy-related gene, *Atg*) が同定されている。卵特異的に *Atg5* をロックアウトしたマウスを使用した
 実験で、母性の *Atg5* タンパク質が発現していない場合、4 細胞期から 8 細胞期で胚が致死となることが報
 告されており、その初期胚発生中期への影響が示されている (3, 10)。また初期胚は、栄養飢餓への応答
 やタンパク質分解によって生じたアミノ酸を再利用することから、オートファジーは初期胚へのアミノ酸
 の供給という側面で重要であることが示唆されている (11)。

以上のように、オートファジーは哺乳類の着床前胚発生において重要な役割を果たしている。哺乳類の
 細胞内には鳥類や魚類などと違い、栄養分があまり含まれていない。その点で、栄養飢餓への応答の役割
 を果たすオートファジーが哺乳類の発生を支えている可能性が考えられる。

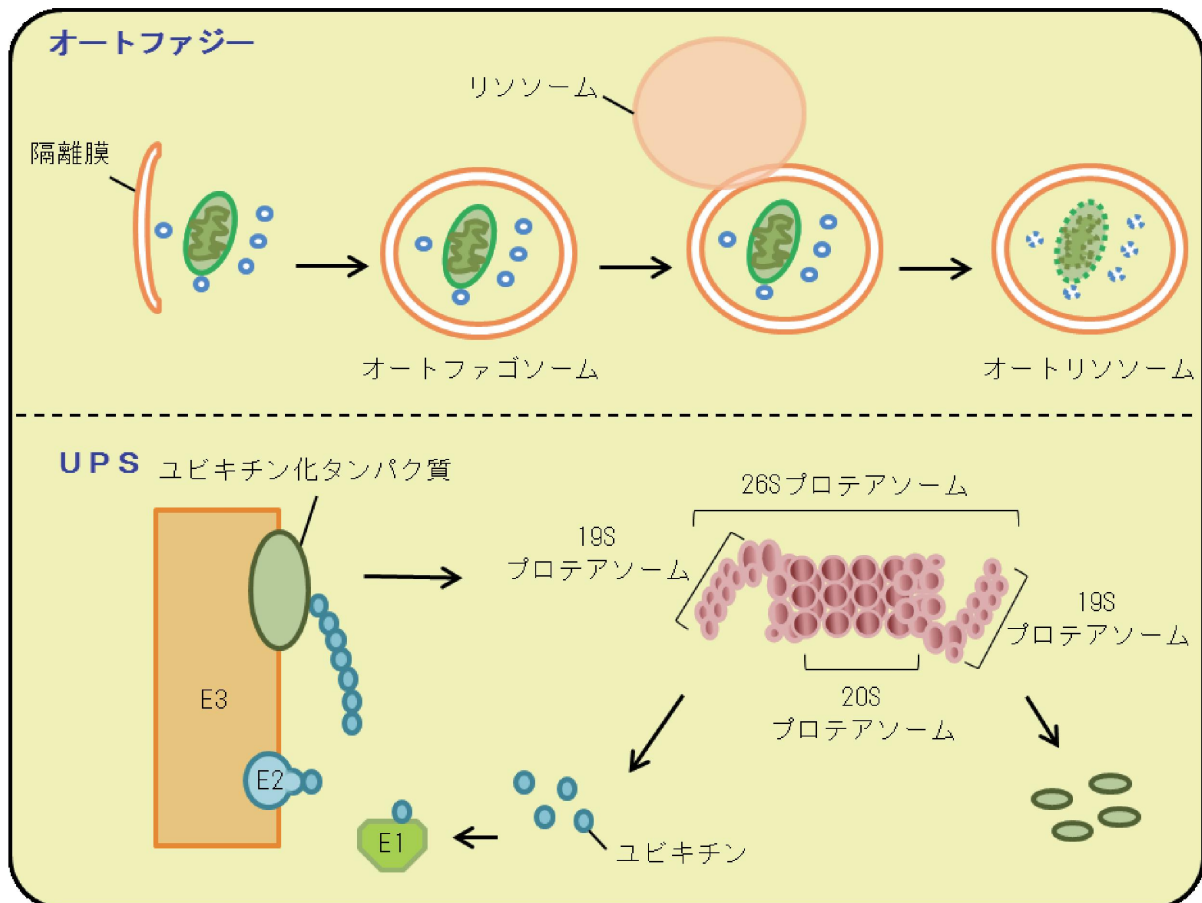


図 2 真核細胞内におけるタンパク質分解機構の模式図

3. UPS によるタンパク質分解機構とその初期胚での役割

3. 1 UPS によるタンパク質分解機構

UPS は真核生物において選択的なタンパク質分解機構として働いている。UPS に特徴的なのは、分解過
 程において ATP を必要とすることである。UPS は細胞周期、シグナル伝達、細胞死、免疫応答、代謝、タ
 ンパク質の品質管理、発生といった基本的な細胞過程のほぼすべてを制御している (12, 13)。また近年、
 プロテアソームとがん、神経変性疾患、心疾患などの疾病との関連も明らかになり、タンパク質分解機構
 やその制御の解明が必要となっている (14)。

UPS は、ユビキチンが選択的に標的タンパク質に結合し、巨大な分解酵素複合体であるプロテアソームによって分解される高度なタンパク質分解経路である。まず、ユビキチンは活性化酵素 (E1) によって活性化され、結合酵素 (E2) へと輸送される。そして、E2 はユビキチンリガーゼ (E3) に結合した標的タンパク質へユビキチンを輸送し、ユビキチン化をおこなう。このようにユビキチンは 3 種類の酵素群の働きにより、標的タンパク質へと結合する (図 2・下)。これをユビキチン修飾系と呼ぶ。E1 は 2 個、E2 は約 30 個、E3 は 500 種類以上の異なったタンパク質がヒトにおいて存在している。特に、標的タンパク質を選択的に認識しユビキチン化する E3 は、ユビキチン修飾系の中核をなす分子であるために多種多様である (12, 15)。また、プロテアソームは 26S プロテアソームで構成されており、20S プロテアソームの両端または片側に 19S 複合体が結合した構造である。酵母や哺乳類を含む様々な真核生物において、20S プロテアソームは樽の形をしており、7 種類の α サブユニット (α 1-7) と 7 種類の β サブユニット (β 1-7) の 2 セットから構成される。19S 複合体は 6 個の ATPase 活性をもつサブユニット (Regulatory particle of triple-ATPase subunits, Rpt subunits) よりなる ATPase リングに 10 種類以上の non-ATPase サブユニット (Regulatory particle of non-ATPase subunits, Rpn subunits) が会合した複合体で、さらに基底部 (base) と蓋部 (lid) に区別される。lid の主な役割はユビキチン化タンパク質を捕捉し、脱ユビキチン化をすることである。この脱ユビキチン化には、26S プロテアソームのサブユニットの中で唯一の脱ユビキチン化酵素である Rpn 11 が機能している。脱ユビキチン化が完了すると、折りたたまれているタンパク質がほどかれ、また 20S プロテアソームの α リング (α サブユニット) が開く。そして、20S プロテアソームの中へとタンパク質が移動し、キモトリプシン様活性 (β 5)、トリプシン様活性 (β 2)、カスパーゼ様活性 (β 1) を有する 20S プロテアソームによって分解される。

このように、プロテアソームによるタンパク質分解機構は複雑であるが、プロテアソームのサブユニットやユビキチン修飾系が密接に関与することで、正確に分解を促進する。また、プロテアソームの形成機序に関しても不明な点が多く、今後の解明が期待されている。

3. 2 UPS の初期胚での役割

近年、UPS は哺乳類卵細胞において、卵母細胞の減数分裂再開、紡錘体構築、極体の放出、前核形成に重要な役割を果たしていることが報告された (16)。マウス卵核胞期卵でプロテアソームを阻害すると、Cyclin B1 やユビキチンタンパク質の局在の変化が認められ、紡錘体構築が異常となる (16)。このことから、UPS が紡錘体の構築に関与していることが示唆されている。また、*Rfpl4* (Ret Finger Protein-Like 4) 遺伝子は E3 を構成するタンパク質の一つである RING finger 様タンパク質をコードしており、生殖細胞特異的に発現する (17)。RFPL4 は Cyclin B1 を標的としており、E2 の HR6A と相互作用することで、減数分裂と MZT に重要な有糸分裂の間の細胞周期制御の鍵となることが示唆されている (17)。また、生殖細胞特異的に発現することから、RFPL4 は他にも母性タンパク質を標的としている可能性がある (17)。

線虫では、UPS による母性タンパク質の分解が報告されている。減数分裂特異的な微小管切断複合体であるカタニンのサブユニット MEI-1/2 は、DYRK (dual-specificity Yak1-related kinase) ファミリーキナーゼ MBK-2 を介した UPS により、有糸分裂の前に分解されることが明らかになっている。*mbk-2* をノックダウンした線虫では、有糸分裂後も MEI-1/2 の局在が認められた。これは MBK-2 を介した UPS によるタンパク質分解が、母性タンパク質を標的とすることを意味している (18)。

我々の研究室では、プロテアソーム阻害剤を至適濃度で受精直後のマウス初期胚に処理したところ、RT-PCR 解析により、4 つの ZGA 遺伝子 (*hsp70.1*, *MuERV-L*, *eif-1a*, *zscan4d*) の発現が遅れたことを明らかにした。またその結果として、胚発生の遅延が認められた (2)。RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) による mRNA の転写はクロマチンリモデリングによって制御されている。近年、プロモーター領域への RNAPII

のリクルートと転写再開、また正確な転写の完了にはプロテアソームのタンパク質分解機構が必要となることが報告された (19, 20)。これらのことより、受精直後の UPS の働きは ZGA の開始に関与することが示唆された。

また、我々は mRNA ディファレンシャル・ディスプレイ法によりマウスの精巣および卵巣、また卵母細胞において特異的に発現している ZPAC (Zygote-specific Proteasome Assembly Chaperone) を同定した (21)。ZPAC はマウス初期 2 細胞期まで一過性に発現が増加し、それ以降発現は減少する。また ZPAC は酵母ツーハイブリッドシステムより、プロテアソーム特異的なシャペロン分子 Ump1 (ubiquitin-mediated proteolysis 1) と相互作用することが明らかとなった (21)。Ump1 は 20S プロテアソームの前駆体形成に関係し、特に β リングの形成に必要となる (12)。ZPAC をノックダウンしたところ、プロテアソームの活性が有意に減少し、Ump1 と成熟型プロテアソームが減少した。それに伴い MZT で分解されるべきタンパク質の蓄積が認められた。これらのことから、ZPAC がマウス MZT の進行に必要であり、プロテアソームの会合過程に関与することが想定できる (21)。また、マウス初期胚において ZPAC を介した UPS が存在することから、初期胚特異的な UPS による分解機構が働いているのではないかと考えられる。

4. 初期胚における UPS の機能解明への展望

これまで述べた現在までの知見より、真核生物の初期胚では、UPS は母性タンパク質の分解の重要な機能を果たしており、一方でオートファジーは栄養飢餓への応答の役割を果たすと考えられている。今後、初期胚において UPS とオートファジーの 2 つの分解機構がそれぞれ全く違った役割を果たしているのか、または協調的に働いているのか、などが解明すべき課題として挙げられる。

受精後の胚では、エピジェネティックな修飾がダイナミックに生じる。このエピジェネティックな修飾には、DNA のメチル化パターンの変化、ヒストンの修飾、クロマチンリモデリングなどが含まれる (1)。我々の研究から、受精直後の UPS の働きはエピジェネティックな修飾に関与する可能性を示唆するデータが得られている (2)。今後、プロテアソームが分解する母性タンパク質やエピジェネティックな修飾を受ける基質の同定や、初期胚におけるプロテアソームの構造や機能の研究が、MZT の詳細な機構解明の切り口になることが期待される。

参考文献

1. Li L, Zheng P, Dean J (2010) Maternal control of early mouse development. *Development*, 137, 859-870
2. Shin SW, Tokoro M, Nishikawa S, Lee HH, Hatanaka Y, Nishihara T, Amano T, Anzai M, Kato H, Mitani T, Kishigami S, Saeki K, Hosoi Y, Iritani A, Matsumoto K (2010) Inhibition of the Ubiquitin-proteasome system leads to delay of the onset of ZGA gene expression, *J Reprod Dev.*, Vol.56, No.6, 655-663
3. Tsukamoto S, Kuma A, Murakami M, Kishi C, Yamamoto A, Mizushima N (2008) Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos, *Science*, 321, 117-120
4. Minami N, Suzuki T, Tsukamoto S (2007) Zygotic Gene Activation and Maternal factors in mammals, *J Reprod Dev.*, Vol.53, No.4, 707-715
5. Bianchi E, Sette C (2011) Post-transcriptional control of gene expression in mouse early embryo development: A view from the tip of the Iceberg, *Genes*, 2, 345-359
6. Tadros W, Lipshitz HD. (2009) The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*, 136, 3033-3042
7. Schier AF. (2007) The Maternal-Zygotic Transition: Death and birth of RNAs, *Science*, 316, 406-407
8. Mizushima N (2007) Autophagy: process and function, *Genes Dev.*, 21, 2861-2873

9. Kraft C, Martens S (2012) Mechanisms and regulation of autophagosome formation, *Curr Opin Cell Biol.*, 24 (4), 496-501
10. Mizushima N, Levine B (2010) Autophagy in mammalian development and differentiation, *Nat Cell Biol.*, 12 (9), 823-830
11. Tsukamoto S, Kuma A, Mizushima N (2008) The role of autophagy during the oocyte-to-embryo transition, *Autophagy*, 4(8), 1076-8
12. Tanaka K (2009) The proteasome: Overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad.*, ser. B 85, 12-36
13. Murata S, Yashiroda H, Tanaka K (2009) Molecular mechanisms of proteasome assembly, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 10(2), 104-15
14. Jung T, Catalgol B, Grune T (2009) The proteasomal system, *Mol Aspects Med.*, 30(4), 191-296
15. Kwak J, Workman JL., Lee D (2011) The proteasome and its regulatory roles in gene expression. *Biochim Biophys Acta*, 1809, 88-96
16. Huo LJ, Fan HY, Zhong ZS, Chen DY, Schatten H, Sun QY (2004) Ubiquitin-proteasome pathway modulates mouse oocyte meiotic maturation and fertilization via regulation of MAPK cascade and cyclin B1 degradation., *Mech Dev.*, 121, 1275-1287
17. Suzumori N, Burns KH., Yan W, Matzuk MM. (2003) RFPL4 interacts with oocyte proteins of the ubiquitin-proteasome degradation pathway, *Proc Natl Acad Sci*, Vol. 100, 550-555
18. Pellettieri J, Reinke V, Kim SK., Seydoux G (2003) Coordinate activation of maternal protein degradation during the egg-to-embryo transition in *C.elegans*. *Dev Cell*, Vol.5, 451-462
19. Lipford JR, Smith GT, Chi Y, Deshaies RJ (2005) A putative stimulatory role for activator turnover in gene expression, *Nature*, 438, 113-116
20. Gillette TG, Gonzalez F, Delahodde A, Johnston SA, Kodadek T (2004) Physical and functional association of RNA polymerase II and the proteasome, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 5904-5909
21. 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 (2012) Mouse zygote-specific proteasome assembly chaperone important for maternal-to-zygotic transition, *Biology Open*, doi: 10.1242/bio. 20123020

英文抄録

Current status and future perspective of protein degradation mechanism in early embryos

Chika Higuchi¹, Natsumi Shimizu², Tomoko Amano^{1,2} and Kazuya Matsumoto^{1,2}

Maternal-to-zygotic transition (MZT) is a critical event for embryonic development, where the degradation of maternal mRNAs and proteins and the initiation of zygotic transcription are orchestrated. Especially, autophagy and ubiquitin-proteasome system (UPS) are known to play a role in protein degradation. Autophagy pathway has various biological effects, such as adaptive responses to starvation and quality control of intracellular proteins, UPS degrades selective proteins in eukaryotic cells, and regulates basic cell pathways such as cell cycle, signal transduction, cell death and development. Recently, several studies have reported abnormal development by inhibiting expression of autophagy and UPS related genes and proteins. Thus, protein degradation mechanisms are important for early embryo development.

This article reviews an overview of functions of autophagy and UPS in early embryos.

Key words: Autophagy, MZT, Ubiquitin-proteasome system

1. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Division of Biological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan