

ゲノム編集とプロテオーム解析の統合による着床前 初期発生に重要なタンパク質発現動態の解析

柿原, 礼佳

<https://hdl.handle.net/2324/7363608>

出版情報 : Kyushu University, 2024, 博士 (理学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :



氏 名 : 柿原礼佳

論文名 : ゲノム編集とプロテオーム解析の統合による着床前初期発生に重要なタンパク質発現動態の解析

区 分 : 甲

論文内容の要旨

哺乳類の個体発生は卵子と精子が結合する受精によって開始される。受精から着床に至るまでの発生を着床前初期発生という。着床前初期胚には卵子から持ち込まれる母性ゲノム由来の mRNA やタンパク質 (母性因子) と受精により形成された胚性ゲノム由来の mRNA やタンパク質 (胚性因子) が混在しており、これらの構成要素は 1 細胞期から 4 細胞期にかけて生じる母性因子の分解と胚性ゲノム活性化により次第に胚性因子に置換されていく。これを maternal-to-zygotic transition (MZT) という。このように、着床前初期発生は体細胞にはみられない特異的なメカニズムにより制御されている。着床前初期発生が個体発生の初期プロセスであることを踏まえると、その分子基盤の解明は、生命科学のみではなく一般社会へも幅広い影響を与える。着床前初期発生の分子基盤の理解には網羅的な解析が有効であり、これまでに哺乳類初期胚を用いたオミクス研究により多様な分子の量的変化 (transcriptome、proteome、epigenome、metabolome、translatome) が明らかになってきた。これらの総合的な解析から、母性因子の存在や翻訳制御機構などにより、転写産物量が必ずしもタンパク質量に反映されないことが示されており、トランスクリプトームからプロテオームを類推することは困難である。したがって、着床前初期発生の分子基盤を理解するためには mRNA だけではなくタンパク質に着目した解析も重要である。最近では、初期胚プロテオミクスの網羅性やスループットが向上しつつあるものの、得られたプロテオームデータの解釈のほとんどが発生ステージ間における胚全体でのタンパク質発現状態の違いを把握するにとどまっている。そこで本研究では、表現型により近い分子であるタンパク質レベルで着床前初期発生の分子基盤を理解するために、ラベルフリー定量プロテオミクスを用いて、マウス着床前初期発生に重要なタンパク質の発現動態を同定及び解析することを目的とした。

まず、マウスの卵母細胞から胚盤胞までの初期胚プロテオミクスを実施し、総計 3,490 種類のタンパク質を定量した。この内、全てのステージにおいて再現して定量された 715 種類のタンパク質についてプロテオームプロファイリングを行った。この結果、桑実胚期から胚盤胞期にかけて顕著なプロテオーム再構成が生じること、及び、翻訳やタンパク質修飾、そしてミトコンドリア代謝に関与するタンパク質が発生ステージ特異的に変動することを明らかにした。

次に、着床前初期発生過程の転写産物量とタンパク質量の変動の相関性を調べるために、得られた初期胚プロテオームデータと既に取得済みの初期胚トランスクリプトームデータの比較解析を実施した。着床前初期胚では、比較対象である分化過程の好中球 (体細胞) よりも発生過程におけるプロテオームとトランスクリプトームの変動が強い正の相関を示す遺伝子の割合が極めて低いことが明らかとなり、初期胚プロテオミクスの意義が強調された。また、この結果は着床前

初期発生におけるタンパク質の転写後制御の重要性を示唆した。

初期胚プロテオームプロファイルでは 8 細胞期以降にタンパク質合成に関与するタンパク質群が顕著に増加していたことから、リボソーム生合成と胚発生の関連性を調べるために、pre-60S ribosome maturation factor であり、マウスのノックダウン胚における胚盤胞形成阻害が既知である WD repeat-containing protein 74 (WDR74) に着目した。WDR74 欠損胚の表現型評価では桑実胚期に細胞数の有意な減少を認め、さらにプロテオーム解析から桑実胚期に有意なプロテオームの変化が生じることが明らかになった。これらの知見は、WDR74 を介したリボソームの生合成が 8 細胞期までは不要であるが、桑実胚期から胚盤胞期の発生において重要な役割を果たすことを新たに示唆した。また、WDR74 の欠損は、細胞分裂のタイミングの制御に関与する ribosomal protein L24 (RPL24) や ribosomal protein L26 (RPL26) を始めとする ribosomal protein large subunit を顕著に発現低下させたが、ribosomal protein small subunit の多くは変化しなかった。

以上の成果から、本研究では、初期胚発生におけるプロテオームの変化から胚盤胞発生における桑実胚期のリボソーム量の増加の重要性を明らかにした。これはトランスクリプトーム解析では見出せなかった知見である。本研究により初期発生過程のタンパク質レベルの制御が重要であると示されたことから、今後の研究では、pulsed SILAC 法を用いた初期胚タンパク質のターンオーバー解析や機能プロテオミクスの実施により、本研究の全胚発現プロテオーム解析のみでは捉えられなかったタンパク質の合成と分解のバランスやタンパク質修飾状態にも焦点を当て、より詳細なタンパク質レベルの着床前初期発生制御に対する理解や議論を深めたいと考えている。