

研究題目 初期胚の転写後発現調節が司る全能性制御メカニズムの解明

研究組織

研究代表者：塩見 春彦（慶應義塾大学医学部）
共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）
研究分担者：小林 美栄（慶應義塾大学医学部）
坂下 陽彦（慶應義塾大学医学部）
増田 晴海（慶應義塾大学医学部）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

全能性とは細胞それ1個から胎盤を含む全ての組織に分化することができる能力である。哺乳類における全能性細胞は受精卵であり、その後胚発生が進むにつれて失われ、生涯決して取り戻すことができないのが特徴だ。例えばマウスの場合、受精卵~2細胞期胚で全能性を呈し、その後8細胞期までに完全に失われる。それはわずか2~3日の出来事である。では、初期胚の全能性はどのように制御されているのであろうか？受精卵や2細胞期胚の稀少性や取り扱いの難しさから、この疑問に対する研究はなかなか進まなかった。ごく最近、シングルセル解析技術が開発され、全能性期胚のトランスクリプト像やゲノム構造が次々と明らかとなり、全能性獲得とともに劇的に変化するゲノム構造と転写様態が映し出された(Hug et al. 2018, Trends Genet など)。しかし、それら現象に対する制御メカニズムはまだわかっていない。遺伝子の転写制御が貢献してくることが容易に想像されるが、それに加え、転写後発現調節システムが強く働いていることが示唆されている(Gao et al. 2017, Cell Reports)。これは、多くの動物種で全能性期胚のトランスクリプトームとプロテオームが相関しない結果に基づいている(Peshkin et al. 2015, Dev. Cell など)。

我々は全能性制御における転写後発現調節機構を明らかにするため、マウス初期胚におけるRNA結合タンパク質の発現動態を追った。この結果、RNA結合タンパク質の一つである、Refecが全能性期胚で一時的に発現していることを見出した。さらにRefecをノックダウンした胚は、2~4細胞期胚で発生を停止してしまい、

Refecが全能性発露に必要なタンパク質であると考えられた。本共同研究ではRefecノックダウン初期胚のプロテオーム解析を行い、Refecの転写後調節能、および全能性の制御メカニズムの詳細を追うことを目的とした。

[1-2]研究の方法・経過

Refec mRNAに対するアンチセンスオリゴを受精卵にマイクロインジェクションし、Refecノックダウン胚を作成した。ノックダウン胚はKSOM培地で培養後、2細胞期後期で100胚(200細胞)回収した。回収した胚は酸性タイロイド液(AT)処理により透明帯を除去し、グアニジン-TCEP液に溶解した。本溶解液を用いてTMT(Tandem Mass Tag)標識法による多検体間大規模比較定量解析を行った(n=4)。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

AT処理によって、本来懸念されていた透明帯成分の大量混入を避けることができた。2細胞期後期胚からTMT解析で再現よく検出できたタンパク質種は4252種であった。コントロール胚とRefecノックダウン胚間で有意に(p<0.05)発現変動していたタンパク質は64種であった。そのうち、62種がRefecノックダウン胚で低下している因子であった(図1)。これらタンパク質間の相互作用をSTRINGデータベースで解析したところ、Refecノックダウン胚で低下した因子は、RNA結合タンパク質(FDR=0.0143)やmRNAの代謝経路(FDR=0.0209)に関わる相互作用が有意に濃縮されていた(図2)。

次に、Refee ノックダウン胚におけるトランスクリプトームとプロテオーム変動の相関性を調べた。図3の横軸は Refee ノックダウン胚とコントロール胚間のタンパク質発現量の差、縦軸は RNA 発現量の差を示す。概して両者の間に相関性は認められなかった。これは、2 細胞期後期胚のリファレンスプロテオームの実に 40%以上が卵細胞から持ち込まれたタンパク質から成るためであろう。それに対し、2 細胞期後期胚のタンパク質成分の約 0.2%を占める、マウス内在性レトロウイルス L(MERVL)由来構造タンパク質 Gag が、RNA・タンパク質レベルともに Refee ノックダウン胚において著しく減少していたのは特筆すべき結果であろう。

全能性期胚は、母方と父方のゲノムが対合することで新たなゲノムが誕生し(胚性ゲノム)、それが機能的になる場である。Refeeは概して、全能性期胚における RNA の代謝経路を安定化することで、胚性ゲノムの機能化を促す転写後調節因子であると考えられた。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

ノックダウン初期胚を用いた質量分析は世界的に見ても報告例が少なく、本共同研究結果はかなり貴重な情報源となった。今後はTMT解析で得られた結果を改めて評価すると共に、同定できた表現型が Refee による直接的な転写後調節作用か否かを検討していきたい。

当研究結果でも初期胚におけるトランスクリプトーム・プロテオーム間の非相関性が再現され、その一因として卵細胞から残存するタンパク質量が多いことが提唱できた。これらの知見は、初期胚発生研究におけるプロテオーム解析の重要性を改めて強調するものとなった。

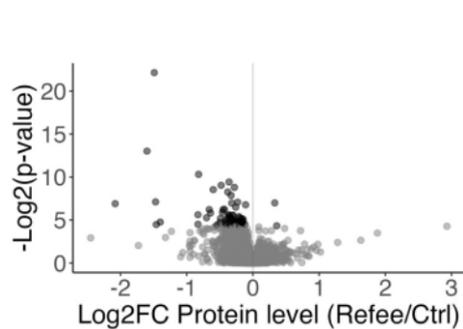


図1. Refee/Ctrl KD胚におけるタンパク質の発現変動。Refee KD胚で有意な発現変動があったタンパク質を黒で示す。

※KD: ノックダウン

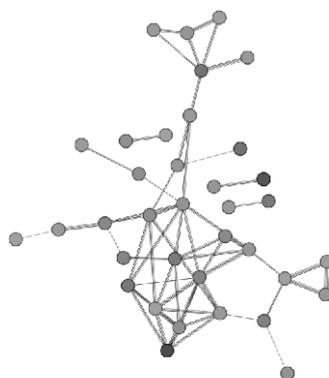


図2. Refee KD胚で低下していたタンパク質の相互関係図。RNAの代謝経路因子の濃縮が認められた。

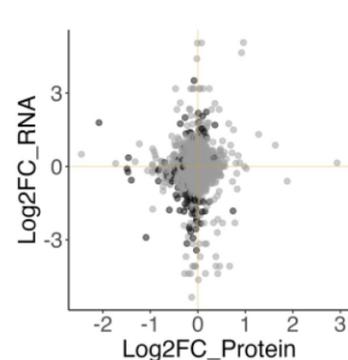


図3. Refee KD胚におけるトランスクリプトームとプロテオーム変動の比較。黒で示した因子がRNAレベル、および・もしくはタンパク質レベルで有意な変動が認められたもの。散布図には直線性が認められない。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

1) 小林 美栄. 内在性レトロウイルスがもたらす生命現象、分化全能性の制御機構について. 日本レトロウイルス学キャンプ SRC2022、口頭発表、2022年7月12日、オンライン

2) @Mie Kobayashi-Ishihara, Akihiko Sakashita, Masaru Ariura, Hirotsugu Ishizu, Tomohiro Kitano, Yonjia Guo, Hidetoshi Hasuwa, Kensaku Murano, Haruhiko Siomi. A mouse endogenous retrovirus drives an Alyref-like gene, Refee, essential for early embryogenesis. 第45回日本分子生物学会学術集会、2022年12月1日、幕張、ワークショップ 2AW-14

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

マイクロインジェクションを施した初期胚は大変希少性が高く、今回 1000 個のノックダウン胚を用意するのにかなりの時間を要した。シングルセル質量分析などといった、より少ない量で高品質なプロテオーム解析ができるようになることを期待している。