

# 卵母細胞膜タンパク質の運命決定機構の解析：ヒト胚への応用に向けて

Analysis of the fate-determining mechanism of oocyte membrane proteins : for application to human embryos

群馬大学医学部附属病院 産科婦人科 助教 森田 晶人

## 要約

加齢に伴う卵子の染色体の異数性が臨床問題である一方で、染色体異常では説明できない反復流産や不妊も一定数存在する。本研究は、受精後の卵子から胚移行期における母性細胞膜タンパク質の選択的な分解に必須とされる、クラスリンを介したエンドサイトーシスの制御因子として、プロテインキナーゼC (PKC) とE3リガーゼに着目し、責任分子の網羅的同定を目的とした。マウス1細胞期胚にエンドサイトーシスマーカーとして蛍光タグをつけたGlyT1aのmRNAを注入し、各種PKC阻害薬下で胚発生とエンドサイトーシスを評価した。高濃度では胚発生停止を認めしたが、生理的範囲では明確な変化を認めず、薬理的介入のみで責任サブタイプを特定することは困難であった。次にE3リガーゼについて、マウスMII卵のプロテオミクス解析により候補を49遺伝子に絞り込み、さらにKO表現型データベース、論文検索、細胞内局在情報、AlphaFoldを用いた構造予測を組み合わせて候補の優先順位付けとさらなる絞り込みを行った。その結果、GlyT1a全長およびC末端では明確な候補は得られなかった一方、N末端解析では一部の候補遺伝子が高い界面信頼度を示した。さらに、36遺伝子を対象としたsiRNAノックダウンスクリーニングにより、10遺伝子で4細胞期への到達率の低下を認め、初期胚発生に関与する可能性のあるE3リガーゼ候補を抽出することができた。本研究のみからこれらの因子の作用段階を特定することはできないが、エンドサイトーシス関連経路を含む初期胚発生制御への関与が示唆された。今後は、各候補遺伝子について形態学的表現型を詳細に比較するとともにレスキュー実験を進め、原因不明の不妊の分子病態解明と生殖補助医療における胚評価への応用を目指す。

## 緒言

近年、女性の社会進出などに伴い妊娠年齢の高齢化が進み、卵子の加齢に伴う染色体異常のリスクが臨床的に顕在化している。ヒト卵子は、加齢により減数分裂時の染色体分離能が低下し、異数性胚を形成しやすくなる。一方で染色体異常を伴わないにもかかわらず、反復流産や不妊を呈する症例が一定数存在し、染色体分離異常では説明できない初期胚発生異常の関与が示唆されている。不育症の約25%、不妊症の約30%が原因不明とされており、これらの病態に対する分子基盤の解明と治療戦略の構築は重要な課題である<sup>1</sup>。

体細胞では、ユビキチン化は重要なタンパク質分解の経路として知られており、胚においてもユビキチン関連遺伝子の発現が卵母細胞の質や胚発生に影響する。

また、受精により卵子から胚に発生が進む過程では、卵子由来のタンパク質は徐々に分解され、胚由来の転写が開始される<sup>2</sup>。しかし、卵子の細胞膜上に存在する膜タンパク質が分解される重要性やその機構については明らかになっていなかった。そのため、我々は卵子や胚のタンパク質の分解機構に着目し、哺乳類であるマウスの初期胚を用いた研究から、卵母細胞膜上の母性因子が、クラスリンを介したエンドサイトーシスによって分解されることが胚発生に不可欠であることを明らかにした<sup>3</sup>。この知見は、エンドサイトーシス活性が哺乳類の初期胚発生過程に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。我々は、エンドサイトーシスを制御する分子として、プロテインキナーゼC (PKC) やユビキチン修飾を触媒するE3リガーゼの関与についても報告

した。しかしながら、卵子および受精卵においてエンドサイトーシスやその分解経路に関連するPKC/E3リガーゼには多くのサブタイプや多様性があり、「胚におけるエンドサイトーシスおよび細胞膜タンパク質の分解はどのように制御され、どの段階で胚発生に関与するのか」未だ十分に解明されていない<sup>4</sup>。

本研究では、マウス卵子および初期胚において、PKCおよびE3リガーゼの網羅的解析から、これらがエンドサイトーシスの制御を介して胚発生に与える分子機構を解明することを目的とした。

## 方法

### 1. 細胞膜タンパク質のエンドサイトーシスに影響を与えるPKCの同定

PKCには11種類のサブタイプがあり、複数のPKC阻害剤 (Sotrastaurin [PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ を阻害]、BIM1 [PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ を阻害]、Go6983 [PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ を阻害]、Go6976 [PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ を阻害]、Ruboxistaurin [PKC  $\beta$ を阻害]) を組み合わせて使用することで、卵子、および胚の中に存在するPKCサブタイプのうち、どれが胚発生において重要なかを明らかにすることを目的とした。いずれもグリシントランスポーターであるGlyT1aに蛍光タグをつけたmRNA (GlyT1a-mCherry/EGFP) を1細胞期にマウス胚の細胞質内に注入し、その胚を試薬を混ぜた培地で培養し、胚発生およびエンドサイトーシスへの影響を調査した。

### 2. 胚におけるE3リガーゼの局在解析

予備実験であるマウス卵のプロテオミクス解析お

よびin-silico surveyから、卵子および受精卵に発現するE3リガーゼを絞り込んだ。

マウス卵を体外受精させ、1細胞期の段階で、各E3リガーゼに蛍光タグをつけたmRNAをピエゾマイクロマニピュレータを用いてマイクロインジェクションし、胚培養を行いながらライブイメージング技術を用いて蛍光強度や蛍光タンパク質の分布パターンを指標として解析した。

### 3. E3リガーゼのノックダウンによる胚発生やエンドサイトーシスへの影響

E3リガーゼのsiRNAを用いたアッセイにより、胚発生や胚におけるエンドサイトーシスを制御するE3リガーゼを同定することを目的とした。

10日齢程度のマウス卵巢から卵胞を分離し、二次卵胞の段階で候補因子 (E3リガーゼ) のsiRNAをマイクロインジェクションした後に体外培養を行った。培養5日目にCollagenase処理を行い莢膜細胞を除去し、体外培養15日目に体外受精を行った (図1)。1細胞期の段階で、エンドサイトーシスマーカーであるGlyT1a-mCherryのmRNAをマイクロインジェクションし、胚培養を行いながらエンドサイトーシス活性への影響を蛍光強度や蛍光タンパク質の分布パターンを指標として解析した。同時に、候補因子をノックダウン (KD) した卵を体外受精させ、1細胞期、2細胞期、4細胞期、8細胞期、桑実胚、胚盤胞の各発生の段階への到達率を評価した。我々の先行研究では、エンドサイトーシスを阻害すると2細胞期で卵割が停止した<sup>3</sup>ことから、4細胞期への到達率をメインのアウトカムに設定した。

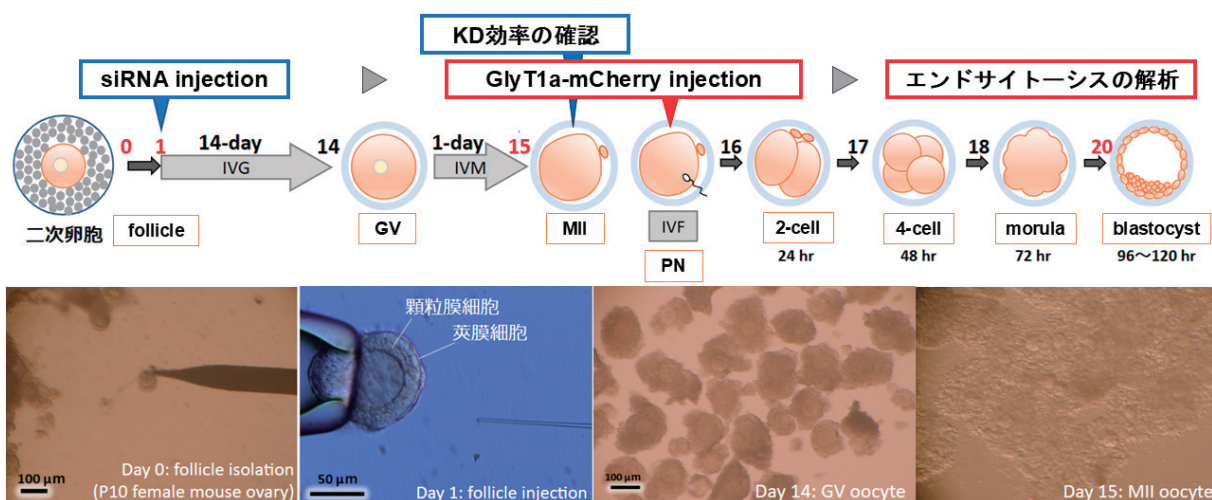


図1 本研究の実験プロット

二次卵胞に候補因子のsiRNAを注入後、体外培養・体外受精を行い、胚発生率、細胞膜タンパク質の動態を解析した

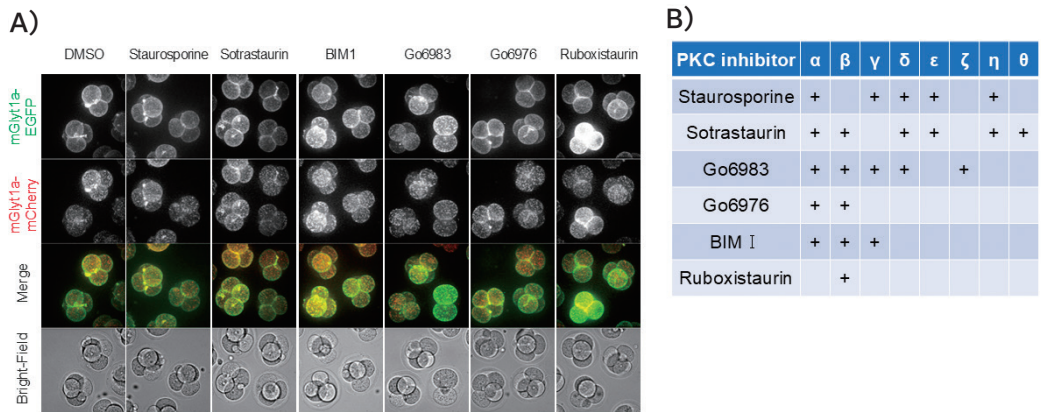


図2 PKC阻害薬処理下における胚発生とエンドサイトーシスの評価  
 A) PKC阻害薬はGlyT1a(mCherry/EGFP) のエンドサイトーシス動態を変化させなかった  
 B) 使用したPKC阻害薬の標的サブタイプ一覧

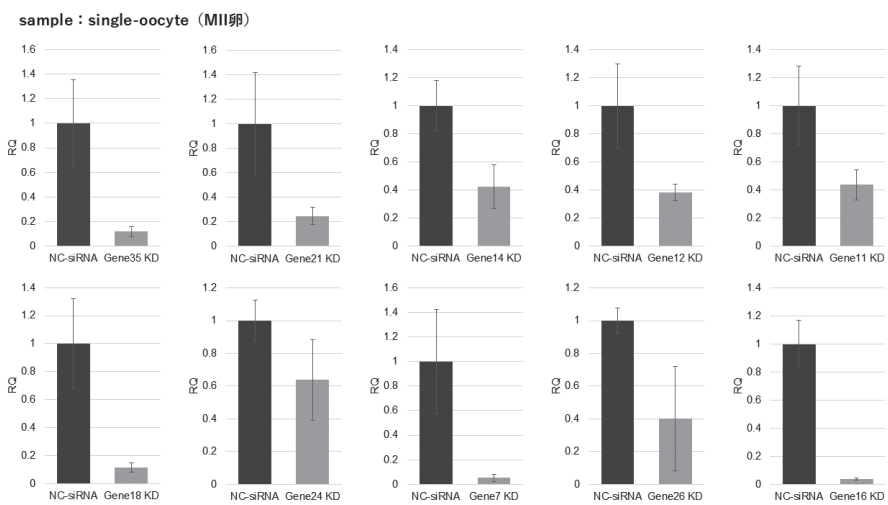


図3 E3リガーゼ群のノックダウン効率  
 MII 卵の段階でノックダウン効率を評価した。遺伝子によって幅はあるものの4~64%程度のノックダウン効率を得られた

## 結果

PKC 阻害薬を用いて、エンドサイトーシスおよび胚発生への影響を調査した。いずれの試薬でも試薬の濃度を上げれば胚発生が停止（胚が死滅）し、濃度を下げれば通常通りに胚発生し、またエンドサイトーシスへの影響も確認されなかった（図2A, B）。培地中に混入するそれぞれの試薬の濃度検討の余地は残っているが、PKCに関しては細胞機能に広く関与している可能性があるため、今後はE3リガーゼに着目して実験を進めていく方針とした。

これまでヒトにおいては、約600種類ほど存在すると考えられているE3リガーゼの多様性が責任因子の同定を阻んできた。共同研究機関において、マウス MII 卵を用いたプロテオミクス解析を行い、マウス卵で発現しているE3リガーゼ遺伝子が49遺伝子まで絞られた。まずこの中でin-silico surveyを行った。マウス遺伝子のノックアウト (KO) 表現型データベースから、KOしても雌の産仔数に影響がなかつ

た13遺伝子を除外した。さらに、論文検索およびUniProtによる細胞内局在情報、AlphaFoldを用いてGlyT1aと候補となるE3リガーゼの複合体構造を予測し、モデル全体の構造の確からしさ (pTM) と両者が接触する界面の確からしさ (ipTM) で評価した。GlyT1a全長およびC末端ではipTM高値 ( $\geq 0.5$ ) を示す因子は認めなかった一方、N末端解析ではGene1、Gene2、Gene3が信頼できる精度でipTM高値を示し相互作用候補として抽出され、残った36遺伝子の中でも優劣をつけた上でターゲットを絞って解析を行うこととした。各E3リガーゼに蛍光タグをつけて胚発生を追ったが、36遺伝子のうち5つの遺伝子は細胞質に均一に局在しており、胚発生中に局在は変化しなかった。

siRNAを注入した二次卵胞から発生した胚の発生率を評価し、36遺伝子のうち4細胞期までの発生に影響が出た10遺伝子 (Gene7,11,12,14,16,18,21,24,26,35と仮称) を見出した (図3A, B)。siRNAによるKD効

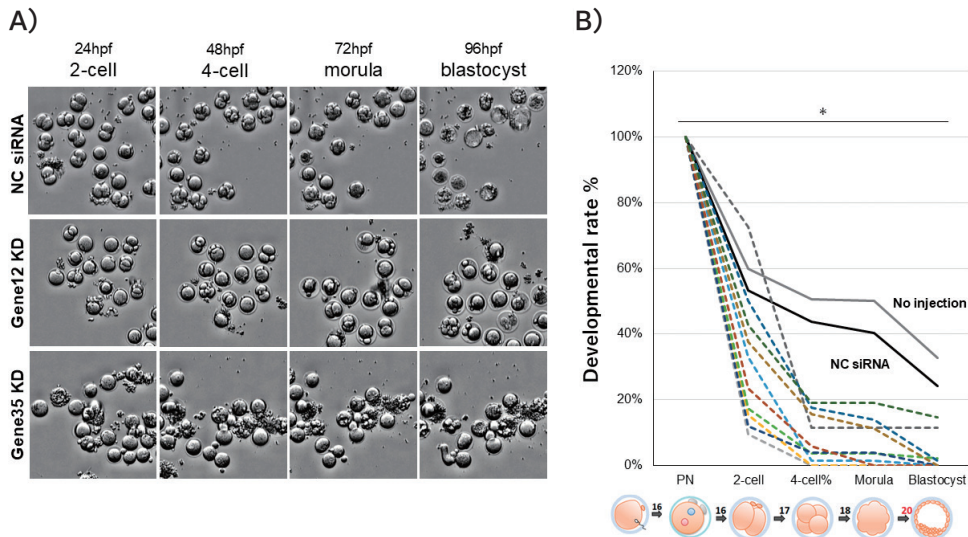


図4 E3リガーゼsiRNAスクリーニングで同定した候補E3リガーゼノックダウンの胚発生への影響

A) 各胚発生のstageごとの代表像 hpf : hours post fertilization  
 B) 4細胞期への到達率はコントロールに比べ有意に低下した

率はsiRNA注入後14日目のM II卵で確認し、遺伝子によって幅はあるものの4~64%程度のノックダウン効率を得られた(図4)。KD後の胚にエンドサイトーシスマーカーを発現させ、ライブイメージングでその過程を追ったが、胚発生自体が進行しないため、エンドサイトーシスへの影響は評価できなかった。

## 考察

本研究では、PKC阻害薬は高濃度では発生停止を引き起こしたが、生理的範囲ではエンドサイトーシスや胚発生に影響しなかった。これは、薬剤の効果が標的PKCの抑制だけでなく、非特異的な細胞障害やPKCの多面的な作用の影響を受けやすいことを示唆している。したがって、薬理的介入のみから責任サブタイプを同定するのは難しい可能性がある。

一方、プロテオミクス解析とin-silico surveyを組み合わせることで、卵子および受精卵に発現し、かつ胚発生への関与が想定されるE3リガーゼ候補を段階的に絞り込むことができた。さらに、GlyT1aとの複合体構造予測では、全長およびC末端では明確な相互作用候補を得られなかった一方、N末端解析では一部候補が高いipTMを示し、候補間の優先順位付けに有用であった。我々の先行研究では、エンドサイトーシスされた細胞膜タンパク質が、Rab5陽性エンドソームからRab7陽性エンドソームへ移行していくことが観察されており、エンドソームの成熟が発生段階依存的に制御され得る<sup>3</sup>。したがって、本研究で同定された候補E3リガーゼ群は、単なるエンド

サイトーシスの開始ではなく、その後の選別、輸送、分解を含む一連の細胞膜タンパク質の動態に参与している可能性がある。

本研究では、候補E3リガーゼを10種類まで絞り込むことができた点が大きな成果である。一方で、各候補遺伝子がどの発生段階で、実際にエンドサイトーシスに影響するのか、エンドサイトーシスのどの過程に作用しているのかは明らかとなっていない。今後は、各候補遺伝子について形態学的表現型を詳細に比較するとともに、siRNA-resistant mutantを用いたレスキュー実験によりオフターゲット効果を除外し、責任遺伝子としての妥当性を検証する必要がある。初期胚発生異常は染色体異数性以外の要因も複合し得るため、エンドサイトーシス活性という観点から胚発生の分子基盤を提示できれば、生殖補助医療における胚選別や培養条件の最適化に新たな指標を提供し得る可能性がある。

## 引用文献

1. Romualdi D, Ata B, Bhattacharya S, et al. Evidence-based guideline: unexplained infertility†. *Hum Reprod.* 2023;38(10):1881-1890.
2. Vastenhouw NL, Cao WX, Lipshitz HD. The maternal-to-zygotic transition revisited. *Development.* 2019;146(11):dev161471.
3. Morita A, Satouh Y, Kosako H, et al. Clathrin-mediated endocytosis is essential for the selective degradation of maternal membrane proteins and preimplantation development. *Development.* 2021;148(14):dev199461.

4. Morita A, Satouh Y, Sato K, et al. Significance of the association between early embryonic development and endocytosis. *Med Mol Morphol.* 2022;55(3):167-173.

### **Abstract**

Age-related oocyte aneuploidy is a major clinical problem; however, a substantial proportion of recurrent pregnancy loss and infertility remains unexplained by chromosomal abnormalities. We aimed to comprehensively identify regulators of clathrin-mediated endocytosis, which is essential for the selective degradation of maternal plasma membrane proteins during maternal-to-zygotic transition, focusing on PKC and E3 ubiquitin ligases. mRNA encoding fluorescently tagged GlyT1a, a glycine transporter previously established as an endocytic marker, was microinjected into mouse 1-cell embryos, and embryogenesis and endocytosis were assessed under multiple PKC inhibitors. PKC inhibitors induced developmental arrest only at high concentrations, whereas no consistent effects on endocytosis or embryogenesis were observed within physiological ranges, limiting the identification of PKC subtypes by pharmacology alone. We next focused on E3 ligases. Proteomic analysis of mouse MII oocytes narrowed the candidates to 49 genes, which were further prioritized and refined by integrating knockout phenotype databases, literature review, subcellular localization data, and AlphaFold-based structural prediction. Whereas no clear candidates emerged from analyses using full-length GlyT1a or its C-terminus, several candidates showed high interface confidence in the N-terminal analysis. Subsequent siRNA knockdown screening of 36 genes identified 10 candidates associated with reduced progression to the 4-cell stage. Although the precise stage of action could not be determined from the present study, these findings implicate E3 ligase-related pathways, including endocytosis-associated processes, in the regulation of early embryogenesis. Further phenotypic characterization and rescue experiments may help elucidate the molecular basis of unexplained infertility and improve embryo assessment in assisted reproductive technology.