

研究題目 初期胚発生における生体膜成分再編成機構の解析

研究組織

研究代表者：佐藤健（群馬大学生体調節研究所）

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：佐藤裕公（群馬大学生体調節研究所）

佐藤美由紀（群馬大学生体調節研究所）

佐々木妙子（群馬大学生体調節研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

受精卵では親由来の細胞質成分は巧妙に取捨選択され、細胞は新たな生命を構築するために大きく性質を変化させる。代表者らは線虫の胚発生においては、エンドサイトーシスやオートファジーが活性化し、不要な生体膜成分が分解され、細胞内の再構成が起こることを見つけてきた。本研究では、生体から得られる量が微量でプロテオミクス解析が困難とされるマウス卵子を用いて哺乳類受精卵の高感度プロテオミクスによる比較解析基盤を構築するとともに、線虫と同様の分解系の活性化が起きるのかの検証と基質の探索を行う。また、線虫においてはこの分解系を制御する新規因子の探索を行い、時期特異的かつ基質特異的分解の分子機構の解明を試みる。

[1-2]研究の方法・経過

1) マウス卵子を用いたプロテオミクス解析基盤の構築

マウス卵子は、性ホルモン等を用いた過剰排卵条件下においても ~ 30 個/成熟個体程度の細胞数しか得ることができない希少な生体材料であり、また卵を囲む数種類の蛋白質のみからなる巨大細胞外基質の透明帯がプロテオミク

ス解析における検出の感度や細胞蛋白質量の算定などを妨げる懸念がある。また、プロテオミクス解析の解釈にあたり、卵子内のオルガネラの状態（量や活性など）といった細胞質への理解も必要であった。

われわれは、細胞表面の蛋白質の組成の変化を避ける目的で非酵素的に透明帯を除去するアプローチを選択し、ここまで主に野生型の未受精卵について細胞全体の可溶化物またはbiotin 化卵子表面蛋白質と streptavidin/Tamavidin 精製によるプロテオミクス解析を行い、代表的な表在蛋白質を基準としそれぞれの手法による検出感度等を得ることができた。一方、卵子内のオルガネラ状態についてもイメージングを用いた解析からミトコンドリア・小胞体・脂肪滴の存在比率が高いことを見出した。

現在、上記の結果から最低限必要な卵子の個数について検討を終えたほか、TMT (Tandem Mass Tag) 解析によってさらに検出感度の高い比較解析を実施することを基本方針と決め、野生型マウス及び卵子の性質に変調をきたす遺伝子変異マウスの卵子などについてプロテオミクス解析用試料の収集を進めている。

2) 線虫の初期発生における細胞内リモデリングに関連する因子の探索

線虫においては受精後に精子由来のオルガネラがオートファジーによって分解され、その選択的に新規オートファジーアダプター ALLO-1 と TBK1 ファミリーキナーゼ IKKE-1 が関与する。ALLO-1 の局在化機構を理解するため、受精卵から GFP-ALLO-1 を GFP-Trap により回収し、結合するタンパク質を質量分析により同定した。これら因子について、さらに RNAi による二次スクリーニングを行っている。

また、われわれは TMT 解析により *ikke-1* 変異体でリン酸化レベルの低下する因子 X を同定していた。因子 X には TMT 解析で同定した部位以外にも複数のリン酸化サイトが存在することが示唆されたので、すべてのリン酸化部位の同定を目的に、受精卵から GFP 標識した因子 X を免疫沈降し質量分析を行った。その結果、新たに3カ所のリン酸化サイトを同定した。しかし同時に、さらに複数のリン酸化サイトの存在も示唆されたことから、リン酸化部位の検出効率を上げるため、変性条件下で脱リン酸化を防ぎながら免疫沈降を行うなどの条件検討を行っている。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

本研究ではこれまで困難とされていたマウス卵子を用いたプロテオミクス解析の実験系の構築を行い、TMT 解析などが実施可能であることを確認した。また、線虫においては IKKE-1 のリン酸化基質の候補 X について、さらにリン酸化サイトの同定に成功した。また、ALLO-1 結合因子の候補をプロテオミクスにより同定した。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本共同研究により、マウスや線虫の研究者とプロテオミクスの専門家が共同研究を行うことで、受精卵という特殊な材料を用いたプロテオミクス解析系が構築できた。プロテオミクスにより新規分子の同定も進行しつつあり、今後はイメージングや遺伝学といった *in vivo* 解析を組み合わせることで研究の進展が期待でき

る。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし。

[3-2]学会発表

1) 佐藤美由紀, 佐藤健, 小迫英尊. 線虫遺伝学×プロテオミクスのコラボ: 父性オルガネラオートファジー制御機構の解明を目指して. 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会, 神戸国際会議場, 6月25日, 2019年.

2) 佐々木妙子, 佐藤健, 佐藤美由紀. オートファジーレセプター ALLO-1 による父性ミトコンドリアの選択的分解制御機構. 第12回オートファジー研究会 若手の会, つま恋リゾート彩の郷, 10月24日, 2019年.

3) 佐藤裕公. マウス卵におけるオルガネラ動態のイメージング解析 第12回オートファジー研究会 つま恋リゾート彩の郷, 10月26日, 2019年.

4) 佐々木妙子, 佐藤健, 佐藤美由紀. The mechanism of specific elimination of paternal mitochondria via autophagy receptor ALLO-1. 第42回日本分子生物学会, 福岡国際会議場, 12月4日, 2019年.

[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

(マウス (提案))

遺伝子改変マウスからの採卵はどうしても動物の繁殖を待つ必要があり、律速段階となる側面がある。現在、比較プロテオミクス解析に必要な遺伝子改変マウスを可能な最大規模で繁殖を行っており、必要の半数以上を採集し終えている。

線虫についてはリン酸化部位の同定や二次スクリーニングを進め、ALL0-1 や IKKE-1 の作用機構を明らかにする。