

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。また、近年ではこれらと同様の現象がマウス胚中でも起こっていることを見出している。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、マウスと線虫の受精卵における分解系の活性化について蛋白質レベルで検証し、さらに分解される基質の探索を行う。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 TMT 比較プロテオミクス解析

前年までの検討では、過剰排卵条件下でも 30 個/個体 程度の細胞数しか得られない希少生体材料であるマウス卵子を用いて効率的なプロテオミクス解析の基盤構築を進め、約 1700 種の卵構成タンパク質の同定に成功してきた。これを踏まえ、今年度はバッチ数の多い Tandem Mass Tag (TMT) 法を選択し、大量の卵子を解析することによって全体の蛋白質同定率を上げる試みを行っている。

本研究と関連して、受精後の卵子で起こる膜

動態について様々な可視化実験を進めた結果、受精の前後には細胞膜表面だけでなくエンドサイトーシスに関連した細胞内部の 2 重膜構造においても非常に動的な変化がみられることを見出すと同時に、これらが起こるタイミングについて明らかにすることができた (Development, under revision).

そこで、野生型マウス卵子については上記の知見を反映させた受精後経過時間を経たものと未受精卵とで、さらに卵子の性質に変調をきたす遺伝子変異マウスの卵子については未受精卵のままそれぞれ 350 個程度ずつ調製し、小迫教授に TMT 技術を用いた比較プロテオミクス解析を依頼している。

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。IKKE-1 によるリン酸化の意義を明らかにするため、線虫受精卵を用いた TMT 解析により *ikke-1* 変異体でリン酸化レベルの低下するペプチドを探索し、IKKE-1 によるリン酸化を受ける候補因子を同定した。この因子のノックダウンや欠損株では父性オルガネラの分解が阻害されることを確認した。また *ikke-1* 変異体では候補因子の基質近傍への局在化が部分的に低下していたことから、基質への局在化にリン酸化が関与する可能性がある。しかし、TMT 解析で同定した 1 か所のリン酸化部位のアラニン置換変異体では機能的な異常が認められなかった。一方で、この候補因子にはこの部位以

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、複数のリン酸化部位が機能制御に関与する可能性が考えられた。そこで、この因子を免疫沈降し質量分析を行った結果、3か所のリン酸化部位を同定した。現在、これらリン酸化部位と機能との関連を検証するとともに、サンプル調整時の脱リン酸化を防ぐことですべてのリン酸化部位が同定できないか試みている。

【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について、酵素処理を経ないより自然な組成を持つ状態で、約1700種の構成タンパク質の同定に成功した。また、細胞内外の膜蛋白質組成が劇的に変動することが予想されるタイミングを中心にTMT解析を実施した。さらに、線虫においてはIKKE-1のリン酸化基質の候補因子の同定に成功した。

[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

1) Structural insights into tetraspanin CD9 function.

Umeda R, Satouh Y, Takemoto M, Nakada-Nakura Y, Liu K, Yokoyama T, Shirouzu M, Iwata S, Nomura N, Sato K, Ikawa M, Nishizawa T, Nureki O.

Nat Commun. 2020 Mar 30;11(1):1606.

2) ERdj8 governs the size of autophagosomes during the formation process.

Yamamoto YH, Kasai A, Omori H, Takino T, Sugihara M, Umamoto T, Hamasaki M, Hatta T, Natsume T, Morimoto RI, Arai R, Waguri S, Sato M, Sato K, Bar-Nun S, Yoshimori T, Noda T, Nagata K.

J Cell Biol. 2020 Aug 3;219(8):e201903127.

[3-2]学会発表

1) Taeko Sasaki, Yasuharu Kushida, Ken Sato, Miyuki Sato. The mechanism underlying selective elimination of paternal mitochondria in *C. elegans*. 第72回日本細胞生物学会年会. Web開催, 6月, 2020年.

2) Miyuki Sato. Selective autophagy of paternal mitochondria via the autophagy receptor ALLO-1 and TBK1-related kinase IKKE-1. 第20回日本蛋白質科学会年会. Web開催, 7月, 2020年.

3) 佐藤健, 佐藤美由紀, 佐藤裕公, 森田晶人. 初期胚発生におけるリソソーム分解系を介した細胞膜成分リモデリング機構, 第93回日本生化学会大会 シンポジウム マクロを越えて~攻めるオートファジー~, Zoom, 9月14日, 2020年.

4) 森田晶人, 佐藤裕公, 佐藤健. グリシントランスポーターである Glyt1a は胚発生に伴い Rab5/Rab7 陽性エンドソームを介してエンドサイトーシスされ分解される, 第38回日本受精着床学会総会・学術講演会, Web上にてオンデマンド配信, 10月1~23日, 2020年.

5) 佐藤裕公. 受精関連因子 CD9 の立体構造について, 第7回生殖若手の会, Zoom, 10月9日, 2020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

マウス卵子に関するプロテオミクス解析は、特に卵子に異常を持つ遺伝子組換え動物を用いた場合に著しい採材の困難があり、律速段階となる側面があった。しかしながら、本研究で用いたTMT参照区画のバッチに大量の卵子を投入する手法でこの課題をクリアすることができれば、多くの生殖細胞研究者にとってブレイクスルーになると期待できる。今回の解析で同定された卵子構成蛋白質の中でも特に注目される変化を持つ蛋白質に関する機能解析は、イメージング解析や生化学的解析によって推進する予定である。