

研究題目 受精・初期発生を制御する新規分子の探索と解析

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）
前島郁子（群馬大学生体調節研究所）
杉浦健太（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

線虫 *C. elegans* の受精、初期発生を制御する分子メカニズムを解明するために、これらの野生株、不妊変異株、ユビキチン化欠損株等から卵母細胞及び精子を単離し、新規制御因子を探索する。また、これらの機能解析を行う。

[1-2] 研究の方法・経過

受精は有性生物にとって発生の出発点である。しかしながら、この現象の最初のステップである卵母細胞と精子の細胞膜融合の分子メカニズムについては依然として不明である。

そこで、本研究課題では、線虫 *C. elegans* を用いて受精時に働く細胞膜融合制御因子の単離を試みている。今年度は、リソソーム酸性化に働く V-ATPase のサブユニットを欠損する卵と野生株卵を採取し、TMT (tandem mass tag) 標識による大規模比較定量プロテオーム解析を行い、受精後にリソソームで分解される母性膜タンパク質の同定を試みた。その結果、7103 種の母性タンパク質の同定に成功した。

一方、線虫 *C. elegans* の精子ミトコンドリアが受精後に選択的にオートファジーにより分解される現象 (Allophagy) に着目し、この経路で働く IKKE-1 キナーゼのリン酸化基質の探索を行った。その結果、候補基質の 1 つとして、オートファジー起動複合体の構成因子である FIP200 の線虫ホモログ EPG-7 を同定した。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

野生株卵と V-ATPase 欠損卵の間の比較定量プロテオーム解析により、受精後に選択的に分解される母性膜タンパク質群が明らかとなった。この中には卵母細胞で特異的に働く因子や受精に関連する既知の因子が多数含まれており、この解析が受精に必要な母性因子を効率的に濃縮するのにきわめて有効であることが判明した。また、申請者らが同定した早期多精子受精拒否に関連するユビキチンリガーゼ MARC-3 も V-ATPase 欠損卵においてタンパク量の顕著な増加が見られたことから、この因子も受精後に選択的に分解されることが明らかとなった。

一方、精子ミトコンドリアの分解においては、IKKE-1 の基質の 1 つとして EPG-7 を同定することに成功した。EPG-7 上で IKKE-1 依存的にリン酸化される部位を複数同定することに成功したが、予想に反し、これらすべてに変異を導入しても依然として Allophagy は起こることが判明した。このことから、IKKE-1 による EPG-7 のその他の部位、もしくはその他の因子に対するリン酸化も Allophagy に重要である可能性が示唆された。これらの研究成果を含め、Allophagy adaptor である ALLO-1 と IKKE-1 が父性ミトコンドリア上にオートファジー起動複合体因子である EPG-7 や実行因子である

LGG-1等を引き込むpositive feedbackにより、Allophagyを惹起しているという結論に達した。[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、精子と卵母細胞間の膜融合や多精拒否に関連する候補因子を多数同定することに成功した。これらの候補因子の解析を通じて、いまだ不明な点が多く残されている受精や多精拒否の分子メカニズムが明らかとなる可能性がある。また、精子ミトコンドリアが受精後に分解される現象は哺乳類等の他生物でも観察されており、本研究成果は種を越えてミトコンドリアDNAの母性遺伝の謎を解き明かす糸口になると期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

1. ALLO-1- and IKKE-1-dependent positive feedback mechanism promotes the initiation of paternal mitochondrial autophagy. Sasaki T, Kushida Y, Norizuki T, Kosako H, Sato K*, Sato M*. *Nat Commun.* 2024 Feb 17;15(1):1460. doi: 10.1038/s41467-024-45863-2.
2. MARC-3, a membrane-associated ubiquitin ligase, is required for fast polyspermy block in *Caenorhabditis elegans*. Kawasaki I, Sugiura K, Sasaki T, Matsuda N, Sato M*, Sato K*. *Nat Commun.* 2024 Jan 26;15(1):792. doi: 10.1038/s41467-024-44928-6.
3. RAB35 is required for murine hippocampal development and functions by regulating neuronal cell distribution. Maejima I, Hara T, Tsukamoto S, Koizumi H, Kawauchi T, Akuzawa T, Hirai R, Kobayashi H, Isobe I, Emoto K, Kosako H, Sato K. *Commun Biol.* 2023 Apr 21;6(1):440. doi: 10.1038/s42003-023-04826-x.

[3-2]学会発表

1. 佐藤健、川崎一郎、杉浦健太、佐々木妙子、佐藤美由紀、動物の初期胚発生に向けたリソソーム分解系による細胞内膜系リモデリング機構。第75回日本細胞生物学会年会。奈良県コンベンションセンター。6月2023年。

2. 須藤俊一、寺岡滉一、川崎一郎、佐藤美由紀、佐藤健。卵母細胞-胚遷移において後期エンドソーム/リソソーム活性を制御する新規因子 GREN-1 の解析。第75回日本細胞生物学会年会。奈良県コンベンションセンター。6月2023年。
3. 法月拓也、佐々木妙子、櫛田康晴、野田展生、佐藤健、佐藤美由紀。線虫受精卵における ALLO-1 の父性オルガネラ局在化機構の解析。第75回日本細胞生物学会年会。奈良県コンベンションセンター。6月2023年。

4. Taeko Sasaki, Yasuharu Kushida, Hidetaka Kosako, Ken Sato, Miyuki Sato Regulation of paternal mitochondria autophagy via ALLO-1 and IKKE-1 in *Caenorhabditis elegans*. 生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム、東京医科歯科大学、2023年10月

5. Takuya Norizuki, Taeko Sasaki, Yasuharu Kushida, Nobuo N. Noda, Ken Sato, and Miyuki Sato. Analyses of mechanisms of ALLO-1 targeting to the paternal organelles in embryos. 24th International C. elegans Conference. Glasgow Convention Bureau. 6月2023年

6. Ikuko Maejima, Taichi Hara, Satoshi Tsukamoto, Hiroyuki Koizumi, Takeshi Kawauchi, Tomoko Akuzawa, Rika Hirai, Hisae Kobayashi, Inoya Isobe, Kazuo Emoto, Hidetaka Kosako, Ken Sato. The role of RAB35 in murine hippocampal morphology and function. 第46回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月, 2023年。 他

[3-3]成果資料等
なし

【4】今後の課題等

今後、V-ATPase 欠損卵において増加している膜タンパク質について、順次、RNAiによる遺伝子ノックダウン、遺伝子破壊株の作製及び解析を進め、受精関連候補因子の絞り込みを進める予定である。また、MARC-3のコビキチン化基質がいまだ不明であるので、今後、MARC-3と相互作用する因子を免疫沈降法等により分離し、質量分析により同定していきたいと考えている。