

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依然として不明である。また生殖細胞形成の分子メカニズムも依然として謎が多い。昨年度は、生殖細胞特異的に働き、受精後に分解される母性膜タンパク質を探索するために、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、小迫教授との共同研究により質量分析計を用いたプロテオミクス解析を実施した。その結果、全部で 7103 種類のタンパク質の定量解析を行い、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に成功した。今年度は、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、遺伝子破壊株を作製し、表現型解析を進めた。その結果、生殖細胞の形態形成に関

与すると思われる新規因子 ROOM-1 を発見した。そこで、この因子と相互作用する因子を同定するために、生殖腺において GFP 融合タンパク質を発現する遺伝子組換え線虫を作製した。続いて、その抽出液に対してケミカルクロスリンクを実施し、GFP-Trap 法による免疫沈降後、質量分析を行った。その結果、3116 種の候補関連因子の同定に成功した。現在、これらのうち、生殖腺に発現する上位候補について遺伝子ノックダウンによる機能解析、局在性について解析を進めている。一方、申請者らは、線虫の卵母細胞が精子と受精する際に、2つ目の精子が受精しないようにする早期多精拒否の現象を発見し、この過程に働く因子として RING-CH ドメインを持つ膜結合型ユビキチンリガーゼ MARC-3 を同定している（文献 1）。そこで、GFP-MARC-3 を発現する遺伝子組換え線虫から抽出液を調製し、ケミカルクロスリンク後に GFP-Trap 法による免疫沈降を行った。その後、沈降物を酵素消化後、質量分析により MARC-3 と相互作用する 2930 種の候補因子を同定した。現在、上位の母性膜タンパク質について RNAi を実施し、*marc-3* 欠損株の多精の表現型に対する効果を解析している。その結果、RNAi による発現抑制により *marc-3* 欠損株の多精の表現型を抑制できる候補因子の同定に成功している。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

C. elegans の生殖細胞は合胞体という多核細胞から形成され細胞質を共有しながら形成される。しかしながら、どのようにして合胞体から生殖細胞がただ1つの核を含んだ状態で出芽し、分裂せずに維持されているのかについてはほとんどわかっていない。小迫教授との共同研究によるプロテオミクス解析により、この過程に関与すると思われる複数の新規因子の同定に成功し、またその相互作用因子を探索することにより、その分子メカニズムの一端が明らかとなりつつある。一方、早期多精拒否に関与する MARC-3 と相互作用する因子を探索することにより、多精拒否もしくは受精そのものに関与しうる候補因子の同定に成功した。現在、解析を進めているが、*marc-3* 欠損株の多精の表現型を抑制できる候補因子については、精子を誘引する仕組みや精子膜と卵膜融合に関連する因子である可能性がある。

[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、まず *C. elegans* における生殖細胞形成に関連する候補因子の同定に成功した。生殖細胞は様々な種において合胞体から形成されることが知られており、本研究成果は多生物における生殖細胞形成メカニズムの理解にもつながるものと期待される。一方、MARC-3 は哺乳類にも保存されており、この相互作用因子の同定及び機能解析は、哺乳類における早期多精拒否機構の解明にもつながると思われる。本共同研究により、受精前後において働く膜タンパク質が同定されたことにより、生殖細胞がどのようにして生まれ、そして子孫へと引き継がれていくのか、その全容解明に一歩前進できたと思われる。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

なし

[3-2] 学会発表

1) 佐藤健、川崎一郎、杉浦健太、佐々木妙子、須藤俊一、松田憲之、小迫英尊、佐藤美由紀. 卵—胚性遷移における卵細胞リモデリング機構とその生理機能. 第97回日本生化学会大会 シンポジウム 横浜 11月、2024年

2) 杉浦 健太、小迫 英尊、佐藤 健.

線虫 *C. elegans* における生殖腺のハニカム構造を支える膜タンパク質の機能と進化的背景の解析. 第47回日本分子生物学会年会 福岡. 11月、2024年

3) Shun-ichi Suto, Koh-ichi Teraoka, Ichiro Kawasaki, Kenta Sugiura, Taeko Sasaki, Ikuko Maejima, Hidetaka Kosako, Miyuki Sato, Ken Sato. Analysis of GREN-1, a novel factor that regulates the endocytic activity during the oocyte-to-embryo transition in *C. elegans*. Cell Bio, San Diego, 12月、2024年. 他

[3-3] 成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後、ROOM-1、MARC-3 と相互作用する候補因子について、順次、RNAi による遺伝子ノックダウン、遺伝子破壊株の作製、解析及び発現組織、細胞内局在性の解析を進め、生殖細胞形成および多精拒否、受精関連候補因子の絞り込みを進める予定である。