

平成 30 年 5 月 20 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07083

研究課題名(和文) 卵細胞膜マイクロドメインUPIII-*Src*システムの形成と生理機能研究課題名(英文) Genetic and single-cell approaches to evaluate roles played by UPIII-*Src* system in frog oocyte maturation and egg fertilization

研究代表者

佐藤 賢一 (SATO, Ken-ichi)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：30235337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アフリカツメガエル卵UPIIIの受精における機能を明らかにするために、同遺伝子ノックアウト二倍体ツメガエル作成をゲノム編集法により試みた。ホモノックアウト個体の生育が著しく不安定であり成功に至っていない。今後はヘテロノックアウト雌個体からの卵巣摘出、特異抗体を用いた単一細胞生物学的手法によるUPIII発現と当該卵細胞の膜特異的な受精シグナル再構成機能の検証を行い、引き続きホモノックアウトF1個体の作成にも挑戦する。一方で、ホルモン依存的な排卵システムを試験管内再構築し、MAPキナーゼ活性化が重要であることを示唆する結果を得た。UPIIIなどの膜タンパク質の関与に焦点を当てた実験に着手している。

研究成果の概要(英文)：We tried to prepare a uroplakin III (UPIII)-null oocyte and egg with the use of *Xenopus tropicalis* as a model animal, and of genome editing technologies such as TALENs and CRISPR/Cas9. At present, however, because of the highly unstable viability in UPIII-homozygously negative larva, we have not yet succeeded in obtaining females with homologous disruption in the UPIII gene loci. Therefore, we are still in the process of preparing a homozygous UPIII-null female. Under this condition, a single-cell biology approach toward oocytes and eggs that can be obtained from heterozygous UPIII-null females, such as indirect immunofluorescent experiments with the use of anti-UPIII antibody, and in vitro reconstitution of sperm-induced membrane-associated signaling events (e.g. tyrosine phosphorylation of *Src*) are under investigation.

研究分野：発生生物学

 キーワード：受精 卵成熟 シグナル伝達 チロシンリン酸化 細胞膜マイクロドメイン ウロプラキンIII ゲノム
 編集 Src

1. 研究開始当初の背景

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵細胞の受精機構を明らかにする目的で「卵の細胞膜マイクロドメイン (以下、MD) に局在性を示す単一膜貫通型分子ウロプラキン III (以下、UPIII) と非受容体 / 細胞膜結合型チロシンキナーゼ Src が介在するシグナル伝達システム (UPIII-Src システム) が配偶子間相互作用と卵活性化に重要な働きを担う」という仮説の実験的検証をおこなった。その結果 2014 年までに、精子プロテアーゼによる UPIII の部分的分解と Src 活性化が MD 上で起こることが、卵と精子双方に対する受精成立機構として機能していることを示唆する結果を得た。またこの UPIII-Src システムがもつと想定する受精成立機構は、卵成熟の過程で獲得される「卵母細胞の細胞膜レベルでの成熟機構」であることも示唆された。

2. 研究の目的

つぎの 3 つの仮説を検証する。

- ・ UPIII は受精成立に必須の分子である。
- ・ UPIII 部分分解物は精子を活性化する。
- ・ UPIII-Src システムは卵成熟に伴い機能獲得し、卵アポトーシスに伴い機能を失う。

これらの仮説検証にあたっては、UPIII および Src を標的とする実験の他に、卵形成・成熟・受精およびアポトーシスに関係する幾つかの分子や現象 (ホルモン依存的な排卵、減数分裂の停止および停止からの離脱、MAP キナーゼやカスパーゼの活性化と不活性化、ラットモノクローナル抗体標的タンパク質や FAK キナーゼなどの卵細胞膜局在性の新規因子など) を対象とする実験もおこなう。

3. 研究の方法

2015 年度

アフリカツメガエルの未成熟卵母細胞および成熟卵母細胞 (未受精卵) を主な実験材料として、次の 5 つのテーマに取り組んだ。(1) プロゲステロン依存性の卵成熟反応過程における卵表層形態の経時変化と細胞内マップキナーゼ (MAPK) のリン酸化状態の関係性の解析 (MAPK 阻害剤 U0126 を用いた解析を含む)、(2) プロゲステロンにより卵成熟反応を完了した成熟卵母細胞の長期培養 (~96 時間) による卵表層形態、MAPK リン酸化状態、およびアポトーシス実行性カスパーゼのプロテアーゼ活性の経時変化、(3) 未成熟卵母細胞および成熟卵母細胞における Focal Adhesion Kinase (FAK) の特異抗体を用いた同定、細胞内分布、タンパク質発現量およびリン酸化状態の解析、(4) 成熟卵母細胞の低密度非イオン性界面活性剤 (Triton X-100) 不溶性膜成分 (膜マイクロドメイン) を抗原として作成したラットモノクローナル抗体 (3 種類) の標的タンパク質の探索 (免疫沈降法、間接蛍光抗体法など) と分子同定 (マススペクトロメトリによる質量分析とデータベース検索、ならびに抗ペプチド抗体を用いたタ

ーゲット候補タンパク質の再同定など)、(5) 学外研究者との協働による、膜マイクロドメイン局在タンパク質ウロプラキン 3 あるいはウロプラキン 1b をノックアウト (ゲノム編集技術による) した 2 倍体アフリカツメガエル (ネッタイツメガエル) の作成。

2016~2017 年度

前年度に引き続き、アフリカツメガエル卵母細胞をモデル実験系に、卵成熟、受精、および初期発生における細胞膜マイクロドメイン局在性タンパク質シグナル伝達複合体 (ウロプラキン 3A-SRC システム) の形成と生理機能を明らかにするための実験をおこなった。継続的に進めているウロプラキン 3A をゲノム編集によりノックアウトしたネッタイツメガエルの作成に加え、新たに卵成熟反応完了後の卵母細胞 (未受精卵 / 第二減数分裂中期で細胞周期を停止している) が 12 時間以上未受精のまま放置された場合に起こすアポトーシスに焦点をあて、(1) 卵表層の形態 (顕微鏡観察下での動物極と植物極の細胞学的特徴)、(2) 卵細胞内 MAP キナーゼのリン酸化 (リン酸化特異抗体による検証)、(3) カスパーゼ 3 / 7 活性、の 3 点を指標としたアポトーシスの段階的進行を評価し、細胞膜マイクロドメイン機能のアポトーシス実行卵における維持と破綻を解析した。また、ウロプラキン 3A-SRC システムと連携するシグナル伝達機能分子としてヒト膀胱がん細胞株 5637 で同定されている FAK チロシンキナーゼの卵母細胞における発現と卵成熟への関与の有無の評価、濾胞細胞内にある未成熟卵母細胞がホルモン依存的に卵成熟ならびに濾胞細胞からの離脱を実行するしくみを試験管内で検証するシステム構築の試行も合わせて新たに取り組んだ。

4. 研究成果

2015 年度

本研究は、UPIIIをはじめとする卵細胞膜マイクロドメインタンパク質の生理機能を卵形成・卵成熟・受精および初期発生の範囲で包括的に明らかにすることを目的としている。「研究の方法：2015 年度」にてあげた(1)~(5)のテーマは、それぞれに直接 (ラット抗体のターゲット探索、UPIII のノックアウト) あるいは間接 (卵母細胞の表層変化と MAPK、卵形成・卵成熟と FAK) に本研究の進捗に資するものである。それぞれが上記の通り順調な進捗を示していることを受けて「おおむね順調に進展している。」と判断した。具体的な内容は次の通りである。

(1) 卵成熟反応の細胞学的指標である「動物極におけるホワートスポットの出現」に先立って観察することのできる卵表層変化 (ブレ・ホワートスポットと名付けた) を新たに同定した。その出現および以降のホワートスポットと同様に MAPK 阻害剤 U0126 に対して感受性をもつことを見出した。(2) 卵成熟反

応完了時に MAPK 阻害剤 U0126 処理を受けた卵母細胞において、同末処理卵母細胞の長期培養時に見られる表層の形態変化とカスパーゼ活性化のタイミングが早まることを見出した。(3)ヒト細胞 FAK に対する特異抗体を用いて卵母細胞 FAK の同定に成功した。卵母細胞 FAK は卵母細胞ステージ I の時点から発現しており、卵成熟反応初期にリン酸化を受けていることが示唆された。(4)免疫沈降法および質量分析法により、ラット抗体 3 種それぞれのターゲット分子を同定した。また同定分子のアミノ酸配列に基づいて作成したウサギ抗ペプチド抗体により 1 種のターゲットを再同定した。(5)TALEN 法および CRISPR/Cas9 法を用いたゲノム編集により UPIII ノックアウトガエルを作成し、採卵可能な成体の生育に成功した。

2016年度

以下の事由により「やや遅れている」と判断した。(1)UPIIIノックアウトネットイツメガエルの作成：実験に十分な卵母細胞を調整することができていない。(2)アポトーシス卵における細胞膜マイクロドメインの機能変化の検証：アポトーシス実行卵のサンプリング条件は定まったものの、実験に十分な量のサンプルを調製することができていない。(3)FAKチロシンキナーゼの生理機能の解析：卵母細胞内FAKの同定には成功しているが、その酵素活性やリン酸化状態を検証するための適切な実験ツール（リン酸化特異抗体、特異的阻害剤など）が未確定である。(4)未成熟卵母細胞がホルモン依存的に濾胞細胞層からの離脱/卵成熟を実行する流れの試験管内再構成：ホルモン依存的な濾胞細胞層からの離脱と卵成熟を試験管内再構成できる見通しは立てることができたが、この2つの反応のどちらが先行するのかを明らかにできていない。またMAPキナーゼ活性化との関係についても不明である。

以上のことから、次の通り総括し次年度以降の研究に臨むことにした。(1)UPIIIノックアウトネットイツメガエルの作成：ゲノム編集カエルの安定作成/供給のため生殖細胞特異的なゲノム編集を引続き条件設定する。(2)アポトーシス卵における細胞膜マイクロドメインの機能変化の検証：未成熟卵母細胞と成熟卵母細胞（プロゲステロン処理12時間後）を対象サンプルとして設定し、プロゲステロン処理後24時間、36時間、48時間、および72時間の卵母細胞サンプルを大量調製し、それぞれから細胞膜マイクロドメインを入手する。タンパク質染色法や試験管内受精シグナル伝達解析法などによりUPIII-SRCシステムの発現レベルやシグナル伝達機能などを検証する。(3)FAKチロシンキナーゼの生理機能の解析：卵母細胞内FAKに対するリン酸化特異抗体と特異的阻害剤として適切なものを確定し、卵成熟、受精、アポトーシスに対するFAKの関与を検証する。(4)未成熟卵母細胞がホルモン

依存的に濾胞細胞層からの離脱/卵成熟を実行する流れの試験管内再構成：この2つの反応のどちらが先行するのかを明らかにするとともに、MAPキナーゼ阻害剤などを用いたシグナル伝達との関係性の検証も行う。

2017年度

アフリカツメガエル卵の細胞膜マイクロドメインに局在するUPIIIの受精やその他の卵細胞における生理機能を明らかにすることを目的として、UPIII遺伝子をノックアウトした二倍体ツメガエル（ネットイツメガエル）の作成を試みた。これまで共同研究者（広島大学両生類研究センター）による協力支援のもと、TALENs法およびCRISPR/Cas9法によるUPIIIノックアウトF0個体および同個体の交配実験によるホモノックアウトF1個体の作成を試みてきたが、いまのところホモノックアウト個体の生育が著しく不安定（幼生致死などの頻発）であり、成功するに至っていない。現在はヘテロノックアウト雌個体からの卵巣の摘出、または未受精卵の調製をへた単一細胞生物学的手法により、UPIII発現の有無と当該卵細胞の生物学的機能（成熟能、受精能など）の検証を行いながら、引き続きホモノックアウトF1個体の作成に挑戦していく予定である。

膜マイクロドメインの形成機構を明らかにする目的で、アフリカツメガエル卵母細胞のホルモン依存的な卵巣組織からの離脱機構をテーマとする実験的検証に進捗があった。卵巣組織からの離脱現象を試験管内再構成することに成功した。すなわち、外科的に摘出した卵母細胞（卵巣組織の断片）をコラゲナーゼ処理により「プロゲステロン依存的に」濾胞細胞層から離脱することができるように調整することが可能となった。このわれわれが「ホルモン依存的な試験管内排卵システム」とよぶ実験系を用いることで、アフリカツメガエル卵母細胞は体内でホルモン依存的に卵巣組織を離脱（排卵）したのちに細胞質レベルの成熟反応を実行することが明らかとなった。現在は、ホルモン依存的な排卵過程における濾胞細胞および卵母細胞のMAPキナーゼとマトリクスメタロプロテイナーゼの関与を検討している。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計5件)

(1) Tokmakov AA, Sato K. (2018) Reconstitution of intracellular calcium signaling in *Xenopus* egg extracts. *Methods in Molecular Biology*, in press. (査読あり)

(2) Sato K, Tokmakov AA. (2018) Membrane microdomains as platform to study membrane-associated events during oogenesis,

meiotic maturation, and fertilization in *Xenopus laevis*. *Methods in Molecular Biology*, in press. (査読あり)

(3) Tokmakov AA., Sato K., Stefanov VE. Postovulatory cell death: why eggs die via apoptosis in biological species with external fertilization. *Journal of Reproduction and Development* (2018) 1 ~ 6 (査読あり) 10.1262/jrd.2017-100

(4) Tokmakov AA, Iwasaki T, Sato K., Kamada S Reprogramming of somatic cells and nuclei by *Xenopus* oocyte and egg extracts. (2017) *International Journal of Developmental Biology* 60, 289-296. (査読あり) 10.1387/ijdb.160163at

(5) Tokmakov AA, Iguchi S, Iwasaki T, Fukami Y, Sato K. Global decay of mRNA is a hallmark of apoptosis in aging *Xenopus* eggs. (2016) *RNA Biology* 14, 339-346. (査読あり) 10.1080/15476286.2016.1276695.

〔学会発表〕(計 11 件)

(1) 松本 祐汰、横田 晴香、小川 佳祐、Alexander A. Tokmakov、佐藤 賢一 アフリカツメガエル卵巣内の卵母細胞がホルモン依存的に排卵・成熟する過程を分子・細胞レベルで解剖する試み。第40回日本分子生物学会、神戸国際展示場(神戸市)、2017年12月6日~9日

(2) 荒井 華菜香、西川 裕貴、Alexander A. Tokmakov、佐藤 賢一 Src/FAK依存性チロシンリン酸化はヒト膀胱癌細胞における抗アポトーシス機構を伴う細胞増殖と細胞運動に寄与する。第40回日本分子生物学会、神戸国際展示場(神戸市)、2017年12月6日~9日

(3) Alexander A. Tokmakov、佐藤 賢一 ツメガエル卵の安定性に対する抗酸化剤の効果。日本動物学会第88回大会、富山県民会館(富山)、2017年9月21~23日

(4) 井尻 貴之、岸川 淳一、今村 博臣、上野 秀一、岩尾 康宏、横山 謙、佐藤 賢一 ツメガエル卵母細胞においてATPが卵成熟に与える影響。日本動物学会第88回大会、富山県民会館(富山)、2017年9月21~23日

(5) Sato K., Tokmakov AA, Ijiri TW. Studies on signaling events associated with oocyte maturation, fertilization, and apoptosis in *Xenopus laevis*. Gordon Research Conference on Fertilization and Activation of Development, アメリカニューハンプシャー州 Holderness school, 2017年7月16日~21日

(6) Alexander A. Tokmakov, Surawich Jeens, Ken-Ichi Sato. Quantitative assessment of cell senescence markers in aging *Xenopus* oocytes and eggs. 第39回日本分子生物学会、パシフィコ横浜(横浜市)、2016年11月30日~12月02日

(7) 佐藤 賢一、Alexander A. Tokmakov、井尻 貴之 アフリカツメガエル卵の成熟・受精におけるUPIII-Srcシステムの機能獲得および発現、第39回日本分子生物学会、パシフィコ横浜(横浜市)、2016年11月30日~12月02日

(8) 佐藤 賢一 アフリカツメガエル卵の成熟・受精・アポトーシス 第2回次世代両生類研究会 ゲノム・エピゲノムからリプログラミング・器官再生まで: 両生類研究の新展開、岡崎コンファレンスセンター(岡崎市)、2016年08月08日~09日

(9) 西川 裕貴、佐藤 賢一 Src-dependent tyrosine phosphorylation contributes to anti-apoptotic cell proliferation in human bladder cancer cells. 第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会の合同学会 神戸国際展示場(神戸市)、2015年12月01日~04日

(10) Ijiri, T.W., Kishikawa, J., Imamura, H., Sakiie, M., Ueno, S., Iwao, Y., Yokoyama, K., Sato, K. Inhibition of ATP synthesis affects white spot occurrence and the increase of ATP during progesterone induced maturation in *Xenopus laevis* oocytes. Gordon Research Conference on Fertilization and Activation of Development, アメリカニューハンプシャー州 Holderness school, 2015年07月19日~24日

(11) Sato K. Egg membrane microdomain-associated uroplakin III-Src system contributes to oocyte maturation and fertilization in *Xenopus laevis*. Oocyte Maturation and Fertilization Meeting IV, 東北大学浅虫臨海実験所(青森市)、2015年06月15日~18日

〔図書〕(計 2 件)

(1) Diversity and Commonality in Animals: Reproductive and Developmental Strategies. 2018 Kobayashi K et al. (Eds), Springer, 787 (unknown) 978-4-431-56607-6, 333640_1_En, (27)

(2) Animal Models and Human Reproduction. 2017 Schatten H and Constantinescu GM. (Eds), Wiley-Blackwell, 600 (383-400) 10.1080/15476286.2016.1276695

〔その他〕

ホームページ等

京都産業大学総合生命科学部ホームページ

<https://www.kyoto-su.ac.jp/faculty/professors/nls/sato-kenichi.html>

研究室ホームページ日本語版

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~k3884/LABHPJ/index.html>

同上英語版

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~k3884/LABHPE/Welcome.html>

ハテナソン・ブログ

<http://ha-te-na-thon.hatenablog.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 賢一 (SATO, Ken-ichi)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：30235337

(2) 研究協力者

トクマコフ アレクサンダー (TOKMAKOV, Alexander A)

京都産業大学・総合生命科学部・研究助教

研究者番号：20301278

中島 圭介 (NAKAJIMA, Keisuke)

広島大学両生類研究センター・助手

研究者番号：60260311

井尻 貴之 (IJIRI, Takashi)

摂南大学理工学部生命科学科・講師

研究者番号：20629620