

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06686

研究課題名(和文) 哺乳類卵子活性化に伴う表在タンパク質動態のプロテオミクス解析

研究課題名(英文) Proteomic analysis of surface protein dynamics during mammalian oocyte activation.

研究代表者

佐藤 裕公 (Satouh, Yuhkoh)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：40545571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：現在、高齢化等による卵の質の低下が注目される。本研究では、未受精卵や受精後の卵のマウス卵が持つタンパク質について網羅的に解明するプロテオミクス解析を推進し、それらタンパク質の動態と動作原理、そしてその意義について解析した。この研究により、マウス卵が呈するタンパク質構成の動態を体系的に明らかにした。また、低侵襲性観察法を駆使して受精後に胚表面から失われる細胞膜上タンパク質群の分解機構を初めて明らかにし、この分解が胚の健康な発生に必須だと証明した。これは比較的アクセスしやすい胚の表面の因子と胚の質に関する初めての決定的な因果関係であり、今後の基礎応用両面への発展が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マウス未受精卵や受精後卵といった活性化前後の卵について定量プロテオミクス解析を行った。存在量が高く受精能を決定づけるタンパク質の詳細な機能解析を推進しつつ、胚の質の理解にむけ、胚の表面タンパク質の胚発生中の動態について動態解析を行った。この結果、受精必須因子であるCD9が細胞膜に曲率をもたらしていることを発見した。また、胚表面の胚発生に関与するタンパク質群がPKC酵素活性とタンパク質のユビキチン化依存的に胚表面から細胞内の分解機構に輸送され、これが胚発生にとって重要であることを発見した。これは、受精の直後に胚の質を検定する新たな手法の概念に通じる。

研究成果の概要(英文)：Recently, the decline in oocyte quality, especially due to ageing, attracts interest. In this study, proteomic analyses to comprehensively elucidate the proteins in unfertilized and post-fertilized mouse oocytes was carried out. Furthermore, analysis of their dynamics and its molecular mechanism were conducted to examine their significance on oocyte quality. During this study, basic composition and dynamic changes of the oocyte protein composition were clarified. By combining these results with extremely-low invasive observation, novel degradation mechanisms of proteins on the embryonic plasma membrane that are lost from the embryo surface after fertilization was elucidated. Moreover, this degradation was proven to be essential for the healthy development of the mammalian embryo. This is the first identification of causal link between relatively accessible embryo surface factors and embryo quality, and is expected to lead to future developments in both basic and applied aspects.

研究分野：生殖生物学

キーワード：受精 プロテオミクス イメージング タンパク質分解 卵子活性化 初期発生

## 1. 研究開始当初の背景

現在、我が国を含む先進諸国では16%以上の夫婦が不妊に悩み、少子化による影響は人口減少だけでなく患者らの生活の質の低下など様々な面で社会問題化している。近年、特にその原因は出産年齢の高齢化による卵子発生能の低下、すなわち卵子の質の低下が原因とされることが多く、より産仔に結び付く卵子や胚を見出す判定法の開発とともに、質の低下を抑制するための原因メカニズムの解明が求められている。現在までの卵の質研究においては、染色体の構造や安定性、細胞質因子の分布といった、細胞内の因子の解析に基づくものが多い。このため、これらを評価するには卵内にそれら因子のインジケーターを注入する、あるいは割球採取するなど侵襲的な手法をとることが多かった。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト卵子に似た特徴を示すマウス卵子を用い、未受精卵や受精後の卵(胚)の表面に存在するタンパク質に注目し、プロテオミクス解析によって卵子や胚の質を見分けるための表面分子を探索した。

この中で、特に下記の(1)、(2)に注目して解析を推進した。

(1)特に存在比率が高く、精子との受精に必須であることが示唆されながら、詳細な機能が明らかになっていない卵子CD9タンパク質について、プロテオミクス解析からその活性化前後での動態を解明するとともに、タンパク質立体構造解析を推進して、(受精に寄与する)機能ドメインの解明や、タンパク質全体が持つ形状や可塑性について検討した。

(2)包括的な比較プロテオミクス解析において特に動態を強く示し、かつ存在量の多いタンパク質群の中から、特に胚の質に機能的貢献をすることが見込まれる表面因子に注目し、申請者が得意とする超低侵襲性イメージング法により、目的因子(遺伝子)の動態と機能に関する解析を行うとともに、その動態をなす基盤分子メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

マウス卵子、特に本研究でも用いている遺伝子組換えマウスに由来する卵子は、性ホルモン等による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ため、プロテオミクスの解析のように物量と成果が比例する解析においては解析条件の検討が非常に難しい。実際、本研究でも望まれるような比較プロテオミクス解析の際には、定量性を担保するために1条件辺り数バッチ以上の解析対象を確保するなど、通常の解析よりも物量が必要になるため、慎重な条件検討が必要であった。これに対し、申請者らは、マウス卵子から非酵素的に解析を阻害するタンパク質を除去するアプローチと新たな可溶化条件について検討するとともに、複数ある比較プロテオミクスの手法について比較・検討することで、最も検出感度の高い比較条件を決定した。その後、

(1)CD9については、卵活性化前後でどのように存在量が変わるかを検討しつつ、共同研究の中でX線回折とクライオ電子顕微鏡観察により立体構造が解明された。また、CD9遺伝子を欠損するマウスから採取した排卵前卵子に対する変異型CD9 mRNA、またはヒト型CD9 mRNAの導入と受精能力の検定を行うことで、卵表面のCD9がどのような分子内ドメインを主に使って受精に貢献しているのかについて検討した。

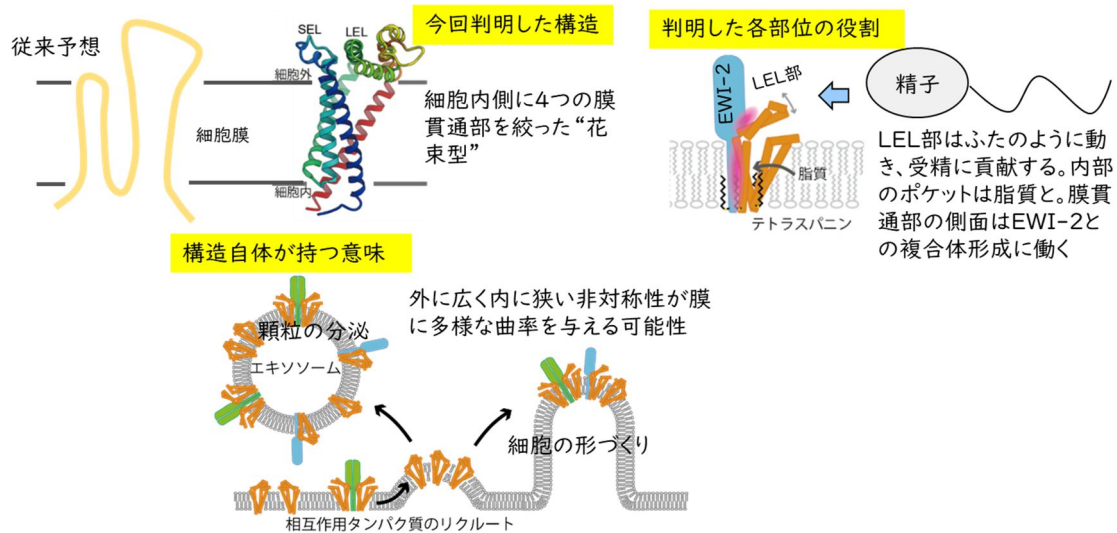
(2)遺伝的・条件的に異なる卵子について包括的な比較解析結果から、卵子の活性化前後で強い動態を示すいくつかの代表的な胚表面分子に関する動態・機能解析について、蛍光タンパク質タグの導入による動態と分解機構に関する解析を行った。対象としては、特に近年卵子の質を決定づけるとして注目されている「卵母性因子」に絞るため、未受精卵中である程度以上多い存在量を示すものに絞って解析した。

## 4. 研究成果

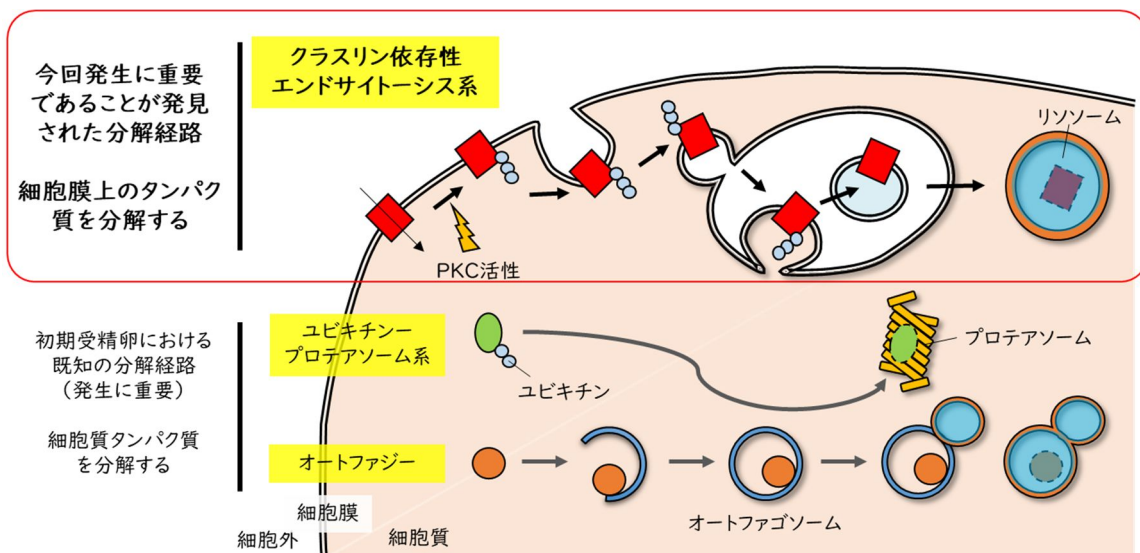
主な研究成果を論文とともに下記する。

(1)テトラスパニン蛋白質は、様々な蛋白質と複合体を作り、広範な細胞機能に関わる。本研究の立体構造解析の成果では、CD9の全体構造が4つの膜貫通部分を絞ったような花束状の構造で、膜の内外に強い曲率を与える得るというテトラスパニンの新たな意義を提唱した。また、機能ドメインの探索解析により、CD9蛋白質は細胞外に提示する大ループ部分が受精に重要であり一方、がん化などに関わるEWI-2との複合体は膜貫通部分との相互作用で成り立つことを明らかにした。これは、不妊薬や抗がん薬のデザインにおいて、より特異的に標的化することを可能にする可能性がある。なお、CD9はプロテオミクス解析においても受精後に著しく

減少することが見出されたが、これは細胞質外への膜小胞分泌の発生と関連していることが確認された。("Structural insights into tetraspanin CD9 function." Umeda R\* and Satouh Y\*, et al., (\*: equal first) *Nat Commun.* 11(1):1606. (2020) )



(2) マウス卵子プロテオミクス解析から注目する卵の表面分子をいくつか特定し、中でも、マウス受精卵の細胞膜上に存在する唯一のグリシン輸送体で、初期発生の特定のステージで浸透圧耐性を発揮するのに重要と目される GlyT1a に注目し、低侵襲性観察システムによってその動態を詳細に解析した。結果として、受精後の2細胞期胚後期においてこれらのタンパク質が選択的に細胞内へ取り込まれ分解されることを発見した。さらに、阻害剤などを用いた解析から、この取り込みの過程には、クラスリンやPKC 酵素の活性化、そしてタンパク質へのユビキチンの付与が関与することを明らかにした (*Development* 2021)。本研究は、これまでの卵子の質に関する研究が主に染色体の構造や安定性のような細胞内の因子の解析に基づくものが多く、その評価には侵襲的な手法をとることが多かったのに対して、初めて卵子や胚の表面の動態が胚の質に直結することを示した知見であり、卵および胚の質に関する分子的な理解の進展への貢献が期待される。("Clathrin-mediated endocytosis is essential for the selective degradation of maternal membrane proteins and preimplantation development." Morita A\*, Satouh Y\*, et al., (\*: equal first) *Development.* 148(14):dev199461.(2021))



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Inoue Naokazu, Satouh Yuhkoh, Wada Ikuo	4. 巻 88
2. 論文標題 IZUMO family member 3, IZUMO3, is involved in male fertility through the acrosome formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 479 ~ 481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrd.23520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Castaneda Julio M., Shimada Keisuke, Satouh Yuhkoh, Yu Zhifeng, Devlin Darius J., Ikawa Masahito, Matzuk Martin M.	4. 巻 134
2. 論文標題 FAM209 associates with DPY19L2, and is required for sperm acrosome biogenesis and fertility in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.259206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Morita Akihito, Satouh Yuhkoh, Kosako Hidetaka, Kobayashi Hisae, Iwase Akira, Sato Ken	4. 巻 148
2. 論文標題 Clathrin-mediated endocytosis is essential for the selective degradation of maternal membrane proteins and preimplantation development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.199461	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumura Takafumi, Noda Taichi, Satouh Yuhkoh, Morohoshi Akane, Yuri Shunsuke, Ogawa Masaki, Lu Yonggang, Isotani Ayako, Ikawa Masahito	4. 巻 9
2. 論文標題 Sperm IZUMO1 Is Required for Binding Preceding Fusion With Oolemma in Mice and Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 810118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.810118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satouh Yuhkoh	4. 巻 164
2. 論文標題 SPERM FACTORS AND EGG ACTIVATION: The phenotype of PLCZ1-deficient mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 F21 ~ F28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/REP-21-0438	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satouh Yuhkoh, Inoue Naokazu	4. 巻 -
2. 論文標題 Involvement of cellular protrusions in gamete interactions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Seminars in Cell & Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Castaneda Julio M, Miyata Haruhiko, Archambeault Denise R, Satouh Yuhkoh, Yu Zhifeng, Ikawa Masahito, Matzuk Martin M	4. 巻 102
2. 論文標題 Mouse t-complex protein 11 is important for progressive motility in sperm†	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 852 ~ 862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz226	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Umeda Rie, Satouh Yuhkoh, Takemoto Mizuki, Nakada-Nakura Yoshiko, Liu Kehong, Yokoyama Takeshi, Shirouzu Mikako, Iwata So, Nomura Norimichi, Sato Ken, Ikawa Masahito, Nishizawa Tomohiro, Nureki Osamu	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural insights into tetraspanin CD9 function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 643-651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15459-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 佐藤 美由紀、佐藤 裕公、佐藤 健	4. 巻 91
2. 論文標題 初期発生におけるリソソーム分解の生理機能と分子メカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 643 ~ 651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910643	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 佐藤裕公
2. 発表標題 精子 - 卵の融合に必要な卵細胞膜タンパク質の構造機能解析
3. 学会等名 第62回日本卵子学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤裕公, 森田晶人, 佐藤健
2. 発表標題 哺乳類初期胚におけるアミノ酸トランスポーターGlyt1aの能動的分解機構の解明
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satouh Yuhkoh
2. 発表標題 Low-invasive fluorescent imaging analysis to visualize mammalian reproductive events.
3. 学会等名 EMBO-EMBL symposia: Seeing is Believing (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田晶人, 岩瀬明, 佐藤裕公, 佐藤健
2. 発表標題 胚発生異常に対する新規アプローチ法の開発に向けて
3. 学会等名 第53回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤健, 佐藤裕公, 森田晶人, 川崎一郎
2. 発表標題 動物発生における細胞膜分解の分子機構とその生理機能
3. 学会等名 第14回オートファジー研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satouh Yuhkoh
2. 発表標題 Clathrin-mediated endocytosis is essential for the selective degradation of maternal membrane proteins and preimplantation development
3. 学会等名 The 16th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences KEY FORUM 2021 International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤裕公, 森田晶人, 佐藤健
2. 発表標題 哺乳類初期胚における母性膜タンパク質分解機構の解明
3. 学会等名 第44回分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤健, 佐藤美由紀, 佐藤裕公, 森田晶人.
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田晶人, 佐藤裕公, 佐藤健.
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第38回 日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤裕公
2. 発表標題 受精関連因子CD9の立体構造について
3. 学会等名 第7回 生殖若手の会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤裕公
2. 発表標題 マウス卵におけるオルガネラ動態のイメージング解析
3. 学会等名 第 12 回 オートファジー研究会
4. 発表年 2019年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Satouh Yuhkoh HP  
<https://sites.google.com/view/yuhkohsatouh/home>  
群馬大学研究者データベース：佐藤裕公  
<https://rdb.gunma-u.ac.jp/profile/ja.1b015401c3421e8d520e17560c007669.html>  
<https://sites.google.com/view/yuhkohsatouh/home>  
Satouh Yuhkoh HP

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------