

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770142

研究課題名（和文） 卵活性化シグナル伝達経路の解明

研究課題名（英文） Signaling pathway of *Xenopus* egg activation

研究代表者 岩崎 哲史 (Iwasaki Tetsushi)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環遺伝子実験センター・技術専門職員

研究者番号：40379483

研究成果の概要（和文）：アフリカツメガエル受精時の卵活性化時にチロシンキナーゼ Src が活性化することが知られているが、その活性化メカニズムやその生理機能は明らかになっていない。本研究において、受精時における Src 活性化機構や Src の生理機能について解析した結果、卵形質膜上のラフトに局在する三量体 GTP 結合型タンパク質の α サブユニットが Src を活性化することが示唆された。また RNA 結合タンパク質 hnRNP K が Src によってチロシンリン酸化され、特異的に結合している mRNA と解離することで、mRNA の翻訳が活性化される可能性が示された。

研究成果の概要（英文）： We have previously demonstrated that Src tyrosine kinase plays an important role in the *Xenopus* egg activation. However, the molecular mechanism of egg activation is still unclear. Here, we investigated the activation mechanism and the physiological function of Src kinase in *Xenopus* egg fertilization. Biochemical and immunochemical analyses have revealed the involvement of heterotrimeric G proteins in sperm-induced Src activation. Moreover, we analyzed hnRNP K protein, which is known as a substrate of Src kinase in *Xenopus* egg fertilization. Our molecular biological and biochemical analyses showed that the hnRNP K binds to specific mRNAs in unfertilized egg, and that Src-mediated tyrosine phosphorylation acts as a trigger for their dissociation at egg activation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生化学、分子生物学、発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構

1. 研究開始当初の背景

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*, 以下、ゼノパス) の受精時に精子が卵形質膜上の精子受容体に結合すると、卵の形質膜内の微小領域である脂質ラフト (以下、卵ラフト) の細胞内側で、チロシンキナーゼ Src が活性化することが知られている。しかし精子が精子受容体へ結合した後、その情報がどのように Src 活性化へつながるかは不明である。一方、活性化した Src は複数の基質をチロシンリン酸化することが知られている。例えば PLC γ をチロシンリン酸化して活性化し、卵内カルシウムイオン濃度の一過的上昇を誘導する。また Src は Shc や RNA 結合タンパク質 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) をリン酸化するが、その生理学的意義は明らかになってない。

2. 研究の目的

本研究はゼノパスを脊椎動物の受精モデルとして、受精時シグナル伝達の分子メカニズム、特に Src がどのように活性化されるのか、hnRNP K の mRNA の翻訳機構を明らかにすることを目的として、研究を行った。

3. 研究の方法

材料と試薬: 成熟した雌雄ゼノパスは 18–22°C の脱カルキを行った水道水中で飼育した。ゼノパスの産卵はゼノパス雌 1 個体に対し 375 IU のヒト絨毛性ゴナドトロピンを背面尾部に皮下注射することにより誘導した。その後ゼノパスを 18–22°C で約 10 時間静置した後、自然産卵またはゼノパスの腹部圧迫により産出させ、未受精卵を得た。未受精卵は DeBoer's buffer (110 mM NaCl, 1.3 mM KCl and 0.44 mM CaCl₂ pH 7.2 by NaHCO₃, 以下 DB) 中に保管し、3 時間以内に実験に用いた。卵ゼリー層除去は 1% L-Cystain を含む DB で 5–10 分間処理を行うことで実施した。精子懸濁液は過去の報告に従って行った (Iwasaki, *Dev Groth Differ*, **50** 23–40 (2008))。抗 hnRNP K 抗体はゼノパス hnRNP K カルボキシル末端の配列 (アミノ酸番号 377–396 番) に相当する合成ペプチド NH₂-CRFLQNSVKQFSEDYAYGF-COOH を抗原としてウサギに免疫して作成した。その他の本実験で用いた抗体は Santa cruz biotechnology 社、MolBio 社、BioSource 社から購入した。ゼノパス Gs, Gi1 遺伝子はチリ・コンセプション大学 Juan Olate 博士から供与して頂いた。その他の試薬類は GE ヘルスケア社、シグマ社、ナカライテスク社から購入した。

細胞分画法: 卵細胞を 3 倍量の Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5、10 mM EDTA、1 mM EGTA、10 mM 2-mercaptoethanol、150 mM NaCl、10 μ g/mL leupeptin、20 μ M APMSF、1 mM Na₃VO₄) を添加し Teflon-Grass ホモジナイザーを用いて卵を破碎した。細胞抽出液を 10,000 g 20 分間の遠心分離後、上清をさらに 150,000 g、1 時間 4°C で超遠心分離を行った。この遠心分離後の上清を細胞質画分とした。沈殿物を 1% Triton X-100 を含む Lysis buffer で可溶化し、再度 150,000 g 1 時間 4°C で超遠心分離を行い、上清を膜画分とした。この沈殿物を Laemmli SDS sample buffer を用いて可溶化したものを細胞骨格画分とした。

ラフト画分の調整、in vitro 卵ラフト解析法: 過去に報告された方法、ショ糖密度勾配遠心法および in vitro 卵ラフト解析法を用いて行った (Sato, *Development*, **129**, 885–896 (2002))。

免疫沈降法: タンパク質試料 (100–500 μ g、1 mg/mL) に対し 50–100 分の 1 体積の抗血清または 10 μ g/mL の抗体を添加し、2 時間 4°C で反応させた。反応液に Protein A-Sepharose を 10 分の 1 体積添加し、30 分間 4°C で穏やかに攪拌した。Protein A-Sepharose を低速遠心分離で回収し 500 μ L の Washing buffer (0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS)、1% Triton X-100、1% sodium deoxycholate、150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl, pH 7.5、1 mM Na₃VO₄、10 μ g/mL leupeptin、20 μ M APMSF) で 3 回洗浄し免疫沈降物を得た。

ウエスタンブロットティング法: 7.5、10 または 12.5% SDS-polyacrylamide gel を用いた電気泳動法 (SDS-PAGE 法) によりタンパク質試料を分離した。Bio-Rad 社製の Semi-dry blotter を用いて分離したタンパク質を polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に転写した。PVDF 膜のブロッキング処理、抗体処理は過去に報告した方法に準じた (Iwasaki *J. Biochem.* **139**, 347–354 (2006))。免疫複合体の検出は Alkaline phosphatase が共有結合した二次抗体 (Cappel 社製、APase-抗ウサギイムノグロブリン G 抗体) を用いた発色法により行った。

定量 PCR 法および Real-time PCR 法: 免疫沈降物からフェノール法およびエタノール沈殿法を用いて RNA を抽出、精製した。逆転写は Super Script III 逆転写酵素、定量 PCR は Platinum Taq polymerase (Invitrogen 社) を用いた。PCR プライマーは過去に報告したものを用いた (Iwasaki, *Dev Groth Differ*, **50** 23–40 (2008))。Real-time PCR 法は Roche Diagnostics 社製の FastStart SYBR Green Master および LightCycler480 を使用して実施した。

4. 研究成果

xSrc 活性化因子としての三量体 G タンパク質: Src 活性化因子を同定し、その相互作用様式を明らかにするために、卵ラフト解析系を用いて、生化学的・免疫化学的手法により解析を行った。これまでに、GTP 結合タンパク質 (以下、G タンパク質) 活性化剤が卵ラフトに局在する Src を活性化することが明らかになっていることから、G タンパク質が Src の活性化因子として機能している可能性がある。そこでまず、受精における G タンパク質の必要性を検証した。G タンパク質阻害剤 GDPβS でゼノパス卵を処理した後に人工授精を行ったところ、受精に伴う卵活性化が GDPβS 濃度に依存して抑制された。つづいて未受精卵から生化学的に抽出した卵ラフトに GDPβS を加えたところ、精子による卵ラフト中における xSrc 活性化が GDPβS の濃度依存的に阻害された。また卵ラフトのウエスタンブロッティング解析から、ゼノパス未受精卵の卵ラフトには複数種の三量体 G タンパク質が局在していることが示された。さらにゼノパスの G タンパク質 α サブユニットを大腸菌発現系により調整し、試験管内で再構成させたところ、ゼノパス G タンパク質を非水解性の GTP アナログである GTPγS で処理した場合にのみ、ラフト中の Src が活性化することが示された。以上のことから、G タンパク質 α サブユニットがゼノパス受精時において Src 活性化因子として機能している可能性が高まった。

hnRNP K のリン酸化状態と mRNA 結合能の相関: これまでの研究から、ゼノパス未受精卵において、hnRNP K に特定の mRNA が結合していることが示されている (表 1)。

表1 未受精卵で hnRNP K タンパク質と結合している母性 mRNA

抗 hnRNP K 抗体を用いた免疫沈降法および RT-PCR 法により、ゼノパス未受精卵において hnRNP K タンパク質と結合している mRNA (Target mRNA)。データベース上のアクセッション番号 (Accession No.) と mRNA 翻訳産物の機能 (Description) を示す。

Target mRNA	Accession No.	Description
MEK3	AF172648	Ser/Thr/Tyr kinase, MAPK activator
Cofilin 2	BC043803	Actin depolymerization factor
Soc-2 suppressor	BC042263	Suppressor of FGF signaling
Capping protein β1	BC041233	F-actin capping protein β subunit
XER81	BC072827	ETS-related transcription factor
MGC83604	BC073108	Ser/Thr Kinase
Cyclin B3	BC106306	Regulator of CDK1
Kelch-like 15	BC077331	Kelch motif-containing protein
Oct1	X17190	POU-box transcription factor
ABC transporter	BC046877	ATP-binding cassette transporter
LASP-1	BC044681	LIM and SH3 domains, actin-binding protein
XSEB4R	BC072792	RRM-type RNA-binding protein
MGC81841	BC081052	Heat shock transcription factor
MGC64475	BC054258	ATPase, H+ transporting, V0 subunit C

また hnRNP K のリン酸化状態は受精前後

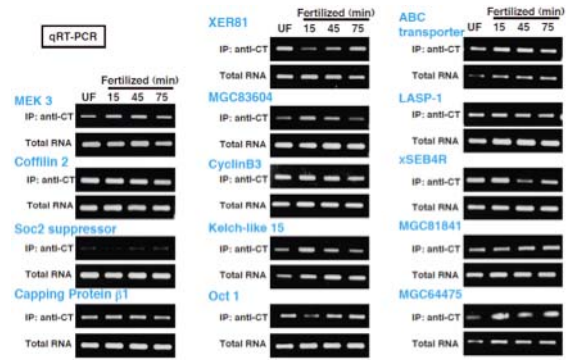


図1 卵における hnRNP K タンパク質の局在

未受精卵を超遠心分離法により細胞質画分 (C)、膜画分 (M)、細胞骨格画分 (S) に分画した。10 μg のタンパク質を電気泳動し、それぞれの特異抗体を用いてウエスタンブロッティング解析を行った。右の矢印はターゲットタンパク質の分子量を示す。

で変化することが知られている (Iwasaki, *Dev Groth Differ*, 50 23-40 (2008))。そこで未受精卵および受精直後の初期胚における hnRNP K と mRNA との結合能を検証した (図 1)。まず未受精卵と媒精 15、45 および 75 分後の受精卵から特異抗体を用いて hnRNP K を部分精製し、免疫沈降物中の RNA をフェノール法およびエタノール沈殿法により抽出した。一定量の mRNA を鋳型として遺伝子特異的プライマーを用いて qRT-PCR 法および real-time PCR 法を行い、hnRNP K と mRNA の結合性を評価した (図 1)。その結果 hnRNP K との結合能は、mRNA 分子種によって異なることが明らかになった。例えば hnRNP K がチロシンリン酸化を受ける受精後 15 分では、転写因子である XER81 や Oct1 との相互作用が一過的に減少した。一方で MGC83604、Kelch-like 15、MGC64475 では結合能が亢進した。また hnRNP K のセリン、チロシンのいずれの残基もリン酸化されていない受精後 45 分においては、RNA 結合タンパク質である xSEB4R との結合能が顕著に低下した。hnRNP K が発生開始後再度セリンリン酸化を受ける受精後 75 分においては、どの分子種においても未受精卵と同レベルの結合性を有することが明らかになった。未受精卵と受精後 75 分の胚では、いずれも Erk が活性化しており、hnRNP K はセリンリン酸化のみを受けている。このことから、hnRNP K のリン酸化と mRNA の結合能には相関関係があるが、結合親和性 (つまりリン酸化によって結合が強まるか、弱まるか) は mRNA 分子種により異なることが示唆された。なお全ての遺伝子において、解析した時間経過内では卵内 RNA の存在量には殆ど変化がみられなかった。また real-time PCR 法を用いて hnRNP K と mRNA の結合性を解析したところ、概ね同様の傾向が見られた。

hnRNP K に結合している mRNA の転写産物についての発現プロファイル：続いて発現局在を解析した。上述の hnRNP K と特異的に結合している 14 種類の mRNA について、市販抗体を用いてそれぞれの発現産物について卵・卵母細胞内の局在について解析を行った。その結果、14 分子種のうち 4 分子種がゼノバス卵・卵母細胞を通して翻訳され、分子種により固有の発現パターンを示すことが明らかになった (図 2)。セリン・トレオニンキナーゼ MEK3 は 90% が細胞質画分、10% は細胞骨格に、転写因子 XER81 は細胞質画分に 70%、膜画分に 30% 局在することが明らかになった。しかしこれらのいずれの分子種においても、卵成熟・初期発生過程において明瞭な局在変化は観察されなかった。以上の結果から本研究で検証できた分子種については翻訳や局在がコントロールされる可能性は低い。しかし hnRNP K は xSrc によってチロシンリン酸化、Erk によってセリンリン酸化されること、さらにこれらのリン酸化によって mRNA との結合能が変化することから、mRNA 翻訳に関与する可能性が高い。以上の成果を統括すると、図 3 に示す卵活性化のシグナル伝達経路が考えられる。

本研究成果は配偶子や初期胚における遺伝子発現コントロールと、リン酸化酵素の介するシグナル伝達カスケードとのクロストークを明らかにするものであり、その分子基盤を築くものである。これまでに hnRNP K は遺伝子発現コントロールを通してがん抑制に関与することが報告されている。本研究

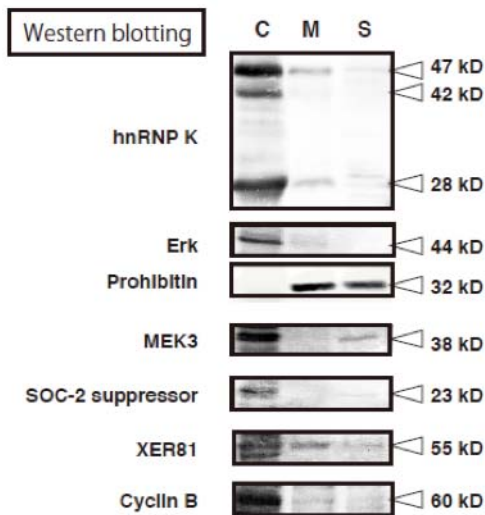


図2 卵における hnRNP K タンパク質の局在

未受精卵を超速心分離法により細胞質画分(C)、膜画分(M)、細胞骨格画分(S)に分画した。10 μg のタンパク質を電気泳動し、それぞれの特異抗体を用いてウエスタンブロットング解析を行った。右の矢印はターゲットタンパク質の分子量を示す。

成果は基礎生命科学上の成果にとどまるも

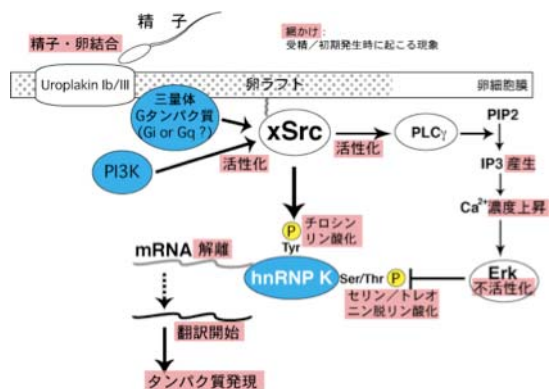


図3 精子が卵形質膜上の卵ラフトに存在する精子受容体に結合すると、卵ラフトで PI3K や三量体 G タンパク質が活性化し、xSrc を分子間相互作用で活性化する。xSrc は PLCγ をチロシンリン酸化して活性化し、PLCγ は PIP2 を加水分解して IP3 を産生する。IP3 は小胞体からのカルシウムイオンの放出を誘導する。一方で、xSrc は受精時に hnRNP K をチロシンリン酸化する。また hnRNP K は MAPK の 1 種である Erk によってセリンリン酸化を受けているが、卵活性化に伴い Erk が不活性化し、hnRNP K のセリンリン酸化レベルが下がる。hnRNP K はこれらのリン酸化状態変化より特定の母性 mRNA との結合能が弱まる。この結果、mRNA の翻訳効率が高まり、タンパク質産生が開始する。

のではなく、抗がん創薬研究、生殖医療研究等にも発展するものと期待される。

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 4 件)

1. Laisa A. Lisa, Sabrina M. Elias, M. Sazzadur Rahman, Saima Shahid, Tetsushi Iwasaki, A.K.M. Mahbub Hasan, Keiko Kosuge, Yasuo Fukami, Zeba I. Seraj

Physiology and gene expression of the rice landrace Horkuch under salt stress
Functional Plant Biology, 38(4), 282–292

2. Tokmakov A.A., Iwasaki T., Sato KI., and Fukami Y. (2010)

Analysis of signal transduction in cell-free extracts and rafts of *Xenopus* eggs
Methods, 2010 May;51(1):177-182

3. Mammadova G., Iwasaki T., Tokmakov A.A., Fukami and Y., Sato K.-I. (2009) Evidence that phosphatidylinositol 3-kinase is involved in sperm-induced tyrosine kinase signaling in *Xenopus* egg fertilization. BMC Dev. Biol., December 17, 9:68, 2009

4. Oka M., Sumita N., Sakaguchi M., Iwasaki T., Bito T., Kageshita T., Sato K.I., Fukami Y., and Nishigori C. (2009)

TPA inhibits melanoma growth by inactivation of STAT3 through PKC-activated tyrosine

phosphatase(s).
J Biol Chem. 2009 Oct 30; 284(44),
30416-30423

[学会発表] (計 11 件)

1. Tetsushi Iwasaki, Sho Iguchi, Alexander Tokmakov, Yasuo Fukami,
Evolutional and functional analysis of *Xenopus* STAT3

Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology “The Evolution of Protein Phosphorylation”
平成 23 年 1 月 25 日、Keystone, US

2. Tetsushi Iwasaki, Sho Iguchi, Takanori Hashimoto, Minoru Sasakura, Alexander Tokmakov, Yasuo Fukami, Functional analysis of STAT3 during *Xenopus* oocyte maturation
BMB2010 第 33 回分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会
平成 22 年 1 月 9 日、神戸

3. Tomoyo Tani, Alexander Tokmakov, Tetsushi Iwasaki, Yasuo Fukami
Effect of Src kinase inhibition on melanoma cell growth
BMB2010 第 33 回分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会
平成 22 年 1 月 8 日、神戸

4. Effect of Src kinase inhibition on melanoma cell growth
Sho Iguchi, Takanori Hashimoto, Tetsushi Iwasaki, Yasuo Fukami, Alexander Tokmakov
BMB2010 第 33 回分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会
平成 22 年 1 月 9 日、神戸

5. FM-AFM Study of Proteins on Lipid Rafts
T. Sugihara, T. Hiasa, H. Onishi, K. Kimura, M. Ohta, K. Watanabe, R. Kokawa, N. Oyabu, K. Kobayashi, H. Yamada, T. Iwasaki, Y. Fukami
The 12th International Scanning Probe Microscopy Conference
平成 22 年 5 月 10 日、札幌

6. Expression analysis of hnRNP K-binding mRNAs during *Xenopus* early development
Tetsushi Iwasaki, A.K.M. Mahbub Hasan, Sho Iguchi, Gunay Mammadova, Tokmakov A. Alexander, Ken-ichi Sato, Yasuo Fukami
第 32 回日本分子生物学会年会
平成 21 年 1 月 9 日、横浜

7. Unfertilized *Xenopus* eggs die by apoptosis after MAPK inactivation

Tokmakov A. Alexander, Sho Iguchi, Tetsushi Iwasaki, Yasuo Fukami
第 32 回日本分子生物学会年会
平成 21 年 1 月 9 日、横浜

8. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in signal transduction at fertilization in *Xenopus* eggs
Gunay Mammadova, Tetsushi Iwasaki, Tokmakov A. Alexander, Yasuo Fukami, Ken-ichi Sato
第 32 回日本分子生物学会年会
平成 21 年 1 月 10 日、横浜

9. Analysis of *Xenopus* Src and G protein functions in egg activation
A.K.M. Mahbub Hasan, Tetsushi Iwasaki, Gunay Mammadova, Sho Iguchi, Tokmakov A. Alexander, Ken-ichi Sato, Yasuo Fukami
第 82 回日本生化学会大会合同大会
平成 21 年 1 月 22 日、神戸

10. Gunay Mammadova, Shota Kushima, Tetsushi Iwasaki, Alexander A. Tokmakov, Yasuo Fukami, Ken-ichi Sato
Involvement of Phosphatidylinositol 3-kinase in sperm-induced tyrosine kinase signaling in *Xenopus* egg fertilization
日本動物学会第 80 回大会
平成 21 年 9 月 17 日、静岡

11. Tetsushi Iwasaki, A.K.M. Mahbub Hasan, Tokmakov A. Alexander, Gunay Mammadova, Ken-ichi Sato, Yasuo Fukami
Molecular mechanism of Src activation in *Xenopus* egg fertilization
Gordon Research Conference “Phosphorylation & G-Protein Mediated Signaling Network”
平成 21 年 6 月 10 日、Biddeford, US

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 哲史 (Iwasaki Tetsushi)
神戸大学・自然科学系先端融合研究環遺伝子実験センター・技術専門職員
研究者番号：40379483

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし