

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291036

研究課題名(和文) 受精卵における細胞内膜系リモデリングの時空間的制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of spatiotemporal regulation mechanisms for intracellular membrane remodeling in embryos

研究代表者

佐藤 健 (Sato, Ken)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：30311343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：受精卵においては発生に向けた細胞成分の大規模な変換が起こる。本研究ではまず線虫*C. elegans*を駆使することにより、この過程に異常を示す変異株を分離し、その原因遺伝子の1つがファルネシル2リン酸合成酵素であることを見出した。また、低分子量GTPase Rab11を制御する新規因子としてREI-1を発見し、この因子がGDP/GTP交換因子としてRab11をゴルジ体にリクルートすることにより、卵割を促すことを明らかにした。さらに、マウスの受精卵におけるライブイメージング系を構築し、哺乳類の受精卵においても母性膜タンパク質の選択的分解等の細胞内変換が起こることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Fertilization triggers cell remodeling from each gamete to a totipotent zygote. In this study, we used the nematode *C. elegans* to understand the mechanisms underlying the cell remodeling during early development. We isolated several *C. elegans* mutants, which are defective in the cell remodeling during embryogenesis and found that one of these mutants has a mutation in the farnesyl pyrophosphate synthase gene. We also identified REI-1 as a novel regulator for a small GTPase Rab11 and showed that REI-1 functions as a guanine nucleotide exchange factor to recruit Rab11 to the Golgi apparatus for promoting the cytokinesis of embryos. In addition, we established a live-cell imaging system for mouse embryos and revealed that the cell remodeling such as the selective degradation of maternal membrane proteins also takes place in mammalian embryos.

研究分野：細胞生物学

キーワード：受精 エンドサイトーシス 分解

1. 研究開始当初の背景

受精は有性生物発生の出発点であり、精子と受精した卵母細胞はすべての細胞に分化しうる全能性を獲得し、接合子へと変化する。この際、染色体の構造や遺伝子の発現様式が大きく変化することはもちろん、細胞質やそこに存在するオルガネラなどの膜成分も劇的に変化し、減数分裂期の細胞から体細胞分裂を行う胚発生に向けた細胞内外成分の変換が起こる。

申請者らは、この受精前後の細胞内変換機構に焦点をあてて研究を行ってきた。これまでも線虫 *C. elegans* の生殖細胞を用いたライブイメージング解析により、初期発生過程の進行に伴い細胞内膜系の成分も次々と変化していくことを見出している。まず申請者らは、*C. elegans* の受精卵において精子由来の父性ミトコンドリアがオートファジーによって選択的に分解され、細胞内から除去されることを明らかにしている。また、このオートファジーに続いて、細胞外マトリックス成分を含む表層顆粒が同調的にエキソサイトーシスされ、細胞外微小環境を変化させることが胚発生に必須であることを見出している。さらに、その後、卵母細胞由来の一群の細胞膜タンパク質がエンドサイトーシスにより選択的に細胞内に取り込まれ分解されることを見出している。これらの結果は、細胞質成分だけではなく膜成分も減数分裂期から胚発生に向けて再編成されることを示唆している。しかしながら、この細胞内膜系リモデリングを発生の時間軸に沿って遂行させるシグナル伝達機構とメンブントラフィックを制御する実行因子についてはいまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

そこで本研究では、まず線虫個体におけるライブイメージングと遺伝学的手法を駆使することによって、発生の時間軸に厳密に制御された細胞内膜系リモデリングの分子メ

カニズムとその生理的意義を明らかにすることを旨とした。また、線虫研究で得られた知見を活かし、マウス初期胚における細胞内成分のライブイメージング系の構築を試み、これらの現象の普遍性について検証を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、受精後に起こる細胞内膜系リモデリングに関して線虫およびマウスを用いて解析を行った。まず線虫 *C. elegans* の利点である遺伝学的手法を駆使して、表層顆粒の形成、分泌および受精後の母性膜タンパク質の分解に異常を示す変異体を分離し、その原因遺伝子を同定、機能解析を行った。また、受精によって誘導されるオートファジーによる精子由来成分の選択的分解機構を制御する因子の探索、機能解析も行った。さらに、これらのプロセスを発生の時間軸に沿って厳密に進行させるシグナル伝達経路に関して、キナーゼ等に対する網羅的な RNAi スクリーニングを行い、新規関連因子の探索、解析を行った。一方、マウス初期胚における細胞内膜ダイナミクスについてもライブイメージングシステムを構築し解析した。

4. 研究成果

(1) 表層顆粒の分泌および母性膜タンパク質の選択的分解に関連する新規因子の探索と解析

CAV-1::GFP は初期の生殖細胞では主に細胞膜に局在しているが、卵母細胞が生育するにつれて徐々に表層顆粒に蓄積する。この表層顆粒は受精後に同調的に細胞膜と融合し、細胞外へコンドロイチンプロテオグリカンなどの細胞外マトリックス成分を分泌し、細胞外微小環境を変化させる。また、細胞膜に輸送された CAV-1::GFP はその後、選択的にエンドサイトーシスされ、リソソームにおいて分解される。そこでまず CAV-1::GFP の動態を指標として、この動態が異常になる変異

株の分離を試み、2 種の変異株を同定した。1 つは制限温度において胚性致死となる温度感受性株で、CAV-1::GFP が表層顆粒にターゲットされず小胞体に蓄積する表現型を示した。そこで、この原因遺伝子を同定したところ、ファルネシル 2 リン酸合成酵素 (FDPS) に変異があることが明らかとなった。この変異株においては低分子量 GTPase である Rab1 等の局在性が著しく低下していることが判明した。Rab の局在化には C 末端側に付加されたガラニルガラニル基が必須であることが知られており、この変異株においては FDPS の欠損によってガラニルガラニル基の合成が低下しているため、Rab の局在性と機能が低下していると考えられる。

次に、線虫の受精前後においてその局在性を変化させながら、エンドサイトーシス、分泌、卵割に働く低分子量 GTPase Rab11 に着目し、その機能制御因子の同定を試みた。酵母ツーハイブリッド法により線虫の Rab11 と相互作用する因子を探索したところ、線虫からヒトまで保存された新規因子 REI-1 を発見した。REI-1 は SH3BP5 ドメインを持つものの、既知の Rab 制御因子とは顕著なホモロジーを示さなかった。この REI-1 は Rab11 の GDP 型及びヌクレオチド非結合型と特異的に結合することから、REI-1 が Rab11 を活性化する GDP/GTP 交換因子 (GEF) である可能性について検討した。まず大腸菌において線虫 REI-1 及びヒトホモログ (SH3BP5) を発現させ、精製を行った。続いて、これらのタンパク質の Rab11 に対する GDP/GTP 交換能を解析したところ、両者とも非常に強い GEF 活性を示すことが明らかとなった。REI-1 は線虫の生殖腺において発現しており、後期ゴルジ体において RAB-11 と共局在していた。REI-1 を欠損した線虫の受精卵では、Rab11 がゴルジ体やエンドソームから細胞質中に分散し、受精卵の分裂に遅延が生じることから、REI-1 タンパク質は受精卵において Rab11 を後期ゴ

ルジ体に導き、細胞分裂を制御する新規の Rab11 GEF であると結論した。Rab11 は細胞内輸送を制御する鍵因子であるにも関わらず、その GEF は未同定であった。今回我々が同定した REI-1 は既知の GDP/GTP 交換因子とはホモロジーがなく、線虫からヒトまで保存されたまったく新たな GDP/GTP 交換因子ファミリーと考えられ、ヒトでは 70 種類以上存在する Rab GTPase の制御機構を解明する上できわめて重要な発見といえる。

(2) 細胞内膜系リモデリングを制御するシグナル伝達因子の探索

CAV-1::GFP の動態を指標に、キナーゼ、フォスファターゼ及びユビキチン関連因子等を含む RNAi ライブラリーを作製して関連因子のスクリーニングを行った。その結果、CAV-1::GFP の受精後の分解に関わる新規因子を同定した。この因子の発現を阻害すると、受精卵において CAV-1::GFP が肥大したエンドソーム上に蓄積し、この構造上にユビキチンが蓄積することが判明した。この表現型は、後期エンドソーム上において分解される膜タンパク質の内部小胞へのソーティングに働く ESCRT 複合体を機能阻害した表現型と類似していることから、後期エンドソームにおける輸送障害が示唆された。一方で、卵母細胞における卵黄成分のエンドサイトーシスや卵黄受容体のリサイクリングには影響は見られなかった。興味深いことに、この因子に GFP を融合し生殖腺において発現させたところ、P 顆粒という生殖顆粒に局在することが明らかとなった。これらのことから、生殖顆粒に存在する因子が未知のシグナリング経路を介してエンドサイトーシスの後期プロセスを制御することによって受精後の減数分裂期膜タンパク質の分解に関与することが示唆された。一方、受精後の父性ミトコンドリアの分解に関与する新規因子を同様に探索し、キナーゼの一種を同定した。

(3) マウス受精卵における細胞内膜動態の高解像度ライブイメージングシステムの構築

まずマウス受精卵の共焦点レーザー顕微鏡による生体観察を可能とする培養条件や撮影条件等を検討し、初期胚発生における膜動態を観察可能な高解像度ライブイメージングシステムを構築した。そこでこの観察システムを用いて、受精卵における父性ミトコンドリアの動態を観察したところ、受精卵に侵入した父性ミトコンドリアはしばらく中片部に留まり、その後徐々に細胞質へと分散していくことが明らかとなった。興味深いことに、囲卵腔に存在する精子のミトコンドリアは形態が正常なのに対し、受精卵に侵入した精子ミトコンドリアは内部形態が崩れているように観察された。このことから、受精直後に精子ミトコンドリアは変性していることが示唆された。また、マウス受精卵において一群の細胞膜タンパク質の動態を観察したところ、マウスにおいても受精後にはエンドソーム、リソソーム系が活性化し、エンドサイトーシス経路を介した細胞膜タンパク質の大規模分解が起こることが明らかとなった。

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11件)

佐藤美由紀, 佐藤健. ミトコンドリア DNA の母性遺伝とオートファジー, 最新医学, 査読無, Vol.72, No.2, 211-217, 2017

Kunii M, Ohara-Imaizumi M, Takahashi N, Kobayashi M, Kawakami R, Kondoh Y, Shimizu T, Simizu S, Lin B, Nunomura K, Aoyagi K, Ohno M, Ohmuraya M, Sato T, Yoshimura S, Sato K, Harada R, Kim Y, Osada H, Nemoto T, Kasai H, Kitamura T, Nagamatsu S, and Harada A. Opposing roles for SNAP23 in secretion in exocrine and endocrine pancreatic cells. J. Cell Biol. 査読有 215(1): 121-138. 2016 DOI:

10.1083/jcb.201604030

Sakaguchi A, Sato M, Sato K. REI-1, a Novel Rab11 GEF with a SH3BP5 domain. Communicative & Integrative Biology. 査読有 9(5): e1208325. 2016. DOI: 10.1080/19420889.2016.1208325

Sato K, Sakaguchi A, Sato M. REI/SH3BP5 protein family: New GEFs for Rab11. Cell Cycle. 査読有 15(6):767-9. 2016 DOI: 10.1080/15384101.2015.1137710

Klionsky DJ, Sato K, (2466名中1840番目) et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy. 査読有 12(1):1-222. 2016 DOI: 10.1080/15548627.2015.1100356

Sakaguchi A, Sato M, Sato K, Gengyo-Ando K, Yorimitsu T, Nakai J, Hara T, Sato K, Sato K. REI-1 is a guanine nucleotide exchange factor regulating RAB-11 localization and function in *C. elegans* embryos. Dev. Cell. 査読有 35(2) 211-221. 2015 DOI: 10.1016/j.devcel.2015.09.013

Zhang H, Chang JT, Guo B, Hansen M, Jia K, Kovacs AL, Kumsta C, Lapierre LR, Legouis R, Lin L, Lu Q, Melendez A, O'Rourke EJ, Sato K, Sato M, et al. Guidelines for monitoring autophagy in *Caenorhabditis elegans*. Autophagy. 査読有 11(1):9-27. 2015. DOI: 10.1080/15548627.2014.1003478

Saegusa K and Sato K. Labeling of the Intestinal Lumen of *Caenorhabditis elegans* by Texas Red-dextran Feeding. Bio-Protocol. 査読有 5 (16):573, 2015 <http://www.bio-protocol.org/e1564>

Saegusa K, Sato M, Sato K, Nakajima-Shimada J, Harada A, Sato K. *C. elegans* chaperonin CCT/TRiC is required for actin and tubulin biogenesis and microvillus formation in intestinal epithelial cells. Mol Biol Cell. 査読有 25:20 3095-3104. 2014. DOI: 10.1091/mbc.E13-09-0530

佐藤美由紀, 佐藤健. 精子由来ミトコンドリアのオートファジーによる分解, 医学の歩み Vol.250, No.6&7, 479-482, 2014

Sato K, Norris A, Sato M. Grant BD. *C. elegans* as a model for membrane traffic. WormBook. 査読有 25:1-47. 2014. DOI: 10.1895/wormbook.1.77.2

[学会発表](計 23 件)

佐藤健, 佐藤美由紀. 受精と胚発生におけるメンブレントラフィックの新たな生理機能, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016.11.30, パシフィコ横浜

佐藤美由紀, 佐藤克哉, 戸村琴音, 佐藤健. オートファジーによる父性オルガネラの選択的分解を制御する分子メカニズム, 第 89 回日本生化学会大会, 2016.9.27, 仙台国際センター・東北大学川内北キャンパス

佐藤美由紀, 佐藤克哉, 戸村琴音, 佐藤健. 父性ミトコンドリアの選択的オートファジーを制御する分子メカニズム, 第 68 回日本細胞生物学会大会, 2016.6.17, 京都テルサ

佐藤健. RE1/SH3BP5 protein family: A new family of guanine nucleotide exchange factors for small GTPase Rab11, 第 68 回日本細胞生物学会年会, 2016.6.15, 京都テルサ

三枝慶子, 佐藤美由紀, 坂口愛沙, 原太一, 佐藤健. 線虫 *C. elegans* をモデルとして用いたリポタンパク質の生合成および分泌機構の解析, 第 89 回日本内分泌学会学術総会, 2016.4.21, 国立京都国際会館

三枝慶子, 佐藤美由紀, 坂口愛沙, 原太一, 佐藤健. Functional analysis of a cargo receptor homolog SFT-4 in *C. elegans*, N-Hybrid conference 2016, 2016.1.30, 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター

塚本智史, 伊林恵美, 和田彩子, 鬼頭靖司, 小久保年章, 原太一, 佐藤健, 南直治郎. GFP-Dcp1a トランスジェニックマウスを用いた生体内の Processing bodies の可視化, 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015.12.2, 神戸ポートアイランド

坂口愛沙, 佐藤美由紀, 安藤恵子, 佐藤克哉, 中井淳一, 前島郁子, 原太一, 依光朋宏, 佐藤健, 佐藤健. 受精前後における細胞内膜系リモデリングの時空間的制御機構, 第 38 回日本分子生物学会, 大 88 回日本生化学会合同大会, 2015.12.1, 神戸ポートアイランド

佐藤美由紀, 戸村琴音, 佐藤克哉, 佐藤健. 父性ミトコンドリア選択的オートファジーのメカニズム, 第 38 回日本分子生物学会, 大 88 回日本生化学会 合同大会, 2015.12.1, 神戸ポートアイランド

三枝慶子, 佐藤美由紀, 坂口愛沙, 原太一, 佐藤健. 線虫 *C. elegans* における積み荷受容体ホモログ SFT-4 の機能解, 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 2015.12.1, 神戸国際会議場

塚本智史, 原太一, 南直治郎, 佐藤健. 受精前後のマウス卵細胞質における脂肪滴の動態観察, 第 108 回 日本繁殖生物学会大会, 2015.9.19, 宮崎大学

小沼亮介, 坂口愛沙, 佐藤美由紀, 佐藤健. 線虫 *C. elegans* の卵母細胞において表層顆粒の生合成に異常を示す温度感受性変異株の解析, 第 67 回日本細胞生物学会大会, 2015.7.2, タワーホール船堀

佐藤美由紀, 戸村琴音, 佐藤克哉, 佐藤健. 父性ミトコンドリア選択的オートファジーのメカニズム, 第 67 回日本細胞生物学会大会, 2015.7.2, タワーホール船堀

三枝慶子, 佐藤美由紀, 坂口愛沙, 原太一, 佐藤健. 線虫 *C. elegans* における積み荷受容体ホモログ SFT-4 の機能解, 第 67 回日本細胞生物学会大会, 2015.6.30, タワーホール船堀

三枝慶子, 佐藤美由紀, 坂口愛沙, 原太一, 佐藤健. 線虫 *C. elegans* における積み荷受容体ホモログ SFT-4 の機能解, 第 67 回日本細胞生物学会大会 2015.6.30, タワーホール船堀

三枝慶子, 佐藤美由紀, 坂口愛沙, 原太一, 佐藤健. 線虫 *C. elegans* における積み荷受容体ホモログ SFT-4 の機能解, 第 1 回細胞生物若手の会シンポジウム, 2015.6.29, タワーホール船堀

Satoshi Tsukamoto, Taichi Hara, Ken Sato, Naojiro Minami, Seiji Kito, Toshiaki Kokubo. In vivo analysis of processing bodies using transgenic mice expressing GFP-Dcp1a, 15th International Congress of Radiation Research (ICRR2015), 2015.5.28, 京都国際会議場

坂口愛沙, 佐藤美由紀, 安藤恵子, 佐藤克哉, 中井淳一, 佐藤健. 低分子量 GTPase RAB-11 の新規結合因子 REI-1/REI-2 は受精後の RAB-11 再局在化を制御する, 日本分子生物学会年会, 2014.11.27, パシフィコ横浜

Miyuki Sato, Ryosuke Konuma, Kotone Tomura, Ken Sato. Dynamic Regulation of Autophagy and Endocytosis for Cell Remodeling during Early Development in *C. elegans*, 日本分子生物学会年会, 2014.11.25,

パシフィコ横浜

Aisa Sakaguchi, Miyuki Sato, Keiko Gengyo-Ando, Katsuya Sato, Junichi Nakai, Ken Sato. Novel binding partner of small GTPase RAB-11 regulates RAB-11 redistribution to Golgi after fertilization, *C. elegans* Development, Cell Biology, Gene Expression Meeting in association with The 6th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting, 2014.7.18, 奈良県新公会堂

①Miyuki Sato, Ryosuke Konuma, Katsuya Sato, Kotone Tomura, Ken Sato. Fertilization-induced K63-linked ubiquitination mediates clearance of maternal membrane proteins, *C. elegans* Development, Cell Biology, Gene Expression Meeting in association with The 6th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting, 2014.7.17, 奈良県新公会堂

②Keiko Saegusa, Miyuki Sato, Katsuya Sato, Taichi Hara, Akihiro Harada, Ken Sato. *C. elegans* chaperonin CCT/TRiC is required for actin biogenesis and microvillus formation in intestinal epithelial cells, the *C. elegans* Development, Cell Biology, and Gene Expression Topic Meeting in association with the 6th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting, 2014.7.16, 奈良県新公会堂

③坂口愛沙, 佐藤美由紀, 安藤恵子, 佐藤克哉, 中井淳一, 佐藤健. 線虫受精卵においてダイナミックに変化する RAB-11 の動態制御機構の解析, 日本細胞生物学会年会, 2014.6.12, 奈良県新公会堂・東大寺総合文化センター

〔図書〕(計 2 件)

佐藤健 他. 化学同人, メンブレントラフィック-膜・小胞による細胞内輸送ネットワーク, 2016, 262(214 - 225)

佐藤健 他. 南山堂, プロGRESSIVE 生命科学, 2014, 312(56 - 60)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
<http://traffic.dept.med.gunma-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 健 (SATO, Ken)
群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号 : 30311343

(2)研究分担者

原 太一 (HARA, Taichi)
群馬大学・生体調節研究所・准教授
研究者番号 : 00392374

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

()