

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19370094
 研究課題名（和文）
 細胞膜マイクロドメインを介する生殖細胞の相互作用と発生開始シグナルの分子機構
 研究課題名（英文）
 Roles of membrane microdomains in fertilization and activation of development
 研究代表者
 佐藤 賢一（SATO KEN-ICHI）
 京都産業大学・工学部・教授
 研究者番号：30235337

研究成果の概要（和文）：以下の成果について、学会発表や論文発表を行った。1）ウロプラキン III（UPIII）のマイクロドメイン局在機構と Src 活性制御機能、および精子プロテアーゼ反応機構の解明。2）RNA 結合タンパク質 hnRNP K のリン酸化と母性 mRNA 翻訳制御機構の連系の解明。3）ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼの機能解析。4）精子先体反応誘導物質 ARISX の性状解析。5）ほ乳類精子ファクターホスホリパーゼ Cζ の活性制御機構の解明。6）ヒト黒色腫細胞株を用いたがん細胞悪性形質発現機構の解析。

研究成果の概要（英文）：1) On uroplakin III (UPIII), its mechanism for localization to the membrane microdomain and for negative regulation of Src. 2) Phosphorylation of hnRNP K and its physiological relevance to translational control of maternal mRNAs. 3) PI3-kinase and Akt as important components for fertilization signaling. 4) Molecular function of ARISX as a carbohydrate-containing protein. 5) Molecular mechanism of an enzymatic regulation of phospholipase Cζ, a sperm factor in mammals, that involves partial proteolysis. 6) Importance of tyrosine phosphorylation of Stat3 in human melanoma cell lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,700,000	1,410,000	5,110,000
2008年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	17,070,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生物学

キーワード：受精、シグナル伝達、細胞膜マイクロドメイン、Src、ウロプラキン III

1. 研究開始当初の背景

私たちは脊椎動物のモデル生物として両生類無尾目アフリカツメガエル（以下、ゼノパス）を主に用い、受精成立の分子機構を明らかにすることを目的とした研究を行ってき

ています。私たちは研究当初から、卵活性化、特に精子による卵細胞内の一過的なカルシウム濃度上昇という受精成立に普遍的な現象の起動メカニズムに焦点を充てた解析を行ってきました。この流れでの私たちの主

な研究成果は、受精直後に活性化される卵内チロシンキナーゼ Src の発見にはじまり、カルシウム濃度上昇の引き金としての Src 依存的な膜脂質分解酵素ホスホリパーゼ C γ 活性化の同定、配偶子相互作用とそれに引き続く Src チロシンキナーゼシグナリングの場としての卵細胞膜マイクロドメインの同定、そして卵細胞膜マイクロドメインに局在し卵表面層で精子プロテアーゼの標的として、また、受精卵内において Src によるチロシンリン酸化を受けるタンパク質として同定された uroplakin III の機能解析です。このように研究の焦点は、卵活性化シグナルから卵細胞膜に、特定の遺伝子産物の解析から細胞内微小環境のような場、あるいはシステムの解析へと次第にシフトしてきており、配偶子相互作用・融合も視野に入ってきています。この状況のもと、私は受精機構の生物学的意義の理解をさらに飛躍的に高めることを目的とした研究計画を立案し研究活動を遂行・先導することにより、本研究分野での知的財産の構築と人材育成に貢献したいと考えました。

2. 研究の目的

(1) 変異型 UPIII や Src を発現する卵母細胞の調製、受精能獲得 (卵成熟) と受精/卵活性化の解析: 受精に関与する細胞膜近傍の分子群は、母性タンパク質として未成熟卵母細胞の時点ですでにタンパク質発現の完了したものが多く、RNAi などの遺伝子発現レベルでのノックダウン法の有効性が低い。そこで変異型タンパク質 (例: 精子プロテアーゼによる切断を受けない、あるいは Src リン酸化部位を失った UPIII 分子) を発現する RNA を注入した卵母細胞を調製し、その卵成熟や受精/卵活性化への影響を解析する。変異体タンパク質の動物培養細胞での発現再構成も並行して行ない、細胞内局在やシグナル伝達などの分子機能、相互作用因子などの比較解析なども行なう。

(2) 精子および卵の細胞膜マイクロドメインにおける配偶子相互作用/膜融合因子の探索: 予備的な実験結果から、精子及び卵の細胞膜マイクロドメイン上のタンパク質 (卵 UPIII を含む) がプロテアーゼによって部分分解を受けることが受精成立に必要であると考えられる。そこで、精子プロテアーゼ処理、およびその疑似処理 (精製したプロテアーゼによる) によって切断を受けるタンパク質を網羅的に分子同定し、その生理的意義を追究する基盤データとする。

(3) 受精前後および初期胚細胞周期でリン酸化状態の異なる RNA 結合タンパク質 hnRNP K による母性 mRNA 翻訳制御の解析: 特異的抗体を用いた免疫沈降実験などから、hnRNP K が受精後数分間にチロシンリン酸化を受けること、セリンリン酸化は逆に受精後減少し、初期胚

の分裂期で再充進すること、さらにはこれらのリン酸化状態に依存して RNA との結合能が上下することなどがわかっている。そこでこの RNA 結合タンパク質が受精前後において特異的に結合/解離している母性 mRNA 群を特定し、その翻訳制御への関与と標的 mRNA から発現するタンパク質自身の生理機能を明らかにする。

(4) ゼノパス受精関連因子の他種における分子同定、受精および初期発生への関与の探索: 細胞膜近傍で配偶子相互作用や卵活性化シグナル伝達に関与する生体分子群に焦点を充て、遺伝子クローニング、免疫化学的同定、特異的機能阻害剤/活性化剤などのアプローチを通じて、多種の動物の受精や初期発生における関与を比較解析する。卵活性化のシグナル伝達が一過的なカルシウム濃度上昇を伴う生物はすべて実験モデルとなりえ、国内研究者との連携を中心とする広範な共同研究体制で臨む。対象分子は Src、UPIII、ホスホリパーゼ C (γ と ζ)、CD9 (以上、膜タンパク質性分子)、コレステロール、GM1 ガングリオシド (以上、膜機能高分子) などを想定した。

3. 研究の方法

(1) 卵細胞における変異遺伝子発現実験系の確立: 標的遺伝子はチロシンキナーゼ Src (野生型、恒常的活性化型、不活性化型) と精子プロテアーゼ受容体 UPIII (野生型、細胞外プロテアーゼ分解耐性型、細胞内チロシンリン酸化部位変異型) の計 6 種類とし、すでに変異の導入、発現プラスミドの構築、そして mRNA の調製を終えている。実験は卵巣摘出、十分に成育した未成熟卵母細胞の選別、臙胞細胞層の手作業による除去、マイクロインジェクション法による mRNA の導入 (Drummond 社 NANOJECT II)、プロゲステロン処理によるインビトロ卵成熟処理、成熟卵の人工着色、着色済卵のレシピエント雌ゼノパスの卵腔への導入、同雌ゼノパスによる着色卵の産卵、精子などによる卵活性化処理、変異タンパク質の発現と機能の評価、という諸段階の流れで行う。この方法は "oocytes transfer" と呼ばれ、実験を成立させる上で重要、かつ難易度の高い作業である。培養細胞発現系による変異タンパク質の機能評価: 卵細胞の実験と並行して、ヒト 293 細胞をいいて行なう。変異タンパク質は適当なタグ (例: FLAG) との融合タンパク質として一過的に発現させ、特異抗体 (例: 抗 FLAG 抗体) による免疫沈降を中心として酵素活性 (インビトロキナーゼアッセイ)、細胞内局在 (細胞分画、間接免疫染色: Olympus 社 FV300 システム)、分子間相互作用 (共沈降)、シグナル伝達機能 (細胞内カルシウム濃度上昇など) などを評価する。

(2) 細胞膜マイクロドメインの MS 解析: ゼノパスの受精において、精子由来のプロテア

一ゼ活性が配偶子間相互作用と膜融合、そして卵活性化反応の引き金として働いていることが示唆されていたが、私たちが同定した卵細胞膜マイクロドメイン局在性の分子UPIIIはその活性の標的であることが示された。一方で、精子プロテアーゼがUPIII以外の卵細胞膜および精子自身の細胞膜表面の複数のタンパク質を切断する可能性、およびそれらが受精成立に関与する可能性が極めて高い。そこで、そのようなプロテアーゼ標的分子群をMS/MS（質量分析：外注）法により網羅的に同定し、受精に伴う配偶子細胞膜上のダイナミックなプロテオーム変移像としてとらえるとともに、個々の分子の機能を明らかにしていくための方向性（遺伝子クローニング、タンパク質発現実験）を探る。

（3）受精に伴うタンパク質リン酸化と母性mRNAの翻訳制御の連系の解析：これまでの実験から、RNA結合タンパク質hnRNP Kが受精後にチロシンリン酸化（Srcによる）およびセリン脱リン酸化（MAPキナーゼ部位）を受け、そのことに伴いhnRNP KのRNA結合能が減少し、翻ってhnRNP Kによって翻訳抑制を受けていた母性mRNAの翻訳活性が上昇することが示唆されている。そこで未受精卵hnRNP Kに特異的に結合し翻訳抑制を受けている母性mRNAを、hnRNP Kの特異的な免疫沈降、RNA抽出、当該RNAを鋳型とするcDNA合成、ライブラリ化、シーケンシング（Applied Biosystems 3100型シーケンサー）の流れで同定する。同定された配列を持つRNA分子が、実際にhnRNP Kに結合しているかについては特異的なRT-PCR実験により検証し、当該mRNAが翻訳制御されている可能性については、結合している全長mRNAの非翻訳領域を欠損した変異型RNAを作成し検証する。

（4）受精関連因子群の種特異性と普遍性の解析の準備：計画全期間を通して、このような多種多様なモデル生物を扱う諸研究者達と協力を請い、ゼノパス受精シグナル伝達の解析から同定された諸機能因子群の遺伝子・タンパク質レベルでの有無、タンパク質チロシンリン酸化反応のカルシウムシグナリングの上流因子としての作動の有無を、特異抗体や特異的活性阻害剤／活性化剤、カルシウムイメージングなどの実験を通して明らかにしていくための準備としたい。

4. 研究成果

（1）細胞膜マイクロドメインを介する生殖細胞の相互作用の分子機構

これまでの研究から、単一膜貫通型蛋白質ウロプラキン III（以下、UPIII）が卵細胞膜マイクロドメインに局在し、その細胞外ドメインが受精に伴う精子プロテアーゼ作用の標的の1つとして働くこと、および細胞内チロシン残基が受精に伴い活性化されるチロ

シンキナーゼ Src によりリン酸化を受けること、などが明らかにされていた。今回、細胞膜マイクロドメインに局在することが知られている糖脂質 GM1 ガングリオシドが、卵細胞表面でUPIII と共局在していること、UPIII と物理的に会合していること、そして、外来性の GM1 を培地中に添加した環境下で受精が阻害されること、などが明らかとなった。GM1 はさらに、試験管内における精子依存的マイクロドメイン Src の活性化に対しても阻害効果を持った。これらのことは、UPIII と GM1 の複合体が受精における配偶子間相互作用に重要な役割を持っていることを示唆している。

ほ乳類細胞システムにおいて、UPIII はテトラスパニン型蛋白質ウロプラキン Ib と物理的に会合し、細胞膜に局在する機能を獲得していることが報告されている。これまでに、ツメガエル卵においても、UPIII-UPIb 複合体は存在することが示されていたが、その生理的意義は明らかではなかった。今回、293 細胞を用いた遺伝子発現系において、UPIII の細胞膜マイクロドメイン局在性に UPIb の共発現が必要であることが明らかとなった（図 1）。また 293 細胞において、単独で発現させたチロシンキナーゼ Src は活性型として存在する一方、UPIII/UPIb と共発現させた Src は不活性型となることが明らかとなった。これらのことは、UPIII の細胞膜マイクロドメインへの局在には、UPIb との会合による局在性の獲得と、そのことによるチロシンキナーゼ Src の負の（および正の？）活性制御への関与という 2 つの生理的意義があることが示唆された。

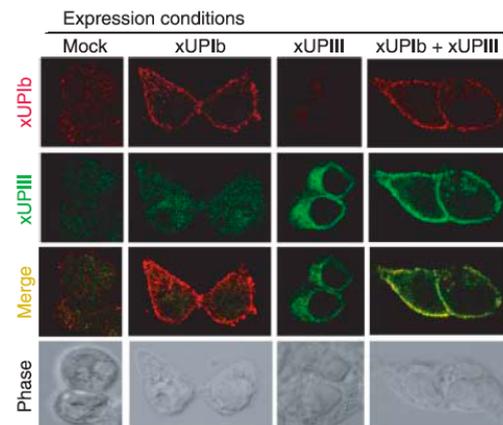


図 1 : UPIII の UPIb 依存性の細胞膜局在メカニズム

UPIII の細胞外ドメインに結合する抗体は、受精を阻害する。これは、先述の精子プロテアーゼ作用が抗体により妨げられたためと考えられる。今回、同じ抗体で前処理を受けた卵を、あらかじめ単離した細胞膜マイクロド

メインで前処理した精子で受精させると、受精率が回復することが明らかとなった。この効果は、細胞膜マイクロドメインをあらかじめUPIII抗体で処理しておくこととキャンセルされることから、細胞膜マイクロドメインのUPIIIが精子に何らかの作用を及ぼしていることが想定される。以上から、精子プロテアーゼによって切断を受けたUPIIIの細胞外ドメイン断片が、精子に対してリガンドのような働きをしている可能性があり、現在検証中である。UPIIIの細胞内チロシン残基リン酸化の生理的意義についても、予備的ではあるが興味深いデータが得られた。チロシンリン酸化部位に相当するリン酸化合成ペプチドをあらかじめ微小注入した卵は、受精に伴う卵活性化のシグナルである表層顆粒の収縮反応を示すものの、収縮反応後に異常な形態変化を示し第1分裂が起こらないことがわかった。非リン酸化合成ペプチドにはそのような効果が見られなかった。このことから、UPIIIのリン酸化チロシンを含む細胞内ドメインは、受精に伴う、特に細胞内カルシウム濃度上昇のあとのイベントの実行において、何らかの役割を持つものと考えられる。現在、リン酸化型合成ペプチドに特異的に結合する卵細胞内タンパク質の探索を行っている。

(以上、*Genes Cells* 2007 ; *Open Biochem J.* 2008 ; *Methods* 2010 および未発表データ)

また、共同研究によってツメガエル精子の先体反応の分子メカニズムに関する研究において論文発表を1件行った。(*Dev Growth Differ* 2007)

なお、当初計画にあった oocyte transfer 法による変異型タンパク質の卵細胞での発現とその機能評価、および質量分析をベースとする細胞膜マイクロドメイン局在性タンパク質の網羅的な分子同定は、十分な成果が得られていない状況にあり、さらに数年の研究続行が必要である。

(2) アフリカツメガエル卵細胞の初期発生機構におけるリン酸化と翻訳制御機構の連係：RNA 結合タンパク質 hnRNP K (heterogenous nuclear ribonucleoprotein K) の機能解析を行なった。その結果、この分子が受精に伴いチロシンリン酸化とセリン・スレオニン脱リン酸化を同時に受けていること、そしてそのことにより hnRNP K の RNA 結合能が正または負に制御されていることが明らかとなった (図2)。HnRNP K と結合して

Unfertilized egg		Fertilized egg	
Src:	inactive	Src:	active
MAPK:	active	MAPK:	inactive
hnRNP K:	mRNA-bound	hnRNP K:	mRNA-unbound
	Translationally inactive		Translationally active

図2 : hnRNP K のリン酸化と翻訳制御の連係

いる母性 mRNA は翻訳抑制を受け、その結合の解除は翻訳活性化につながると考えられる。未受精卵における hnRNP K 結合性の母性 mRNA を免疫沈降法により複数同定し、その卵活性化に伴う結合度の変化をとらえることができた。今後はそれら母性 mRNA の卵及び初期胚における局在性や翻訳されたタンパク質の機能を明らかにしていく予定である。

(以上、*Dev Growth Differ* 2008)

(3) 細胞膜マイクロドメインを介する生殖細胞の発生開始シグナルの分子機構：PI3 (phosphatidylinositol 3) キナーゼの特異的阻害剤 LY294002 をあらかじめ注入したツメガエル卵では、精子依存的な諸事象：チロシンキナーゼ Src の活性化 (図3)、細胞内カルシウム濃度の一過的な上昇、Mos プロテインキナーゼおよびサイクリンBの分解、MAP キナーゼの脱リン酸化、および第1卵割、のすべてが完全あるいはほぼ完全に抑制されることが明らかとなった。これらの結果は、PI3 キナーゼの活性が卵活性化に必要な事を示すとともに、PI3 キナーゼが、精子と卵の相互作用と融合の直後に卵細胞内で活性化され、カルシウム濃度の一過的な上昇の引き金となるホスホリパーゼ C γ の活性化に働くチロシンキナーゼ Src の上流因子として位置づけられる事を示唆している。

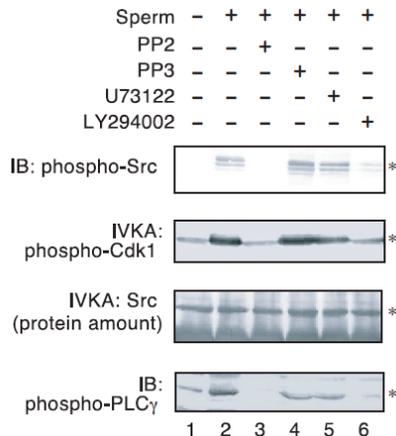


図3 : PI3K 阻害剤 LY294002 による受精シグナル伝達の阻害

PI3 キナーゼ p85 サブユニット (以下、p85) は受精直後2分という早い時間帯で、細胞膜マイクロドメインに局在変化する事が明らかとなった。これまでの研究から、ツメガエル卵の細胞膜マイクロドメインは、精子受容とその後のチロシンキナーゼシグナル伝達の場合として働く事が示されている。このことから、今回の結果は、PI3 キナーゼと Src の機能的な相互作用を示唆するものとして興味深い。一方、p85 は受精卵においてチロシンリン酸化が亢進していないという結果も示されている。このことから、PI3 キナーゼ

が Src の活性化因子であるいっぽうで、Src から PI3 キナーゼへのシグナル伝達は機能的ではない事が示唆される。

受精に伴う PI3 キナーゼ活性化の指標として、プロテインキナーゼ Akt の活性化状態の検討が行った。活性化型 Akt の主要なリン酸化部位であるセリン 478 とスレオニン 308 をそれぞれ特異的に認識する抗体を用いた解析から、受精卵においてスレオニン 308 のリン酸化が選択的に亢進している事が示された。このリン酸化は LY294002 処理を受けた受精卵では観察されなかった。また、リン酸化型 Akt が p85 と同様に細胞膜マイクロドメインに局在する事、この局在変化もまた LY294002 により抑制を受ける事も明らかになった。これらから、ツメガエル卵の受精に伴い PI3 キナーゼと Akt の活性化が連続的に起こり、細胞膜マイクロドメインを足場として卵活性化シグナル伝達に関与している可能性が示唆された。

PI3 キナーゼと逆の酵素反応を触媒する PTEN の特異的阻害剤 bp(V) によって、未受精卵に卵活性化様の諸反応 (Src の活性化、卵の表層収縮) が起こる事、そしてそれらの反応が、LY294002 存在下では抑制を受ける事、が明らかとなった。このことは、人為的な PI3 キナーゼ酵素反応産物 PIP3 の蓄積自体が卵活性化シグナルとして働きうる事を示している。さらに試験管内酵素アッセイで、Src が PIP3 によって直接活性化を受ける事が示された。(Open Biochem J 2008 ; BMC Dev Biol 2009 ; Methods 2010、未発表データ)

なお、共同研究により、ほ乳類精子ホスホリパーゼ C ζ の作用機構に関する論文発表を 1 件、およびヒト悪性皮膚がん細胞の増殖機構について、Src 基質/転写因子 Stat3 の生理機能に関する論文発表を 1 件行った。(Dev Biol 2007 ; J Biol Chem 2009)

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 8 件)

- ① Tokmakov AA, Iwasaki T, Sato K, Fukami Y. (2010) Analysis of signal transduction in cell-free extracts and rafts of *Xenopus* eggs. *Methods* Jan 13. [Epub ahead of print] (査読あり)
- ② Mammadova G, Iwasaki T, Tokmakov AA, Fukami Y, Sato K. (2009) Evidence that phosphatidylinositol 3-kinase is involved in sperm-induced tyrosine kinase signaling in *Xenopus* egg fertilization. *BMC Dev Biol.* **9**, 68. (査読あり)
- ③ Oka M, Sumita N, Sakaguchi M, Iwasaki T, Bito T, Kageshita T, Sato K, Fukami Y, Nishigori C. (2009) 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate inhibits melanoma growth by inactivation of STAT3 through protein kinase C-activated tyrosine phosphatase(s). *J. Biol. Chem.* **284**, 30416-30423. (査読あり)
- ④ Sato K. (2008) Signal transduction of fertilization in frog eggs and anti-apoptotic mechanism of human cancer cells: common and specific function of membrane microdomains *Open Biochem J.* **2**, 49-59. (査読あり)
- ⑤ Iwasaki T, Koretomo Y, Fukuda T, Paronetto MP, Sette C, Fukami Y, Sato K. (2008) Expression, phosphorylation, and mRNA-binding of heterogeneous nuclear ribonucleo- protein K in *Xenopus* oocytes, eggs, and early embryos. *Dev Growth Differ.* **50**, 23-40. (査読あり)
- ⑥ Kurokawa M, Yoon SY, Alfandari D, Fukami K, Sato K, Fissore RA. (2007) Proteolytic processing of phospholipase C ζ and $[Ca^{2+}]_i$ oscillations during mammalian fertilization. *Dev Biol.* **312**, 407-418. (査読あり)
- ⑦ Ueda Y, Imaizumi C, Kubo H, Sato K, Fukami Y, Iwao Y. (2007) Analysis of terminal sugar moieties and species-specificities of acrosome reaction-inducing substance in *Xenopus* (ARISX). *Dev Growth Differ.* **49**, 591-601. (査読あり)
- ⑧ Mahbub Hasan AK, Ou Z, Sakakibara K, Hirahara S, Iwasaki T, Sato K, Fukami Y. (2007) Characterization of *Xenopus* egg membrane microdomains containing uroplakin Ib/III complex: roles of their molecular interactions for subcellular localization and signal transduction. *Genes Cells.* **12**, 251-267. (査読あり)

[学会発表] (計41件)

国際会議などでの招待講演、口頭発表：4件

- ① Ken-ichi Sato、Roles of membrane microdomain-associated Src and uroplakin III in fertilization of eggs and anti-apoptosis of cancer cells、International Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation、2008年11月16日、台湾・台南・台南大学

国内外におけるセミナー、学会などでの口頭・ポスター発表：37件

- ② 佐藤賢一、受精卵およびがん細胞におけるチロシンリン酸化シグナル伝達機構、神戸大学研究環重点研究チーム学術講演会、2010年3月12日、神戸・神戸大学
- ③ 佐藤賢一、Analysis of gamete interaction and signal transduction in *Xenopus laevis* by using isolated egg membrane microdomains, iEMD、日本分子生物学会年会ワークショップ、2009年12月10日、横浜・パシフィコ横浜
- ④ 佐藤賢一、チロシンリン酸化が制御するツメガエル卵の細胞機能：受精成立のシグナル伝達機構、奈良先端科学技術大学院大学ワークショップ、2008年9月29日、生駒・奈良先端科学技術大学院大学
- ⑤ 佐藤賢一、Signal transduction at fertilization focusing on egg membrane microdomains: Partial proteolysis of uroplakin III and activation of the tyrosine kinase Src、日本生化学会・分子生物学会合同大会、2007年12月12日、横浜・パシフィコ横浜

[図書] (計1件)

- ① 佐藤賢一 (分担執筆) 宮戸健二、岡部勝 (編纂) 「顕微鏡活用なるほど Q&A - 意外に知らない基礎知識 + 一步進んだ観察のコツもつかめる!」羊土社 (2009年1月発行) 担当ページ: 57-60、167-170、195-197

[その他]

ホームページ等

www.kyoto-su.ac.jp/department/bio/kyoin/sato/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 賢一 (SATO KEN-ICHI)

京都産業大学・工学部・教授

研究者番号：30235337

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし