

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770199

研究課題名（和文）受精と連動した細胞外マトリックスの分泌を制御するメカニズム

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of synchronous exocytosis of extracellular matrices after fertilization

研究代表者

佐藤 美由紀 (SATO MIYUKI)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：70321768

研究成果の概要（和文）：申請者らは線虫 *C. elegans* において、受精と連動して細胞外マトリックスがエキソサイトーシスされる現象を見出し、それを制御する因子として低分子量GTPase・RAB-11を同定した。また、RAB-11が排卵直前の卵母細胞で一過的に細胞外マトリックスを運ぶ分泌顆粒に局在をシフトする現象も観察している。そこで RAB-11の細胞内局在や活性を制御する機構を明らかにするため、RAB-11と相互作用する因子を酵母Two-Hybrid法により探索したところ、分泌顆粒上に局在する新規因子REI-1を同定した。REI-1はヒトなどほ乳類にも保存された因子であったことから、基本的な機能を担っていると推察された。

研究成果の概要（英文）：We have found that the small GTPase RAB-11 is required for cortical granule exocytosis after fertilization which delivers essential extracellular matrices. Furthermore, GFP::RAB-11 accumulates transiently on the cortical granules during ovulation. To understand how the localization and/or activity of RAB-11 are developmentally regulated, we looked for RAB-11-binding proteins by yeast two-hybrid screening. We identified a new RAB-11-binding protein named REI-1. REI-1 is highly conserved among metazoans, implying its fundamental role.

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
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：発生細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：受精，細胞外マトリックス，エキソサイトーシス，*C. elegans*

1. 研究開始当初の背景

卵母細胞は受精によって全能性を獲得し接合子へと変化する（oocyte-zygote transition）。このとき、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、細胞質成分やそこに存在するオルガネラ、細胞膜、さらには細胞外微小環境も一連の現象に連動して劇的に変化する。申請者らは遺伝学的解析が可能なモデル生物である線虫 *C. elegans* の生殖腺において、様々なタンパク質を緑色蛍光タンパク質（GFP）

で標識し、それらの細胞内動態と生殖腺の発生との関連を生きた個体内で解析してきた(図1)。その中で、線虫のカベオリン(CAV-1)が非常にユニークな挙動を示すことを見出した(Sato, et al., 2006)。線虫の卵母細胞においてはCAV-1-GFPは直径1-2 μmの新規の細胞内区画(CAV-1 bodyと命名)に蓄積する。CAV-1 bodyは受精直後に細胞周期依存的に細胞膜と一斉に融合することから、これまで線虫では記述のなかった表層顆粒であると考えられた。さらに表層顆粒(CAV-1 body)の生理的役割を明らかにするため、表層顆粒によって輸送される積み荷を探索したところ、コンドロイチンプロテオグリカンやムチン様糖タンパク質などの一群の細胞外マトリックス成分を同定した(Sato, et al, 2008)。線虫においては、コンドロイチンプロテオグリカンの合成酵素の変異が初期胚の細胞分裂を阻害することが報告されており(Hwang, et al., 2003; Mizuguchi, et al., 2003)、胚発生における細胞外マトリックスの重要性が示されている。申請者らは、表層顆粒のエキソサイトーシスを阻害するとやはり初期胚の細胞分裂に異常を生じることを明らかにし、受精とその後の細胞周期によって時空間的に厳密に制御された細胞外マトリックスの輸送が発生に必須であることを示した。

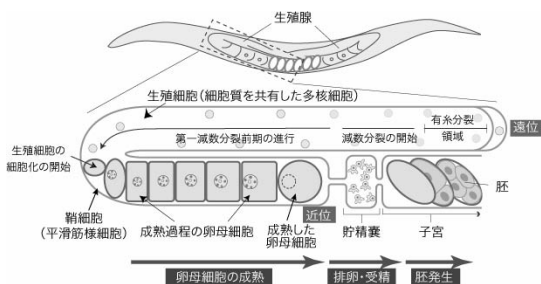


図1. 線虫の生殖腺の模式図。

これまで細胞内輸送の研究は、培養細胞などシンプルなモデル系を用いてその基本的な分子メカニズムが解明されてきた。申請者らの動物個体を用いた研究は、個体内においては発生などにより物質輸送が時空間的に厳密に制御されていることを示しているが、その制御機構は全くわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、受精に伴った細胞外マトリックスの分泌の分子メカニズムについて、(1)輸送の分子装置と(2)発生と輸送を時空間的に連動させるシグナリング経路を解明することを目指す。申請者らは表層顆粒の細胞膜への融合には、低分子量 GTPase・RAB-11が関与していることを見いだしており、膜融

合の時間的制御が RAB-11 の活性化やエフェクターのレベルによって調節されている可能性が高い。そこでまず RAB-11 と相互作用する因子を探索し、RAB-11 の活性調節に関わる因子やエフェクターの同定を行う。さらに候補因子の生体内での役割を解析するとともに、様々な変異体や個体における RNAi を用いた解析からシグナリング経路との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Yeast Two-hybrid 法を用いた RAB-11 結合因子の探索

受精と連動したエキソサイトーシスを制御する因子として低分子量 GTPase である RAB-11 を見出している。Rab ファミリーはメンブレントラフィックの各ステップで重要な役割を果たすことが知られており、CAV-1 body のエキソサイトーシスのメカニズムを明らかにする上で、Rab GTPase cycle の調節機構と下流のエフェクター分子の同定が非常に重要であると考えられるが、現時点ではそれらは全くわかっていない。そこで、RAB-11 GDP 型、または RAB-11 GTP 型に結合する因子を線虫 cDNA ライブラリーから Yeast Two-hybrid 法を用いて同定する。

(2) 同定した RAB-11 結合因子の機能解析

1 で同定した因子について、RNAi によるノックダウンを行い、その表現型を解析する。また、それら因子の卵母細胞や受精卵における細胞内局在を明らかにする。

(3) RNAi が *rab-11* RNAi と類似の表現型を示す遺伝子の探索

線虫のゲノムワイド RNAi ライブラリーを用いて、*rab-11* RNAi と類似の表現型を示す遺伝子を探索する。それにより、RAB-11 の上流または下流で働く因子の同定を目指す。

4. 研究成果

(1) RAB-11 は受精直前に表層顆粒に一過的に局在する

これまで RAB-11 については、生育中の卵母細胞において卵黄受容体のリサイクリングを制御し、GFP-RAB-11 も主に卵母細胞の細胞膜直下のリサイクリングエンドソームに局在することを示していた(Grant and Hirsh, 1999; Sato, et al, 2008)。ところが興味深いことに、排卵直前の成熟した卵母細胞ではこの RAB-11 の細胞膜直下の局在が消失し、

CAV-1 body 上への一過的な集積が観察される。この観察は、発生の時期特異的に RAB-11 の局在と機能がシフトすることを示している。また、線虫においては卵母細胞は減数分裂前期で一時休止し、受精後に減数分裂が再開・完了する。減数分裂の進行を止めると表層顆粒のエキソサイトーシスはブロックされるが、RAB-11 の局在変化は影響されなかった。この結果から、RAB-11 の局在変化の後、さらに細胞周期に依存した活性化のステップが存在すると考えられた。

(2) Yeast Two-hybrid 法を用いた RAB-11 結合因子の同定

RAB-11 GDP 型、または RAB-11 GTP 型を用いて Yeast Two-hybrid 法により線虫 cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、複数の候補因子を同定した。そのうちのひとつである REI-1 は、新規 RAB-11 結合タンパク質であり、RAB-11 GDP 型に特異的に結合したことから、エフェクターというよりは RAB-11 の上流で活性化を制御する因子である可能性が考えられた。また、REI-1 は RAB-5、RAB-7 などその他の RAB ファミリーとは結合しなかったことから、RAB-11 特異的な結合因子と考えられた。REI-1 は一次配列からはその機能は不明であったが、哺乳類にも広く保存された因子であった。また、線虫ゲノム上にはホモログ (REI-2) がひとつ存在していた。

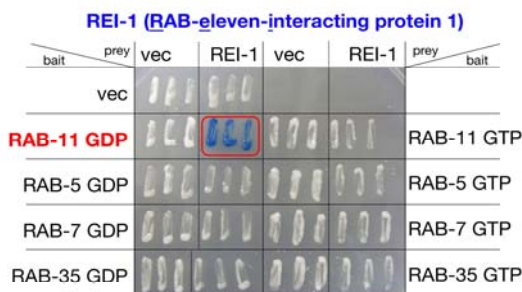


図2. REI-1はRAB-11GDP型に特異的に結合する。

(3) REI-1 は表層顆粒に局在する

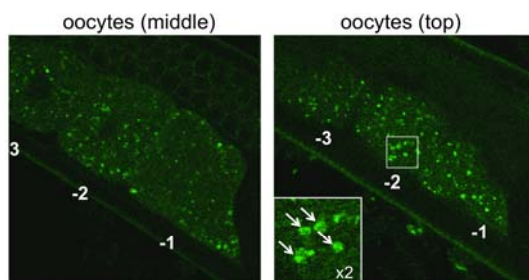


図3. GFP-REI-1を卵母細胞で発現したところ、成育中の卵母細胞ですでに表層顆粒(矢印)に局在していた。

REI-1 の細胞内局在を調べるため、GFP-REI-1 を卵母細胞で発現する形質転換体を作成した。REI-1 は膜貫通領域を持たないにも関わらず、GFP-REI-1 は卵母細胞内の表層顆粒に局在していた (図3)。また、RAB-11 の場合と異なり、REI-1 は生育中の卵母細胞内ですでに表層顆粒に局在化していたことから、RAB-11 よりも前に小胞上に局在すると考えられた。現在抗 REI-1 抗体を作成し、内在性タンパク質の局在の確認を行っている。

(4) *rei-1* の機能阻害の表現型

REI-1 の機能を調べるため、RNAi によるノックダウンを行ったが、卵母細胞の生育や胚発生には顕著な表現型を示さなかった。また、表層顆粒のエキソサイトーシスにも大きな変化が見られなかった。理由としては、RNAi の効果が十分でない、または *rei-2* が重複した機能を担っているため単独のノックダウンでは表現型が得られない可能性が考えられた。そこで、完全な機能破壊を行うため、*rei-1* 破壊株の作製を進めている。

(5) 表層顆粒のエキソサイトーシスに必要な新規因子の同定

線虫のゲノムワイド RNAi ライブラリーを用いて、*rab-11* RNAi と類似の表現型を示す遺伝子を探索した。現在ライブラリーの一部のスクリーニングを完了し、その中で RNAi を行うと表層顆粒のエキソサイトーシスが阻害される遺伝子 *cgex-3* を同定した。この遺伝子も機能未知の新規遺伝子であったが、哺乳類にも広く保存されていた。この遺伝子の RNAi を行うと、表層顆粒のエキソサイトーシスが強く阻害され、また胚性致死を引き起こした。一方で、GFP-RAB-11 の表層顆粒への局在化は起こっていたことから、RAB-11 の下流で働く因子であることが示唆された。

本研究により、受精と連動したエキソサイトーシスを制御する可能性のある新規因子の同定に成功した。また、これら因子は線虫

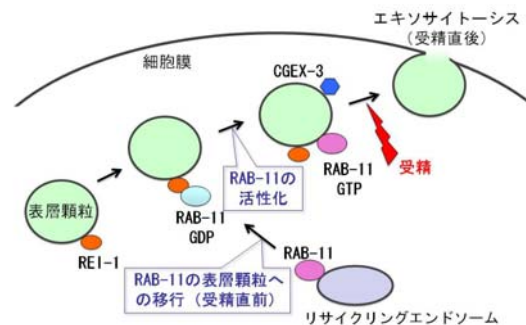


図4. 受精と連動した表層顆粒のエキソサイトーシスの制御

のみならず、哺乳類にも保存された因子であった。これら因子に関しては今後さらに詳しく機能解析を行い、その働きを明らかにする予定である。

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1件)

①Sato K, Ernstrom G, Watanabe S, Weimer RM, Chen CH, Sato M, SiddiquiA, Jorgensen EM, and Grant BD, Differential requirements for clathrin in receptor-mediated endocytosis and maintenance of synaptic vesicle pools, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.106, 2009, p1139-1144, 査読あり

[学会発表] (計5件)

①井上汐里, 佐藤美由紀, 佐藤克哉, 嶋田淳子, 原田彰宏, 佐藤健, 線虫*C. elegans*の腸細胞における極性形成過程の時空間的解析, 第33回日本分子生物学会 年会, 2010.12.7, 神戸国際会議場 (兵庫県)

②Sato K, Grant BD, and Sato M, Rab11 is required for synchronous secretion of chondroitin proteoglycans after fertilization in *Caenorhabditis elegans*, 第4回 East Asia *C. elegans* Meeting, 2010.7.12, 国立オリンピック記念青少年総合センター (東京都)

③Sato K, Ernstrom G, Watanabe S, Weimer RM, Chen CH, Sato M, SiddiquiA, Jorgensen EM, and Grant BD, Differential requirements for clathrin in receptor-mediated endocytosis and maintenance of synaptic vesicle pools, 第62回日本細胞生物学会 大会, 2010.5.20, 大阪国際会議場 (大阪府)

④三枝慶子, 佐藤美由紀, 佐藤克哉, 嶋田淳子, 原田彰宏, 佐藤健, 線虫*C. elegans*のシヤペロニンは腸細胞における微絨毛の形成維持に重要である, 第32回日本分子生物学会年会, 2009.12.12, パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑤佐藤健, 佐藤美由紀, 線虫 *C. elegans* において受精前後の膜ダイナミクスを制御する低分子量GTPase, 第82回日本生化学会大会, 2009.10.23, 神戸国際会議場 (兵庫県)

[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 美由紀 (SATO MIYUKI)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：70321768