

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月10日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23880008

研究課題名：初期胚発生特異的ホスファチジルイノシトール3キナーゼ活性制御タンパク質の探索

研究課題名：Regulation of early embryonic PI3K activity: Implication of non-canonical PI3K interacting molecules and their roles in embryonic cellular functions

研究代表者

亀井 宏泰 (KAMEI HIROYASU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任研究員

研究者番号：00610362

研究成果の概要（和文）：本研究では、初期胚の品質とホスファチジルイノシトール3キナーゼ\*（以下 PI3K）活性がどのように連動し、どのような分子がそこに関与するか調べる為、主にゼブラフィッシュ胚やマウス胚性幹細胞を用いた解析を行った。まず PI3K 触媒サブユニットの各サブタイプ（p110 $\alpha$  および  $\beta$ ）の特異的阻害剤を用いた実験から、胚発生のごく初期においては p110 $\beta$  の活性化が重要であることが示された。またマウス胚性幹細胞を用いた実験系において p110 $\beta$  と結合する分子群の解析を行った。その結果、数種類の新たな p110 $\beta$  結合分子群を見出した。現在、新たに同定された分子が PI3K の活性や胚の品質管理にどのような意味を持つのか更に詳しく調べている。

## 用語説明

\*ホスファチジルイノシトール3キナーゼ (PI3K)：細胞の生存に必須であり、同時に細胞増殖や分化、細胞運動にも重要な働きをもつことが知られているシグナル伝達タンパク質。重要な生体膜脂質であるホスファチジルイノシトールをリン酸化する酵素として知られている。

研究成果の概要（英文）： Embryonic development is orchestrated by numerous growth factors and cytokines, including insulin-like growth factors. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) operates as a pivotal node in their cellular signaling cascades. Albeit its physiological relevance and importance is well acknowledged, little is known about the regulatory mechanisms of PI3K in early stages of embryogenesis. Here we examine the regulation of early embryonic PI3K by utilizing zebrafish embryo and mouse embryonic stem cell (mESC) models. Pharmacological blockade of PI3K activity in zebrafish embryo showed that the early embryonic PI3K particularly in the developmental stage preceding zygotic gene expression was prerequisite for embryonic survival whereas the inhibition at subsequent organogenesis stages caused developmental delay without causing severe lethality. In addition, the p85-bound PI3K activities in early zebrafish embryos were not limited simply by the p85 protein level nor by its bound phospho-tyrosine level. These data imply a previously unknown PI3K regulatory mechanism(s) in early embryogenesis which is important for embryonic survival. Indeed, LC-MS/MS analysis of p110 PI3K catalytic subunit immunoprecipitated from mESC lysate revealed several novel p110 $\beta$  associating molecules. Based on these results, we proposed an “embryo specific” PI3K regulatory mechanism, which is regulated by previously unknown PI3K-associated proteins.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用分子細胞生物学

キーワード：発生

### 1. 研究開始当初の背景

卵子や初期胚の品質維持は、高品質な水・畜産資源の効率的供給のみならず、希少動物の人工繁殖やヒトの不妊治療など、多くの応用的観点から重要であることは言うまでもない。しかし、これらの品質を評価する指標や品質を向上させる技術に関する研究は、受精卵の生存や胚発生の進行をアウトプットとした現象論的なデータの集積が主流で、分子機構論的な検討が容易ではないこともあって、立ち後れている。近年、マウスを用いた遺伝学的研究から、PI3K 活性の制御を介して受精卵の生存や胚発生の進行が可能となることが明らかにされつつあるが、初期胚の細胞において、どのような生体分子群が、どのように PI3K の働きが制御されているのかについては明確な知見が得られていなかった。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、多産で胚体操作が容易であるゼブラフィッシュ胚を実験材料として、まず初期胚に含まれる PI3K に相互作用する分子群を部分精製し、高感度質量分析法を用いてこれらの分子を同定することを目指す。これが達成できれば、次にゼブラフィッシュ胚の実験系によりこれらの分子群が初期胚の PI3K 活性制御と胚発生進行に及ぼす役割を明らかにすることを目指す。そして、この成果を哺乳類を含めた多くの動物種の胚の品質管理機構を全く新しい観点から明らかにする為のスタートとすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

初期胚の品質と PI3K 活性がどのように連動し、どのような分子がそこに関与するか調べる為、本研究では大きく分けて下記の3つの解析によりしらべることとした。

①様々な低分子化合物を用いて時期特異的 PI3K 活性の阻害、また PI3K 活性や PI3K 遺伝子の発現動態の定量

②免疫共沈降法と高感度質量分析法等を組み合わせた生化学的方法による PI3K 結合因子の探索と同定

③ゼブラフィッシュ受精卵を用いた発生の分子機能検証実験

これらの方法により PI3K 結合分子の同定と機能解析を行い、これを通じて初期胚の PI3K 活性制御機構の解明を目指すこととした (図1)。また、マウス胚性幹細胞の実験系もゼブラフィッシュの実験系と平

行して進め、上記と同様な解析を行うことで、広く脊椎動物の胚性幹細胞における PI3K の機能調節分子の働きを探ることも試みた。

図1. 本研究のアプローチ

ゼブラフィッシュ初期胚を用いたPI3K関連分子群の探索とその機能解析



### 4. 研究成果

本研究では、初期胚の品質とクラス-I PI3K 活性がどのように連動し、どのような分子がそこに関与するか調べる為、主にゼブラフィッシュ胚を用いた解析を行った。まずゼブラフィッシュ初期胚におけるクラス-I PI3K の時期特異的活性化を調べたところ、クラス-I PI3K の下流にある細胞内シグナル伝達経路の活性化は胚発生が体節形成期に入る頃から顕著になるがそれ以前の発生段階においては微弱な活性化しか認められないことが分かった。また、p110 クラス-I PI3K 触媒サブユニットの各サブタイプ ( $\alpha$ および $\beta$ ) の特異的阻害剤やPI3K

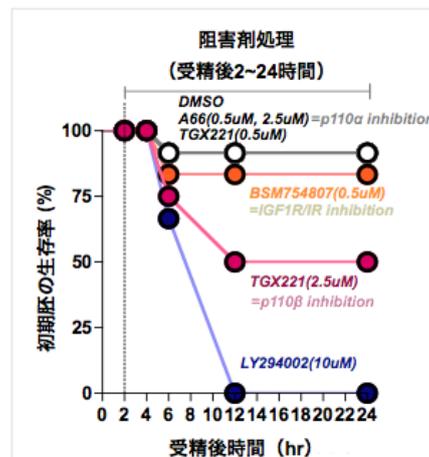


図2. 異なる濃度のPI3K阻害剤で処理した際のゼブラフィッシュ胚の生存率の変化。特にp110 $\beta$ の阻害剤と全PI3K分子に対する阻害剤を用いた場合に 顕著な生存率の低下が認められた。

の活性化を促す代表的な成長因子の一つであるインスリン様成長因子の受容体に対する阻害剤（全PI3Kに対する阻害剤：LY294002；PI3K-p110 $\alpha$ 触媒サブユニットに対する阻害剤：A66；PI3K-p110 $\beta$ 触媒サブユニットに対する阻害剤：TGX-221；インスリン様成長因子の受容体に対する阻害剤：BMS754807）で発生中の胚を処理した所、胞胚期中期以前に、特に全PI3K および p110 $\beta$ の阻害剤を用いた場合においてのみ胚の生存率の顕著な低下が認められた（図2）。その為、特に胚発生のごく初期における個体の生存に対してPI3K、特に触媒サブユニットとしてp110 $\beta$ をもつPI3Kの活性化が重要であることが示唆された。続いて、共免疫沈降法と高感度質量分析法等を組み合わせた生化学的方法により、ゼブラフィッシュ p110 $\beta$ 結合分子の探索を試みた。研究を開始した当初、ゼブラフィッシュのp110 $\beta$ 分子を特異抗原として認識する抗体は市販されていなかったため、本研究では、まず入手可能な哺乳類のp110 $\beta$ 分子に対する抗体を用いて免疫沈降実験を行った。しかし、残念ながら入手可能な市販の哺乳類の p110 $\beta$ に対する抗体はゼブラフィッシュ p110 $\beta$ を効率的に免疫沈降できなかった。その為、ウサギを用いてゼブラフィッシュ p110 $\beta$ を特異的に認識可能なポリクローナル抗体の作製を試みた。これまでに、高感度に抗原ペプチドを認識可能な抗血清が得られており、引き続き実験を行っている。今後は更にこの抗血清を材料により特異的な抗体分子をアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製し実験に用いる予定である。また、Flag-タグを人工的に付

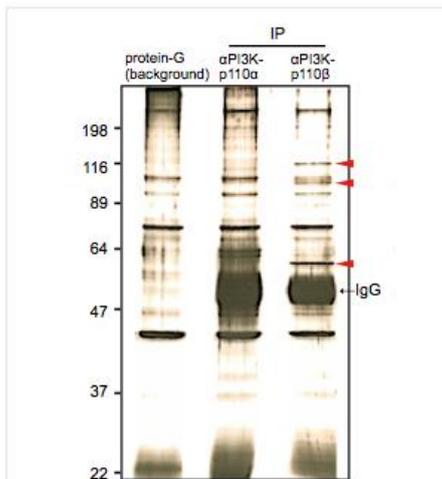


図3. マウス胚性幹細胞の抽出物を用いた免疫沈降実験の結果。二つの異なるPI3K触媒サブユニット分子（p110 $\alpha$ および $\beta$ ）に対する抗体で免疫沈降を行った。赤い矢頭で示すバンドはp110 $\beta$ 抗体を用いた免疫沈降に特異的に検出される。

与したゼブラフィッシュp110 $\beta$ を過剰発現できる人工RNAをin vitroで合成しこれを受精直後のゼブラフィッシュ胚に注入、Flag-ゼブラフィッシュp110 $\beta$ を初期胚で過剰発現させた。現在、このようにして得られた初期胚の抽出物より抗Flag抗体を用いた免疫沈降実験により回収できる分子群の同定を行っているところである。また、方法でも少し述べたが、当初の研究計画には無かった初期胚の培養細胞系のモデルとしてマウス胚性幹細胞を用いた実験系も導入して解析を進めた。未分化状態であることが確認されたマウス胚性幹細胞から細胞破碎液を調整し、p110抗体を用いた上記と同様の解析に供した。その結果、数種類のp110 $\beta$ 結合分子群を見出した（図3）。次に、これらの分子とp110 $\beta$ の結合が、胚性幹細胞特異的に観察されるものであるかどうかを成熟マウスの組織（脳、心臓、肺、脾臓、肝臓、膵臓、腎臓、脂肪、骨格筋、および精巣）の各細胞破碎液をp110 $\beta$ 抗体を用いた免疫沈降に供して調べた。その結果、少なくとも新たに同定したp110 $\beta$ 結合分子のうち、少なくとも二つの分子は初期胚特異的にp110 $\beta$ と複合体を形成していることが明らかとなった（図4）。

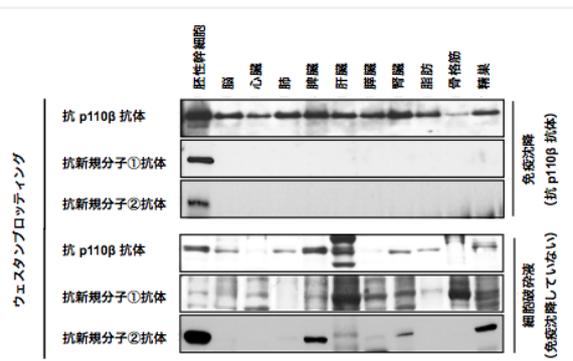


図4. 胚性幹細胞および成熟マウスの各組織抽出液の免疫沈降-ウェスタンプロット実験の結果。胚性幹細胞の抽出物特異的に本研究で新たに同定したp110 $\beta$ 結合分子はp110 $\beta$ と複合体を形成していることが分かる。

これらの分子はこれまでに細胞の基礎代謝の調節や転写調節因子として特定の遺伝子の発現に関与するもの、また、細胞のシグナル伝達の調節に関わるものとして知られているが、いずれもPI3K結合分子としては報告が無い為、この複合体の結合様式や生理機能機能に関しては全く知見がない。引き続き、本研究で明らかとなった新規p110 $\beta$ 結合因子がPI3Kの酵素活性にどのような影響を持つのか、また、その複合体が胚の品質管理にどのような意味を持つのか、現在さらに詳しく解析中である。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

1. Hiroyasu Kamei 他、Regulation of early embryonic PI3K activity: Implication of non-canonical PI3K interacting molecules and their roles in embryonic cellular functions. In Gordon Research Conference: Insulin like growth factors in physiology and disease. 2013年03月17日～2013年03月22日, Ventura, CA, USA

[その他]

ホームページ等

<http://ig.nms.ac.jp/department/epidemiology.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井 宏泰 (KAMEI HIROYASU)

東京大学・大学院農学生命科学研究

科・特任研究員

研究者番号：00610362

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し