

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840083

研究課題名(和文) 減数分裂におけるカルシニューリンシグナル経路の役割と普遍性の解明

研究課題名(英文) Roles of calcineurin signaling pathway during meiosis in Drosophila and mice

研究代表者

武尾 里美 (TAKEO, Satomi)

筑波大学・生命領域学際研究センター・助教

研究者番号：10642100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、減数分裂など生殖細胞ではたらく特別なプロセスの普遍性や多様性を生み出す分子機構を解明することを目的として、マウスとショウジョウバエを用いた遺伝子機能解析をおこなった。ショウジョウバエにおいて卵活性化時の減数分裂の進行に必須であることが知られているカルシニューリン(CN)とGSK-3は、マウスでは配偶子融合や多精拒否反応に参与する可能性が示唆された。また、他の多くの生物で共通してみられる、卵活性化時のCa²⁺濃度の上昇がショウジョウバエでも保存されていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：To understand the generality and diversity of the molecular mechanisms which regulate the function of germline cells among species, we performed functional analyses of genes using mice and Drosophila. In Drosophila, Ca²⁺-dependent phosphatase calcineurin and glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) play essential roles in meiotic progression upon egg activation. We found that in mice these molecules are involved in sperm-oocyte fusion and block to polyspermy. In addition, we demonstrated the first evidence for a wave of increased Ca²⁺ during egg activation in Drosophila.

研究分野：分子発生生物学

キーワード：カルシニューリン GSK-3 受精 卵活性化 減数分裂 マウス ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

多くの脊椎動物では、精子の侵入により細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇し、第二分裂中期停止が解除される。 Ca^{2+} のエフェクターとしては、 Ca^{2+}/CaM 依存性リン酸化酵素である CaMKII が知られ、その下流のシグナル伝達経路なども幅広く解析されている。カルシニューリン (CN) もまた Ca^{2+} によって活性化される蛋白質であり、アフリカツメガエル卵では受精時に活性化されることが報告されている。しかし、哺乳類での機能や基質を含む下流のシグナル経路は特定されていない。

一方、ショウジョウバエの成熟卵母細胞は、輸卵管を通して排卵される際に活性化され減数分裂を完了する。つまり、精子の侵入とは関係なく卵が活性化される。ところが、排卵という刺激によって Ca^{2+} 濃度が上昇するのか、またその下流で脊椎動物と同様なシグナル伝達経路がはたしているのかという点については全く明らかになっていない。私はショウジョウバエを用いた研究により、CN とその活性化因子である Sra (哺乳類の RCAN) が卵活性化後の減数分裂の進行に必須であることを明らかにした。また、プロテオミクス解析と遺伝学的解析により、glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) が Sra のリン酸化を介して CN を活性化することを見出した。

2. 研究の目的

(1) マウス卵での発現・機能解析:

動物種により多様な減数分裂システムを制御する分子機構の普遍性を解明することを目的として、ショウジョウバエの減数分裂にの再開・完了に必須である CN、GSK-3 の発現と機能をマウスを用いて解析する。

(2) CN シグナル伝達経路の機能と調節機構の解析: ショウジョウバエを用いて、また CN シグナル伝達経路の機能と調節機構を

詳細にし、また卵活性化を制御する分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス卵での発現・機能解析: RT-PCR、ウエスタンブロット法により、CN、RCAN、GSK-3 遺伝子の発現や蛋白質の存在を確認した。また、特異的阻害剤を用いて体外培養もしくは体外受精をおこない、卵成熟や受精への影響を調べた。

(2) CN シグナル伝達経路の機能と調節機構の解析: ショウジョウバエを用い、卵活性化前後の Sra 蛋白質のリン酸化状態を詳細に解析した。また、GCaMP や GFP-aequorin を用いて、卵母細胞の Ca^{2+} イメージングをおこなった。

4. 研究成果

(1) マウス卵での発現・機能解析: 発現解析により、CN、RCAN、GSK-3 のいずれもマウス卵子に存在することを見出した。また、体外受精実験によって CN 阻害剤が卵子と精子の融合をブロックすることを発見した。卵子と精子の接着や、CD9 や Izumo1 など融合に関連する分子の局在は CN 阻害剤によって影響を受けないことから、卵子と精子が融合するための膜上での何らかの最終プロセスが阻害されていることが考えられた。

一方、GSK-3 阻害剤処理では多精受精が引き起こされることがわかった。そこで、精子のみの阻害剤処理や融合実験などをおこない、卵子、精子への影響をそれぞれ検証した。その結果、GSK-3 阻害剤が精子の超活性化運動能や先体反応の活性化を亢進することで多精受精をひきおこすことを示唆する結果を得た。さらに、GSK-3 α ノックアウトマウスの表現型解析をおこない、雄不妊となること、精子の体外受精での受精率が低下することが明らかとなった。

以上の結果は、これらの分子がショウジョウバエとは異なり受精や精子機能を制御するという、遺伝子の機能の多様化を示すものである。

(2) CN シグナル伝達経路の機能と調節機構の解析：卵形成過程では CN が Sra の脱リン酸化を調節することで、GSK-3 β と拮抗する機能を持つという、より複雑なシグナル伝達のクロストークやフィードバック機構の存在を示唆するデータを得た。また、Ca²⁺ イメージングにより排卵された成熟卵で Ca²⁺ 濃度の一過的な上昇が確認できた。この結果は、他の多くの生物で共通して知られる Ca²⁺ の上昇がショウジョウバエでも保存されていることを示した初めての証拠である。

本研究は、ショウジョウバエで機能する分子が哺乳類の生殖細胞でも機能するか？という疑問からスタートしたものであり、分子機能の普遍性と多様性を知るといふ広い視点を含んでいる。種で多様な生殖様式が存在する中で、同じ配偶子形成、受精、卵活性化という目的を果たすために、それぞれの生物がどのような分子機構を利用しているかを解明していくことは、進化学的にも興味深い。

今後は、生殖に関する基本的理解を深めるだけでなく、多精受精により受精卵を作製することが困難なブタなど家畜の生産技術への貢献や、ヒトの不妊治療への応用性も検討しながら、より発展的な研究に結びつくように進めていきたい。

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)

(1) Kaneuchi T, Sartain CV, Takeo S, Horner VL, Buehner NA, Aigaki T, Wolfner

MF.

Calcium waves occur as *Drosophila* oocytes activate.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 査読有, Vol. 112, No. 3, 2015, pp.791 - 796, DOI: 10.1073/pnas.1420589112

[学会発表](計 2 件)

(1) 武尾里美、馬場忠

Possible roles of calcineurin and GSK-3 in fertilization of the mouse oocyte.

新学術領域研究「動植物に共通するアロ認証機構の解明」第 8 回領域会議、2014 年 01 月 08 日～2014 年 01 月 10 日、名古屋大学東山キャンパス野依記念学会館

(2) 田中千晶、武尾里美、馬場忠

マウス卵活性化での GSK-3 の機能

第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 03 日～2013 年 12 月 05 日、神戸ポートアイランド

[図書](計 0 件)

[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：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.acroman.org/>

<http://www.biol.se.tmu.ac.jp/lab0.asp?l>

[D=celgen](#)

6．研究組織

(1) 研究代表者

武尾 里美 (TAKEO, Satomi)

筑波大学・生命領域学際研究センター・

助教

研究者番号：10642100