

卵母細胞の形成と成熟に伴う 膜マイクロドメインの機能構築

平成 26 年 4 月 25 日受付

佐藤賢一*
井尻貴之*

要旨

アフリカツメガエル *Xenopus laevis* 卵の受精成立にかかわる分子機構を明らかとすることを目的として、卵の細胞膜マイクロドメイン (MD) および MD 局在分子の生理機能に関する研究を行った。その結果、未受精卵から単離した MD 画分には精子との相互作用能とそのことによる受精シグナル伝達反応 (精子依存的なチロシンキナーゼ Src の活性化, ウロプラキン III の部分消化とチロシンリン酸化) の再構成能があること, そしてこの未受精卵 MD の機能は卵巣内で実行されるホルモン依存的な卵成熟反応にともない構築されることを明らかにした。

キーワード: アフリカツメガエル, 受精, 配偶子間相互作用, 卵成熟, 膜マイクロドメイン

はじめに

両生類無尾目のアフリカツメガエル (学名 *Xenopus laevis*) は脊椎動物の実験モデルとして受精やその後のさまざまな発生過程の研究に広く用いられている。わたしたちはこれまでにアフリカツメガエル卵の受精にともない卵細胞膜に存在するチロシンキナーゼ Src が活性化され, その後の発生開始反応 (卵活性化という) に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた^{1~4)}。また, アフリカツメガエル卵の細胞膜中にはコレステロールや糖脂質ガングリオシドが比較的濃縮された微小領域が存在し, そこにチロシンキナーゼ Src や精子受容体のひとつと考えられているウロプラキン III (UPIII) が局在していることもわかっている^{5~10)}。今回, 未受精卵から調製した膜マイクロドメイン (以下, UF-MD) を用いてその精子との相互作用を検討するとともに, 卵形成過程の異なる段階にある卵細胞から調製した MD (未成熟卵母細胞 GV-MD, ホルモン処理により卵成熟を終えた卵母細胞 MII-MD) を用いた同様の実験をおこなった。その結果, 卵成熟が単離 MD, ひいては卵 MD に精子受容能を付与する機構として働いていることを示唆する結果を得ることができた。

*京都産業大学総合生命科学部

材料と方法

アフリカツメガエルは清水実験動物から購入し、摂氏 21 度前後の環境下で飼育した。カエル用麻酔剤、コラゲナーゼ、アデノシン 3 リン酸 (ATP)、各種阻害剤 (「結果と考察」参照) などをはじめとする研究試薬は和研薬株式会社、ナカライテスク株式会社などから購入した。雌のカエルからの未成熟卵母細胞の調製、そのホルモン処理 (プロゲステロンによる卵成熟)、未受精卵の調製 (排卵誘起ホルモンの投与および採卵)、雄カエルからの精巢の摘出と精子懸濁液の調製、各種卵細胞試料からの MD (ショ糖密度勾配超遠心分離法により得られる低密度かつ界面活性剤に不溶性の膜画分) の調製、MD を用いた精子との相互作用 (人工受精実験系における UPIII 特異抗体との競合作用) 及びシグナル伝達反応の再構成実験 (精子依存的なチロシンキナーゼ Src の活性化、ウロプラキン III の部分消化とチロシンリン酸化) などはこれまでに報告した方法に基づいておこなった^{1~8)}。

結果と考察

1. 未受精卵 MD (UF-MD) を用いた受精シグナル伝達反応の再構成

UF-MD と精子懸濁液を混合しマグネシウムイオンと ATP 存在下で反応させた (図 1D)。UF-MD に存在する UPIII の部分消化反応とチロシンリン酸化, ならびに Src のチロシンリン酸化が観察される (図 1A)。また, 人工受精実験系で阻害効果をもつ抗 UPIII 細胞外ドメイン抗体 (図中では UPIII-ED 抗体) をこの反応系に入れておくと, これらのシグナル伝達反応は阻害を受ける (図 1A)。同様の反応は精子のかわりに精製したカテプシン B プロテアーゼを用いる場合にも見られる (図 1B)。この精子およびカテプシン B 依存的な MD 画分中の Src のリン酸化反応は, UPIII-ED 抗体以外にも PP2 (チロシンキナーゼ阻害剤), GDP β S (GTP 結合タンパク質阻害剤), LY294002 (イノシトールリン脂質キナーゼ阻害剤), メチル β シクロデキストリン (コレステロール阻害剤) によっても顕著な阻害を受けた (図 1C)。これらのことから, UF-MD に精子との相互作用能があること, そしてその相互作用を引き金として受精初期のシグナル伝達反応が試験管内で再構成できることが明らかとなった。

2. 未受精卵 MD と精子の相互作用が人工受精実験系に与える影響

図 1 に示した実験結果から得られた知見「精子と単離した UF-MD は相互作用する」について, 人工受精実験系を使って別の角度から検証することにした。未受精卵に UPIII の細胞外ドメインに結合する抗体 (UPIII-ED 抗体) をあらかじめ与えてインキュベーションしておくと, 卵表面の UPIII がブロックされ, その後に人工受精をおこなったときの受精率の低下を引き起こす (図 2A, B, D)。そこで, UPIII-ED 抗体と精子をあらかじめ混合インキュベーションしておき, その混合物を未受精卵に与えてさらにインキュベーションをおこなった (図 2C)。その後, 人工受精をおこなったところ UPIII-ED 抗体のみでインキュベーションした場合に比べて受精率の回復が見られた (図 2D)。このことから UF-MD に存在する UPIII には UPIII-ED 抗体と相互作用する能力を保持されている

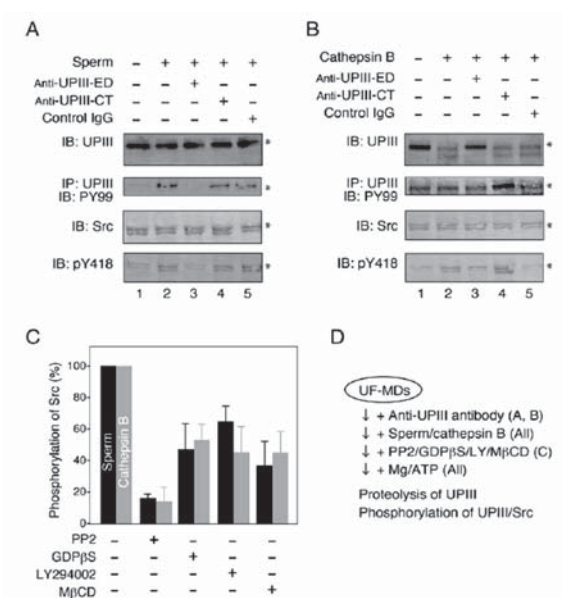


図1 未受精卵から単離した膜マイクロドメイン (UF-MD) を用いた受精シグナル伝達反応の試験管内再構成

ことが示唆された。次に精子と UF-MD を混合する実験をおこなった。この実験条件下では精子単独で受精をおこなったときに比べ受精率の低下が見られるのではないかと当初は予想した (図 2E)。しかし、そのような効果は見られず (図 2F), くわえて予想外なことに、あらかじめ UPIII-ED 抗体で処理しておいた未受精卵に精子と UF-MD の混合液をくわえると、精子単独のときに比べて受精率が回復することがわかった (図 2F)。このことから精子が UF-MD と相互作用すると何からの働きが UF-MD から、おそらくは UF-MD 上の UPIII に依存するかたちでもたらされ、精子が未受精卵の表面にある UPIII が抗体でブロックされていても受精できるようになるしくみがあるらしいということが示唆された。

3. 未成熟卵母細胞 MD (GV-MD) を用いた受精シグナル伝達反応の再構成

さいごに卵形成過程において未受精卵よりも手前の段階にある卵試料を使い、これまでに見てきた MD の受精関連機能が卵形成過程のどこで獲得されるのかを検証することにした。雌の個体の卵巣内にある、十分に細胞成長をとげた未成熟卵母細胞とそのホルモン処理により調製した成熟卵母細胞のそれぞれから MD を単離し (未成熟卵母細胞: GV-MD, 成熟卵母細胞: MII-MD), 図 1 でおこなった受精シグナル伝達反応の試験管内再構成実験 (図 3A), 未受精卵抽出液中のマッピングキナーゼの試験管内脱リン酸化アッセイ (図 3B: 受精後に起こる卵細胞質内シグナル伝達反応の一つ), そして図 2F でおこなった UPIII-ED 抗体でブロックされた未受精卵に対する精子受精能の回復実験の 3 つの実験 (図 3C) をおこなった。その結果, MII-MD に UF-MD と同等の受精関連機能が見られる一方

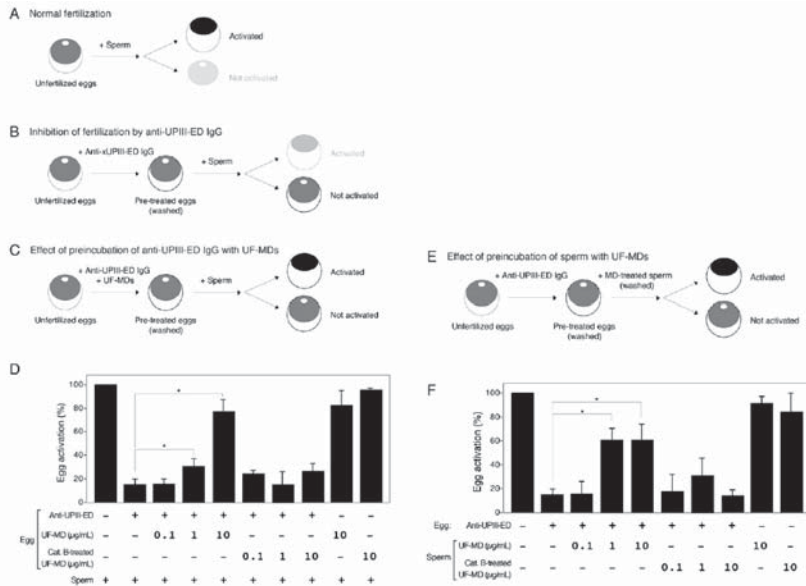


図2 人工受精実験系による精子と UF-MD の相互作用の検証

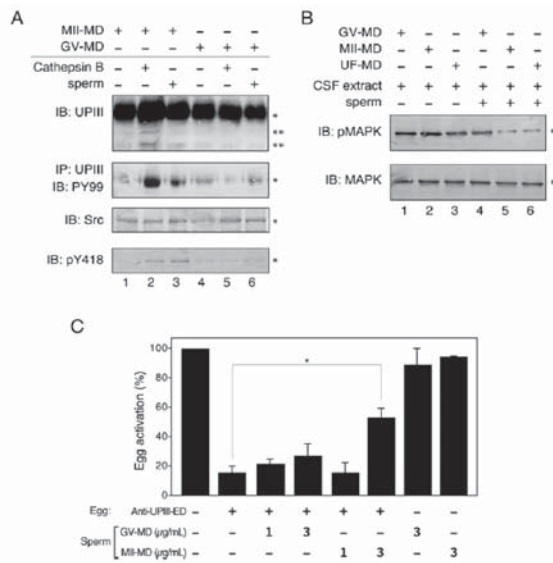


図3 未成熟卵母細胞およびホルモン処理による成熟卵母細胞から単離した MD 画分の各種アッセイの結果

で、GV-MD には見られないあるいはきわめて弱い活性しかないということがわかった。このことから UF-MD に備わっている精子相互作用能やシグナル伝達反応再構成能は卵成熟により獲得される生理機能であることが示唆された。

まとめ

今回得られた実験結果から、アフリカツメガエル卵の MD に存在する UPIII-*Src* システムは、卵成熟過程によって精子相互作用能と受精シグナル伝達能を獲得し受精成立に貢献していることが示唆された。このほかに、卵 MD の作用により精子側にもプロテインキナーゼの関与を伴う質的な変化が生じることや UPIII-*Src* システムをヒト培養細胞に強制発現により再構成することによっても精子と相互作用する MD 画分を調製することが可能であるなどの結果もわたしたちの研究結果として得られている。精子と卵の間で受精の瞬間に、すなわち両配偶子が細胞膜レベルでコンタクトする瞬間に、双方向性のシグナルのやり取りが交わされ、その後の膜融合と発生開始に貢献していることは他の動物種¹¹⁻¹³⁾あるいは植物種¹⁴⁻¹⁵⁾においても次第に明らかにされつつある。本研究成果はその意味でアフリカツメガエルにおける特殊なシステムを明らかにしたというよりは、動植物の受精機構の普遍性と進化の解明に資するものと考えている。

参考文献

1. Sato K, Iwao Y, Fujimura T, Tamaki I, Ogawa K, Iwasaki T, Tokmakov AA, Hatano O, Fukami Y. (1999) Evidence for the involvement of a *Src*-related tyrosine kinase in *Xenopus* egg activation. *Dev Biol.* 209 (2) :308-320.
2. Sato K, Tokmakov AA, Iwasaki T, Fukami Y. (2000) Tyrosine kinase-dependent activation of phospholipase C γ is required for calcium transient in *Xenopus* egg fertilization. *Dev Biol.* 224 (2) :453-469.
3. Sato K, Ogawa K, Tokmakov AA, Iwasaki T, Fukami Y. (2001) Hydrogen peroxide induces *Src* family tyrosine kinase-dependent activation of *Xenopus* eggs. *Dev Growth Differ.* 43 (1) :55-72.
4. Sato K, Tokmakov AA, He CL, Kurokawa M, Iwasaki T, Shirouzu M, Fissore RA, Yokoyama S, Fukami Y. (2003) Reconstitution of *Src*-dependent phospholipase C γ phosphorylation and transient calcium release by using membrane rafts and cell-free extracts from *Xenopus* eggs. *J Biol Chem.* 278 (40) :38413-38420.
5. Sato K, Iwasaki T, Ogawa K, Konishi M, Tokmakov AA, Fukami Y. (2002) Low density detergent-insoluble membrane of *Xenopus* eggs: subcellular microdomain for tyrosine kinase signaling in fertilization. *Development.* 129 (4) :885-896.
6. Sakakibara K, Sato K, Yoshino K, Oshiro N, Hirahara S, Mahbub Hasan AK, Iwasaki T, Ueda Y, Iwao Y, Yonezawa K, Fukami Y. (2005) Molecular identification and characterization of *Xenopus* egg uroplakin III, an egg raft-associated transmembrane protein that is tyrosine-phosphorylated upon fertilization. *J Biol Chem.* 280 (15) :15029-15037.
7. Mahbub Hasan AK, Sato K, Sakakibara K, Ou Z, Iwasaki T, Ueda Y, Fukami Y. (2005) Uroplakin III, a novel *Src* substrate in *Xenopus* egg rafts, is a target for sperm protease essential for fertilization. *Dev Biol.* 286 (2) :483-492.
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 (2) :251-267.
9. Sato K, Fukami Y, Stith BJ. (2006) Signal transduction pathways leading to Ca^{2+} release in a vertebrate model system: lessons from *Xenopus* eggs. *Semin Cell Dev Biol.* 17 (2) :285-292.

10. Mahbub Hasan AK, Fukami Y, Sato K. (2011) Gamete membrane microdomains and their associated molecules in fertilization signaling. *Mol Reprod Dev.* 78 (10-11) :814-830.
11. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. (2005) The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature.* 434 (7030) :234-238.
12. Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A. (2008) The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105 (35) :12921-12926.
13. Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. (2014) Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature.* 2014 Apr 16. doi: 10.1038/nature13203. [Epub ahead of print]
14. Mori T, Kuroiwa H, Higashiyama T, Kuroiwa T. (2006) GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization. *Nat Cell Biol.* 8 (1) :64-71.
15. Sprunck S, Rademacher S, Vogler F, Gheyselinck J, Grossniklaus U, Dresselhaus T. (2012) Egg cell-secreted EC1 triggers sperm cell activation during double fertilization. *Science.* 338 (6110) :1093-1097.

Egg membrane microdomains-associated uroplakin III-Src system becomes functional during oocyte maturation and is required for bidirectional gamete signaling at fertilization in the frog *Xenopus laevis*

Ken-ichi SATO
Takashi W. IJIRI

Abstract

In the African clawed frog *Xenopus laevis*, sperm-egg interaction promotes partial proteolysis and/or tyrosine phosphorylation of uroplakin III (UPIII) and the tyrosine kinase Src (Src), both of which localize to the cholesterol-enriched egg membrane microdomains (MDs). Here we show that sperm promote the proteolysis and/or tyrosine phosphorylation of UPIII and Src in the MDs that are isolated from ovulated and unfertilized eggs (UF-MDs). An antibody against the extracellular domain of UPIII interferes with these events. On the other hand, the inhibitory effect of anti-UPIII antibody on normal fertilization is canceled by co-incubation with UF-MDs. These results suggest that the isolated UF-MDs are capable of interacting with sperm as MDs in the intact eggs do. However, this interaction does not interfere with normal fertilization, but rather augments the ability of sperm to fertilize eggs that are pretreated with the anti-UPIII antibody. This unexpected effect of UF-MDs on sperm requires UPIII function in the UF-MDs and protein kinase activity in sperm. We also found that MDs that are isolated from progesterone-treated mature oocytes, but not ovarian immature oocytes, are similarly functional as UF-MDs. Taken together, we propose a model that structural and functional competency of the UPIII-Src signaling system in MDs is strictly regulated in the course of oocyte maturation and subsequently in sperm-mediated egg activation and fertilization.

Keywords : African clawed frog, fertilization, gamete interaction, membrane microdomains, oocyte maturation

