

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24年 4月25日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580340

研究課題名（和文）哺乳動物卵における細胞骨格再配置の意義とこれに関わるシグナル伝達経路の解明

研究課題名（英文）Studies on Physiological Significance of Cytoskeleton Redistribution in the Mammalian Eggs and Its Signal Transduction Pathways

研究代表者

鈴木 裕之（SUZUKI HIROYUKI）

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：50211313

研究成果の概要（和文）：哺乳動物卵母細胞の成熟過程における細胞骨格の機能について検討した。ミトコンドリアの再配置に関わる微小管とマイクロフィラメントの役割が間期と M 期で異なることを解明した。モータータンパク質であるミオシンとキネシンの卵成熟中の動態を明らかにした。さらに、中間径線維ケラチン、ビメンチンおよびネスチンの動態も示した。そして、細胞周期因子である cdc2 ならびに MAP キナーゼキナーゼ阻害、あるいは Rho キナーゼ阻害の影響を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Function of cytoskeleton in the mammalian oocytes during maturation was examined. Results revealed that microfilaments and microtubules may be differently involved in the mitochondrial redistribution according to the interphase and M-phase of the cell cycle. Dynamics of the motor proteins, myosin and kinesin, during oocyte maturation was also clarified. Furthermore, the distributional changes of intermediate filament proteins keratin, vimentin and nestin were shown. Effects of the specific inhibitors of the cell-cycle regulating factors cdc2 and MAP kinase kinase or Rho kinase inhibition on the cytoskeletal architecture were evaluated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：家畜繁殖学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・（応用動物科学）

キーワード：哺乳動物，卵母細胞，卵成熟，細胞骨格，シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1)卵の減数分裂，受精ならびに卵割，そして細胞分化と細胞増殖・停止を含む発生・分化過程においては，それぞれに対応したシグナルがあり，細胞骨格の再配置を伴う変化が起こる。体細胞においては 1990 年代に入って

から，Rho ファミリー低分子量型 GTP 結合タンパク質などのシグナル伝達機構によるアクチン線維制御の研究が飛躍的に進展した (Hall, 1998)。また，最近では Rho-mDia 経路が微小管の再配置に関与する可能性が示唆されている (Yasuda et al., 2004)。しかし，哺乳

動物卵におけるシグナル伝達機構に関する情報は乏しく、アクチン線維以外の微小管や中間径線維のシグナル制御についてはほとんど知られていない。

(2)一方、MPFとMAPキナーゼ活性が上昇すると、核膜が崩壊して染色体が凝集し、微小管からなる紡錘体が形成される(Brunet and Maro, 2005)。これらの細胞周期制御機構と前述の分子スイッチによるシグナル伝達機構との相互作用についてはまったく検討されていない。

2. 研究の目的

(1)申請者はこれまで、卵成熟、受精ならびに初期胚発生中の微小管とアクチン線維の再配置について検討してきた。本研究では、これらの生理的意義について明らかにする。

(2)また、哺乳動物卵に中間径線維が存在し、卵成熟中にその分布が劇的に変化することを観察している。そこで、卵子における中間径線維再配置の生理的意義とそれらを劇的に変化させる分子機構を解明する。

3. 研究の方法

(1)ミトコンドリアー細胞骨格系の相互作用の検討

ハムスター胚の割球に分布するミトコンドリアに対する細胞骨格の直接的な相互作用を明らかにするために、細胞骨格重合阻害剤と高速遠心分離法とを組み合わせた独自に考案した方法によって検討した。

(2)モータータンパク質ー細胞骨格の相互作用の検討

モータータンパク質に着目し、卵子におけるアクチン線維とミオシン、微小管とキネシンの動態を蛍光免疫化学法と共焦点レーザー顕微鏡を用いて追跡する。

(3)哺乳動物卵における成熟中の中間径線維の分布変化

哺乳動物卵における中間径線維の働きに関してはほとんど検討されていない。そこで、ハムスターまたはブタ卵母細胞の各成熟ステージにおけるケラチン、ビメンチン、およびネスチンの分布様式を蛍光免疫化学法と共焦点レーザー顕微鏡を用いて調べた。

(4)ウエスタンブロット法によるハムスター卵における中間径線維ケラチンの同定と濃度変化

卵母細胞のケラチンが成熟過程においてダイナミックに変化することが先行実験により証明されたことから、ウエスタンブロット法により同定し、卵成熟過程でケラチンの濃度がどのように変化するかを調査した。

(5)卵母細胞の中間径線維再配置に関わる細胞周期制御因子に関する検討

免疫蛍光染色法を用いて減数分裂成熟中の卵母細胞におけるケラチン再編を調査し、ケラチン形成に対するcdc2とMAPキナーゼキナーゼの阻害剤の影響を調べた。

(6)ブタ卵のマイクロフィラメントと微小管に対するRhoキナーゼ阻害の影響

ブタ卵の成熟過程におけるマイクロフィラメントならびにもう一つの主要な細胞骨格である微小管の再配置に及ぼすRhoシグナル伝達経路の影響を検討することを目的とした。Rhoとの関連を明らかにするために、Rhoのエフェクター分子の一つであるRhoキナーゼの阻害剤Y-27632を成熟培地に種々の時間帯に添加し、その濃度とブタ卵の成熟過程における種々の事象の進行とマイクロフィラメントと微小管の分布様式との関連を調べた。

(7)ブタ卵の中間径線維ネスチンに対するRhoキナーゼ阻害の影響

上記と同様の方法で、中間径線維ネスチンに対するY-27632によるRhoキナーゼ阻害の影響を検討した。

(8)ブタ卵におけるモータータンパク質キネシン分布に対するRhoキナーゼ阻害の影響

上記と同様の方法で、モータータンパク質キネシンKIF5Aに対するY-27632によるRhoキナーゼ阻害の影響を検討した。

4. 研究成果

(1)ミトコンドリアー細胞骨格系の相互作用の検討

細胞周期のステージに関わらずマイクロ

フィラメントがミトコンドリア再配置において機能していること、そして微小管は強く間期中のミトコンドリアと関連するが、M期にはミトコンドリアから解離することが示された(表1)。すなわち、微小管とマイクロフィラメントの役割が間期とM期で異なることを解明した。

表1. 間期またはM期のハムスター胚のミトコンドリア配置に対する細胞骨格重合阻害剤と遠心分離を組み合わせた影響

細胞周期のステージ	処理*	ミトコンドリア沈降を示した割球(%)	
		沈降	沈降なし
間期 (2細胞)	遠心のみ	0	100
	NZ+遠心	0	100
	CD+遠心	0	100
	NZ+CD+遠心	71	29
M期 (2-4細胞)	遠心のみ	0	100
	NZ+遠心	0	100
	CD+遠心	94	6
	NZ+CD+遠心	90	10

*、NZ、ノダゾール；CD、サイトカラシンD。

(2) モータータンパク質-細胞骨格の相互作用の検討

①キネシンモータータンパク質

GV期(n=23)においてはKIF5Aが比較的表面層に多く分布している卵が39%と観察されたが、MI期およびMII期では観察されなかった。MI期(n=20)においてはKIF5Aが細胞質のほぼ全域に分布している卵が70%と多く観察され、KIF5Aがほぼ半球に分布し、偏りがある卵は30%と観察された。MII期(n=20)においてはKIF5Aが細胞質のほぼ全域に分布している卵が5%と観察され、KIF5Aがほぼ半球に分布し、偏りがある卵は95%と多く観察され、GV期およびMI期と比べても有意に増加していた。

KIF5Aの分布はGV期の核内において高密度であり、卵核崩壊後は細胞質内に拡散するものと考えられる。KIF5AはGV期の核内

においてDNA転写のためのmRNAの輸送に関与していると推測される。そしてGV期だけにみられたKIF5Aが表面層に分布する理由として、GV期の細胞膜直下は卵母細胞の成長に必要な物質を得るため、ミトコンドリアを始めとした細胞小器官が表面層に集中し、さらに細胞小器官の輸送のため表面層に微小管が集中していると考えられる。

②ミオシンモータータンパク質

GV期(n=24)で細胞膜付近に多く存在していたミオシンが、MI期(n=17)からMII期(n=19)にかけて細胞質の内側に広がり、かつ細胞膜の特定の領域にミオシンが動員され、一部が肥厚して三日月状の分布を示した。MII期卵におけるミオシンの三日月状の肥厚領域に注目すると、ミオシンの厚さと囲卵腔の幅の関連性が高いことが明らかとなった。得られた回帰式は、以下のとおりであった。

$$Y=0.3528X+1.8217$$

Y：囲卵腔の幅(μm)

X：ミオシン層の厚さ(μm)

$$R^2=0.39, r=0.62 (p<0.01)$$

このことから、三日月状に広がるミオシンは囲卵腔を形成する一員であると推測される。また、ミオシンの分布がマイクロフィラメントと同様な分布を示していたことから、ブタ卵母細胞においてもミオシンとマイクロフィラメントは関連性があり、囲卵腔を形成していると考えられた。

(3)哺乳動物卵における成熟中の中間径線維の分布変化

①ハムスター卵におけるケラチンの分布変化

GV期卵母細胞(n=26)において、非線維性のケラチンから成る大型で、楕円形の集合塊が卵細胞表面層に認められた(「表面層」パターンと略記)。また、GV周辺にはケラチン線維の繊細なネットワークが集中していた。大型のケラチン集合塊がPro-MI期/MI期に小さな断片に分かれ始めていた(n=22、「断片化」パターンと略記)。一部のケラチン断片は、卵細胞の周縁領域で

多数の小顆粒に細分されていた。MII 期卵母細胞 (n=24) では、ケラチン線維のネットワークが卵母細胞質全体に拡張しており、多数のケラチン小顆粒が卵細胞全体に亘って分布していた(「顆粒状」パターンと略記)。GV から MII 期へケラチン線維ネットワークの複雑さが増加しているのは、排卵後に物理的なストレスの下で細胞機能を維持する役割を果たしているものと推察される。

②ブタ卵におけるケラチンの分布変化

免疫抗体法によるケラチンシグナルは GV 期卵のほとんど (89.8%, n=49) では、明確な繊維構造を示さず卵核胞の周辺から表層に拡散していた。細胞膜直下にやや強い染色性と卵核胞内には微細な粒子状のシグナルが認められた。MI 期では大部分の卵 (76.4%, n=38) で網目構造を形成途上にあり、MII 期卵では、85.1% (n=47) の卵でケラチンの明瞭な網目構造が細胞質全域に形成されていた。

③ブタ卵におけるビメンチンの分布変化

免疫抗体法によるビメンチンシグナルは、GV 期卵では大部分の卵 (73.3%, n=52) で微細な粒子状として細胞質全体が均一に分布しており、卵核胞内にも認められた。MI 期ではほとんどの卵で細胞質全域に亘って網目構造が形成されていた。MII 期では表層の網目構造が不明瞭となり、ビメンチンが細胞膜直下約 10 μm の層状に集中していた (89.1%, n=76)。

④ブタ卵におけるネスチンの分布変化

GV 期の 23% (11/48) の卵で、ネスチンが細胞質のほぼ全域に均一に分布していたが、線維化してはいなかった。残りの 77% の卵ではバックグラウンドのみで、特異的な構造はみられなかった。MI 期では、30% (13/42) の卵で特別な構造を認めなかったが、他の 58% (25/42) の卵では非線維性のネスチンが細胞質のほぼ全域に分布していた。さらに 12% (5/42) の卵で、ネスチンが細胞質全域で網目状の構造を示していた。MII 期卵では、特異的な構造を示す卵の割合が 46% (30/65) に増大した。

すなわち、18.5% (12/65) の卵でネスチンが細胞質全域で網目状構造を示した。そして、27.7% (18/65) の卵でネスチンが「表層化」を形成し、細胞質細胞質中央部は表層に比べて弱い染色性が観察された。その他の卵ではネスチンが細胞質ほぼ全域に分布していた。以上から、ブタ卵母細胞におけるネスチンが GV 期から出現し始め、ネスチンの特異的な構造が MI 期に出現し、MII 期にかけて増加していく傾向がうかがわれた。

(4)ウエスタンブロット法によるハムスター卵における中間径線維ケラチンの同定と濃度変化

MII 期卵のケラチンの分子量を検討した結果、約 46 kDa と推定され、keratin 20 に近い数値を得た。バンドの濃度を比較したところ、GV 期から MI 期にかけてハムスター卵母細胞におけるケラチン濃度が増大することが明らかとなった。ただし、MII 期卵でケラチンの濃度が再度低下していたが、この理由については解明できなかった。

(5)卵母細胞の中間径線維再配置に関わる細胞周期制御因子に関する検討

先行実験の結果で明らかのように(本項(3)の①参照)、ハムスターらの母細胞における中間径線維ケラチンは、GV 期で「表層」パターン、MI 期で「断片化」パターン、そして MII 期では「顆粒状」パターンを示す。この時、cdc2 の阻害剤である Roscovitine との 12 時間培養後では、卵母細胞の 66.7% (20/30) は GV 期のままで、ケラチン分布は「表層」パターンを示した。次いで、MAP キナーゼキナーゼの阻害剤である U0126 との培養後には、ほとんどの卵母細胞 (83.9%, 26/31) が MII 期であり、そしてそれらのほとんどは (76.9%, 20/26)、ケラチンの「断片化」パターンを示した。以上から、減数核分裂の進行のように、MPF はケラチン線維の再編のために必要である。また、MAP キナーゼキナーゼは「断片化」パターンから「顆粒状」のパターンへのケラチン線維の再編に関与している。

(6)ブタ卵のマイクロフィラメントと微小管に対する Rho キナーゼ阻害の影響

①Rho キナーゼ阻害剤がブタ卵の成熟減数分裂進行に及ぼす影響

対照区における卵核胞崩壊率は97.4%であり, Rho キナーゼ阻害剤 Y-27632 の 1 μ M 区と 10 μ M 区では, それぞれ 90.2%と 83.3%で有意差は認められなかった。しかし, 100 μ M 区では卵核胞崩壊率が 4.5%と有意に抑制された (P<0.01)。

②ブタ卵の卵核胞崩壊に対する Rho キナーゼ阻害剤の影響と培養時間との関係

①に示したとおり, Rho キナーゼ阻害剤 100 μ M 添加, 24 時間培養により, 卵核胞崩壊がほぼ抑制されたので, 阻害剤の切り替えの時間を 18 時間として培養時間との関連を追求した。その結果, 培養 18 時間後のブタ卵の 68%は依然として卵核胞期のままであり, 残りの 32%が卵核胞崩壊を示した。これに対し, 培養開始から 18 時間 Rho キナーゼを阻害すると, ①と同様に, ほとんどの卵 (95%) が卵核胞期のままで卵核胞崩壊が抑制された。次いで, ブタ卵を 28 時間培養すると, すべての卵が MI 期以降に進行し, そのうち 27%の卵は MII 期に達していた。培養 18 時間から 28 時間まで Rho キナーゼを阻害すると, 28 時間阻害剤無添加の対照区と著差はなく, 培養 18 時間以降の阻害剤の添加は減数分裂の進行には影響しないと判断されたが, 第 1 極体の放出が抑制された卵が出現した。このことは, 培養 18 時間では卵の大部分 (68%) は GV 期であるが, 18 時間経過後に Rho キナーゼを阻害しても卵核胞崩壊が起こることを示唆する。しかし, 培養開始から 18 時間阻害剤を添加し, その後通常の培地に移した場合, 半数以上 (57%) の卵が GV 期のままであったものの, その他の 43%の卵では減数分裂が再開していた。このことから, Rho キナーゼの GVBD に対する関与は GV 前期 (18 時間まで) に重要であると推察された。

③卵丘細胞-卵母細胞複合体の膨化に及ぼす Rho キナーゼ阻害剤の影響

対照区における卵丘細胞間には微小管とマイクロフィラメントから成る細胞質

突起がよく発達して認められた。しかしながら, Rho キナーゼ阻害剤を添加した場合には, 細胞質突起が形成されていなかった。

④細胞骨格の維持に対する Rho キナーゼ阻害の影響

・マイクロフィラメント形成への影響

Rho キナーゼ阻害剤で処理した卵母細胞のマイクロフィラメントの染色性が明らかに低下していた。また, 前述の通り第 1 極体の放出が抑制され, 卵丘細胞の膨化も阻害された。したがって, Rho キナーゼ阻害によってマイクロフィラメントの形成や維持が阻害された。

・微小管形成への影響

Rho キナーゼ阻害剤で処理した卵母細胞において紡錘体の形成には影響は全く認められなかった。したがって, Rho キナーゼ阻害による微小管への影響はなかったものと判断される。

・中間径線維形成への影響

中間径線維のうちネスチンについて Rho キナーゼ阻害処理を施したが, ネスチンの分布には影響が認められなかった。

(7) ブタ卵の中間径線維ネスチンに対する Rho キナーゼ阻害の影響

Y-27632 により阻害剤処理した卵のネスチンの分布のうち, MII 期の特異的な構造を示す卵の割合は対照卵のそれと有意差はなかった。したがって, 中間径線維ネスチンの再配置には Rho シグナル伝達経路は関与していないものと推察された。

(8)ブタ卵におけるモータータンパク質キネシン分布に対する Rho キナーゼ阻害の影響

24 時間無添加-20 時間 Rho キナーゼ阻害剤添加区で第一極体の放出が抑制されたことはマイクロフィラメントの機能が抑制されたためと考えられるが, 染色体が正常に分離していることから, 微小管の機能には影響はないものと推察される。その微小管をレールとしているキネシン KIF5A の分布には変化が認められず, Rho キナーゼ阻害の影響を受けなかった。

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4件)

- ① Kabashima, K., Yoshinaga, D., Fang, J., Matsuzaki, M. and Suzuki, H. Cell cycle-dependent dynamics of cytoskeleton involving mitochondrial redistribution in hamster embryos. *Reprod. Dom. Anim.*, 査読有, 2012, 印刷中.
- ② Suzuki, H., Koyama, K., Kabashima, K. Fang, J. and Matsuzaki, M. Temporary Inhibition of Germinal Vesicle Breakdown by Rho kinase Inhibitor Y-27632 is Detrimental to Oocyte Maturation. *J. Mamm. Ova Res.*, 査読有, Vol.28, 2011, 126-130.
- ③ Kabashima, K., Matsuzaki, M. and Suzuki, H. Intermediate filament keratin dynamics during oocyte maturation requires MPF and MAP kinase activities in the hamster. *Reprod. Dom. Anim.*, 査読有, Vol.45, 2010, e184-e188.
- ④ Suzuki, H., Sasaki, Y., Shimizu, M., Matsuzaki, M., Hashizume, T. and Kuwayama, H. Ghrelin and leptin did not improve meiotic maturation of porcine oocytes cultured in vitro. *Reprod. Dom. Anim.*, 査読有, Vol.45, 2010, 927-930.

[学会発表] (計5件)

- ① 梶嶋克哉, 房家琛, 松崎正敏, 鈴木裕之: ハムスター卵成熟過程におけるミトコンドリアの再配置は, 微小管ではなくアクチン繊維によって制御される. 日本哺乳動物卵子学会第53回大会(千里ライフサイエンスセンター), 2012.
- ② 小田純平, 梶嶋克哉, 加藤愛子, 房家琛, 松崎正敏, 鈴木裕之: ブタ卵母細胞の成熟に伴う中間径繊維, ケラチンとビメンチンの分布変化. 東北畜産学会第61回大会(青森市), 2011.
- ③ 梶嶋克哉, 吉永大輔, 房家琛, 松崎正敏, 鈴木裕之: ハムスター初期胚における細胞周期依存的なミトコンドリア分布の制御機構. 日本畜産学会第114回大会(北里大学), 2011.
- ④ 梶嶋克哉・山内浩一・松崎正敏・鈴木裕之: ハムスター初期胚におけるケラチンの時空間的分布変化. 日本繁殖生物学会第103回大会(北里大学), 2010.
- ⑤ 古山敬一・梶嶋克哉・松崎正敏・鈴木裕之: Rhoキナーゼは卵核胞崩壊と第一極体の放出に関与する. 日本哺乳動物卵子学会第51回大会(朱鷺メッセ), 2010.

[その他]

ホームページ等

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/lab/3/animsci/reference.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 裕之 (SUZUKI HIROYUKI)
弘前大学・農学生命科学部・教授
研究者番号: 50211313

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: