

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 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370085

研究課題名（和文）

胚発生の開始を制御するカルシウムシグナル経路

研究課題名（英文）The calcium signaling pathway that initiates embryonic development in fertilize amphibian eggs.

研究代表者

大隅 圭太 (OHSUMI KEITA)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：20221822

研究成果の概要（和文）：動物の卵では受精時に細胞質の Ca^{2+} 濃度が一過的に上昇するが、 Ca^{2+} の卵賦活における機能的役割については不明な点が多い。本研究では、無尾両生類アフリカツメガエルの卵抽出液の無細胞系、単離表層を用いて、(i) 停止した減数分裂周期の再開におけるカルシニューリン (CaN) の基質、(ii) Ca^{2+} 依存的な卵表層の賦活収縮の制御機構の2点について検討した。その結果、分裂期停止の解除をもたらすサイクリン B タンパク質分解の誘起には Erp1 および Cdc20 の脱リン酸化が関与することが示唆された。また、卵表層の構成タンパク質を卵成熟前後、賦活前後で比較し、卵成熟期にアニリンが量的に増加しリン酸化されることが判明した。この成果は、卵表層の生化学的解析への道を拓くものでもある。

研究成果の概要（英文）：At fertilization, a transient increase of cytoplasmic calcium ions (Ca^{2+}) triggers various activation responses in animal eggs. In amphibian, these responses include exit from meiotic arrest and cortical remodeling observed as activation contraction. We have investigated substrates for calcineurin in inducing the meiotic exit and regulatory mechanisms for the activation contraction, using cell-free extracts and cell cortices isolated from *Xenopus* eggs. The results indicated that Erp1 and Cdc20, both of which are essential for cyclin B destruction which leads to the meiotic exit, are dephosphorylated upon activation. The phosphatase(s) responsible for their dephosphorylation remains to be identified. We have also established the method to isolate the cell cortex from oocytes and eggs and to elute their cortical proteins. Using these materials, we found that anillin, an actin cytoskeletal regulator protein, increases during oocytes maturation and is dephosphorylated upon activation. Thus, the cortical isolation method developed in this study has enabled the biochemical analyses of cell cortex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
総計	15,900,000	4,770,000	20,670,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：胚発生、受精、カルシウムシグナル、カエル卵

1. 研究開始当初の背景

動物卵における胚発生の開始は、受精が刺

激となって卵細胞質の膜小胞に蓄えられた Ca^{2+} が放出され、細胞質の Ca^{2+} 濃度が一過的に

上昇することによって引き金が引かれる。細胞質Ca²⁺濃度の上昇によって、卵表層粒の放出による受精膜の形成、それに伴う卵表層の再構築や、停止していた減数分裂の再開、タンパク合成の活性化やDNA複製の開始など、「賦活」と呼ばれる一連の活性化反応が受精卵に引き起こされ、胚発生が開始すると考えられている。ヒトを含む脊椎動物の卵においても、受精刺激に反応して卵内のCa²⁺濃度が上昇し、これによって表層粒内容物の放出や第2分裂中期で停止していた減数分裂の再開などが誘起される。無尾両生類アフリカツメガエルの卵においては、これらの現象に加えて「賦活収縮」と呼ばれる一時的な動物半球色素域の収縮が引き起こされる。この現象は肉眼でも識別可能なことから賦活したことを示す簡便な指標となっているだけでなく、著しい不等分裂である極体放出から等分裂である卵割への細胞質分裂システムの転換をもたらす細胞表層のリモデリングと関連したものとして興味深い。こうした受精卵におけるCa²⁺依存性の賦活反応は、胚発生の開始に必要な不可欠な、きわめて重要な現象として古くから注目を集めながら、制御機構の多くは不明なままで、その解明は発生生物学における主要な課題の1つである。

また、細胞内Ca²⁺濃度の増加によって引き起こされる細胞現象には、Ca²⁺によって調節される細胞質因子が関与すると考えられ、その1つにカルモジュリン(CaM)がある。Ca²⁺/CaMによって活性が調節される酵素が賦活反応において重要な役割を果たすことは早くから示唆されてきたが、ツメガエル卵の賦活反応においても、Ca²⁺依存酵素の関与ならびにその基質は、少数の例を除いて、その作用機序が明らかにされていなかった。他の動物の卵でも事情は変わらず、受精に際してCa²⁺濃度が増加することは多くの動物の卵で確認されてきたが、その下流で卵の賦活反応を引き起こす因子および代謝経路には未解明な部分が多く残されていた。

2. 研究の目的

動物卵が受精すると細胞質のカルシウムイオン濃度が一過的に上昇するが、その生理機能には不明な部分が多い。申請者は、ツメガエル受精卵の胚発生開始にはCa²⁺/CaM依存性のタンパク質脱リン酸化酵素カルシニューリン(CaN)の活性化が必須であることを見出した(Nishiyama et al., Nature, 449, 341, 2007)。この発見に基づいて、脊椎動物の胚発生開始におけるCaNの生理的役割を、次の2点において検討する。(1)停止していた減数第2分裂の再開、特に分裂期停止の解除をもたらすサイクリンBタンパク質分解の制御機構との関連で。(2)受精直後の卵表層

の構造変換を引き起こす細胞骨格繊維の再編成、特に表層アクチン細胞骨格の制御因子との関連で。卵の賦活におけるCaNの役割解析と、すでにツメガエル受精卵の減数分裂再開に必須との報告があるCa²⁺/CaM依存性のタンパク質キナーゼII(以下CaMKII)の役割と併せて、不明な点が多い、胚発生の開始を制御するカルシウムシグナル経路について、その作用機序を検討し、脊椎動物の胚発生開始の制御機構に対する理解を深める。

より具体的には、本研究では、ツメガエルの未受精卵およびその無細胞系を用いて主に以下の2点に取り組む。(i)受精卵の減数分裂周期の再開におけるCaNの基質の検討：第2分裂中期で停止していた減数分裂を再開させるためには、サイクリンBの分解誘起が不可欠である。サイクリンBの分解誘起に関与している、CaNの基質の同定を試みる。(ii)受精卵の賦活収縮におけるCaNおよびCaMKIIの基質の検索：ツメガエル未受精卵の表層単離法を確立し、単離表層と賦活反応を再現する卵抽出液を組み合わせ、賦活収縮時にCaNおよびCaMKIIによって修飾される表層タンパク質を検索する。

3. 研究の方法

ツメガエル受精卵における減数分裂周期の再開および表層の賦活収縮にはCaNの活性化が必要であるという知見と、すでに報告のある、停止した減数分裂周期の再開に対するCaMKII活性の必要不可欠性に基づき、脊椎動物の受精卵ではカルシウムシグナル経路がどのようにして賦活反応を引き起こすのか、その分子機序を明らかにするために、受精卵細胞質の賦活をin vitroで再現するツメガエル卵抽出液の無細胞系を用いて、(i)受精卵の減数分裂周期の再開に関与するCaNの基質の同定、(ii)賦活収縮の制御に関わるCaNおよびCaMKIIの基質の検索の2点に取り組む。(i)我々の予備的な解析から、卵賦活時の電気泳動上の異動度の変化によって脱リン酸化されることが示唆されているタンパク質に、サイクリンBタンパク質の分解に関与するものとしてErp1とCdc20が含まれていることが示されている。これらのタンパク質がCaNの基質かを、カエル卵抽出液を用いて検討する。特にCdc20については、そのリン酸化部位やリン酸化による機能制御に不明な点が残されているので、リン酸化部位のアミノ酸置換変異体を作製して卵母細胞に導入し、リン酸化修飾によるCdc20の活性調節機構について検討する。(ii)我々が独自に開発した接着剥離法により未受精卵から細胞表層を単離し、これを卵抽出液やCaN、CaMKIIの恒常活性型で処理した後、電気泳動、オートラジオグラフィにより表層タンパク質を解析する。CaNの基質を検索する場合には、まず、単離表層を³²P-ATPを

加えた未受精卵抽出液中でインキュベートして表層タンパク質のリン酸化標識を行う。その後、標識した表層を回収して緩衝液中で十分に洗ってから、 ^{32}P -ATPを含まない新たな未受精卵抽出液に浸し、この卵抽出液を Ca^{2+} で賦活してから表層を回収する。 Ca^{2+} を添加せずに同時インキュベートしてから回収したもの、CaNの阻害ペプチドを添加した卵抽出液で同様の操作を行ったものなどを比較対照として用いる。回収した単離表層を十分に洗ってからSDS電気泳動用サンプルバッファーで処理してタンパク質を溶出させ、電気泳動オートラジオグラフィーにより ^{32}P 標識パターンの変化を解析する。

4. 研究成果

(1) 停止している未受精卵の細胞周期を再開させるときに脱リン酸化されるCdc20が含まれる。また、Erp1の分解を完全に誘起するためには、CaNの活性化が必要であることから、Erp1の安定性の制御がCaNによる直接もしくは間接的な脱リン酸化によって調節されている可能性が考えられた。まず、リン酸化状態にあるErp1を*in vitro*でCaN処理したところErp1が脱リン酸化され、Erp1がCaNの基質になることが示された。しかし、この脱リン酸化は、電気泳動的移動度のシフトを伴わず、Erp1の安定性の制御に関わるリン酸化とは関連性が低いことが示唆された。また、卵の賦活時にCdc20が部分的に脱リン酸化されることが電気泳動上の異動度の変化から示唆されたので、アミノ酸配列から予想されるリン酸化部位の置換変異体を作製して、賦活時に脱リン酸化される部位の特定を試みた。その結果、N末端から59番目のセリン残基(S59)の脱リン酸化によって、Cdc20の賦活時の異動度のシフトがもたらされることが判明した。また、S59はMos/MAPKカスケードに依存してリン酸化されることが示された。そこで、アンチセンスオリゴにより成熟期における卵母細胞のCdc20の発現の抑制し、この卵母細胞にS59をアラニンに置換したCdc20変異体を導入してS59リン酸化の生理的意義を検討した。その結果、S59のリン酸化が未受精卵の細胞周期停止に関与すること、従って、その脱リン酸化が、受精卵における細胞周期の再開に関連するものであることが示唆された。しかし、少なくとも*in vitro*では、CaNによりS59は脱リン酸化されなかった。

(2) ツメガエル卵母細胞の単離表層を構成する蛋白質を電気泳動的に解析した結果、それまでの7M尿素によるタンパク質の抽出法では、この処理によって蛋白質が変成し、電気泳動上の異動度の変化が引き起こされることが示され、この抽出法が適切ではないことが示唆された。そこでまず、表層蛋白質の回

収を視野に入れて卵母細胞表層の単離法に改良を加えた。接着剥離法により単離した表層を、緩衝液中で十分に洗浄した後、界面活性剤、次いで5M尿素で抽出を行い、最後に電気泳動用のサンプルバッファーで残りの成分を可溶化する3段階抽出法を確立した。各段階の抽出物について、成熟前、減数第一分裂期、成熟後の各卵母細胞間の電気泳動法比較を行ったところ、界面活性剤抽出成分および尿素抽出成分に、卵成熟前後で泳動上の異動度が変化する成分がいくつか見いだされた。

(3) 受精に依る卵の賦活の際に、CaNによって化学修飾を受ける蛋白質のうち、特に表層蛋白質に着目して、その分子の実体を検索した。未受精卵の単離表層を γ - ^{32}P -ATPを含む成熟未受精卵抽出液中でインキュベーションした後、リン酸化蛋白質をSDS-PAGE/オートラジオグラフィーで解析した。その結果、単離表層中の蛋白質がリン酸化されることが確認され、単離表層中のリン酸化酵素の少なくとも一部が活性状態を保ち、その基質も存在していることが示された。また、そのリン酸化パターンは卵抽出液のものとは明らかに異なり、表層特異的なリン酸化が検出できていることが示唆された。また、恒常活性化型CaNで処理することにより、リン酸化標識された表層蛋白質が脱リン酸化されることが確認された。その主なものとして、32Kおよび95KDaの移動度を示すものが含まれていたが、その同定は今後の課題である。これらの結果は、卵抽出液と単離表層を組み合わせることで、卵の賦活時にCaNやCaMKIIによって修飾される表層蛋白質を生化学的に解析する道が拓かれたことを示している。

(4) 受精直後の卵に見られる賦活収縮の調節因子を調べるため、アクチン結合蛋白質anillin、formin、moesin、cortactinに対するウサギ抗血清を作製し、卵成熟期のそれらの動態をウエスタン法によって解析した。その結果、anillinについては、卵成熟の前後で卵細胞質中の量が約2倍に増加すること、また、単離表層に含まれる量は4倍に増加することが示された。この結果は、卵成熟期に新規合成されるanillinが優先的に表層に蓄積されることを示した。そこで、その生理的意義を調べるため、アンチセンスオリゴを用いてanillinの新規合成を抑制したが、特に影響は見られなかった。また、いずれの蛋白質についても、賦活前後では、量、電気泳動上の異動度に目立った変化はなく、成熟卵の賦活収縮との関連性は示されなかった。anillinについては、間期に異動度がわずかに増加するのが見られたが、フォスファターゼ処理後の異動度変化の解析から、これは細胞周期依存的なリン酸化によるものであることが示された。立った変化はなく、

成熟卵の賦活収縮との関連性は示されなかった。anillin については、間期に異動度がわずかに増加するのが見られたが、フォスファターゼ処理後の異動度変化の解析から、これは細胞周期依存的なリン酸化によるものであることが示された。

本研究が開始された年に研究代表者、分担者共に、他大学への異動が決まり、その前後には研究室の移動などのために十分な時間を本研究に割くことが出来なかったため、研究計画の全てを予定通りに遂行することができなかったところもあるが、賦活反応における卵の表層リモデリングについては、卵表層の単離法、表層タンパク質の抽出、解析法が確立され、その生化学的解析への道が拓かれたことは本研究の大きな成果といえる。

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4件)

- ① 西山朋子、大隅圭太、脊椎動物の未受精卵における減数分裂停止とその解除、蛋白質核酸酵素、53巻、207-216、2008、査読無
- ② Maki, N., Suetsugu-Maki, R., Sano, S., Nakamura, K., Nihimura, O., Tarui, H., Del Rio-Tsonis, K., Ohsumi, K., Agata, K., Tsonis, P.A. Oocyte-type linker histone B4 is required for transdifferentiation of somatic cells *in vivo*. FASEB J., 24, 3462-3467, 2010、査読有
- ③ Hasebe, T., Kajita, M., Iwabuchi, M., Ohsumi, K., Ishizuya-Oka, A. Thyroid hormone-regulated expression of nuclear lamins correlates with dedifferentiation of intestinal epithelial cells during *Xenopus laevis* metamorphosis. Dev. Genes Evolution, 211, 199-208, 2011、査読有
- ④ Matsuo, K., Ohsumi, K., Iwabuchi, M., Kawamata, T., Ono, Y., Takahashi, M. Kendrin is a novel substrate for separase involved in the licensing of centriole duplication. Curr. Biol., 22, 915-921, 2012、査読有

[学会発表] (計5件)

- ① Ohsumi, K. Meiosis arrest and its cancellation in *Xenopus* eggs. 12th International *Xenopus* Conference, Sept.

24, 2008, Leiwien, Germany

- ② 岩渕万里、大隅圭太、核内膜タンパク質 LBR による初期胚の核の構造と機能の制御、第32回日本分子生物学会、21年、12月12日、横浜
- ③ Ohsumi, K. Chromatin replication in early embryonic cells. International Symposium on Biodiversity Science, Aug. 2, 2010, Nagoya
- ④ Iwabuchi, M., Imamoto, N., Kishimoto, T., Ohsumi, K. Immobilization of importin α by annulate lamellae is required for survival of full-grown *Xenopus* oocytes. 13th International *Xenopus* Conference, Sept. 13, 2010, Fairmont Chateau Lake Louise, Canada
- ⑤ 岩渕万里、大隅圭太、ツメガエル初期胚細胞核の構造・機能制御に関わる核内膜タンパク質、第29回染色体ワークショップ、24年、1月25日、仙台

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/index2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大隅 圭太 (OHSUMI KEITA)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：20221822

(2) 研究分担者

岩渕 万里 (IWABUCHI MARI)

名古屋大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：40275350