

機関番号：12608

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570180

研究課題名 (和文)

卵母細胞に不等分裂を引き起こすための紡錘体の位置決定機構

研究課題名 (英文)

Regulation of unequal cell division in animal oocyte meiosis

研究代表者

立花 和則 (TACHIBANA KAZUNORI)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・准教授

研究者番号：60212031

研究成果の概要 (和文)：卵減数分裂過程における極端な不等分裂が起こるしくみを明らかにするために、その重要な必要条件である紡錘体を細胞表層へアンカーする分子機構の解明を目指している。このような分子は、第一に Mos-MAP キナーゼカスケード依存的にリン酸化されると予測される。第二に、このような分子は紡錘体近傍に存在している可能性が高い。そこで、本研究計画においては、これらの二つの条件を満たす蛋白質を探索し、紡錘体制御に関わる候補となる蛋白質をいくつか同定した。

研究成果の概要 (英文)：

During meiotic maturation of animal oocytes, two successive divisions occur without an intermediate phase of DNA replication, so that haploid gametes are produced. Moreover, these two divisions are extremely asymmetric, to ensure that most of the maternal stores are retained within the oocyte. This leads to the formation of daughter cells with different sizes: the large oocyte and the small polar bodies. It is not known what signal couples the spindle pole positioning to polar body formation. We have found that Mos-MAPK-Rsk kinase pathway is required for the normal polarbody extrusion. So, we approached the question by analyzing the proteins that are phosphorylated specifically by the kinase pathway during the polarbody extrusion. We have identified some candidates for the regulators for the spindle pole positioning. Now, we are checking each candidate play a role in the asymmetric cell division.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000 円	570,000 円	2,470,000 円
2009 年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
2010 年度	700,000 円	210,000 円	910,000 円
年度			
年度			
総計	3,700,000 円	1,100,000 円	4,810,000 円

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：不等分裂、減数分裂、卵母細胞、紡錘体、蛋白質キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

動物の卵子は他の細胞より千倍から一万倍も大きな体積をもつ巨大な細胞である。この卵子が形成される最終段階では減数分裂により染色体が半減するのであるが、そのさいに極端な不等分裂により卵子になる細胞にほとんどの細胞質が残り、極体とよばれる細胞にはきわめてわずかの細胞質しか渡されない。本研究の目標はこの卵減数分裂における不等分裂の分子機構を明らかにすることである(図1参照)。このような不等分裂を起こすためには一般に紡錘体が星状体とよばれる微小管構造で細胞表層に固定(アンカー)される必要がある。卵の減数分裂でも紡錘体は(動物極近くの)細胞表層にアンカーされているが、卵減数分裂の紡錘体では星状体が発達しない。このことは、卵子(卵母細胞)には紡錘体を細胞表層にアンカーするための体細胞と異なるメカニズムが存在するものと予測される。われわれはこれまでの研究で、卵減数分裂過程において原がん遺伝子産物である *c-mos* の機能を阻害すると、紡錘体が細胞表層にアンカーされないこと発見した(図1、B)。このことは卵母細胞の紡錘体の細胞表層へのアンカーには *c-mos* の機能が必要であることを示している。そこで、本研究の具体的な目標は *c-mos* に依存して紡錘体を細胞表層にアンカーするために機能している分子(蛋白質)を明らかにしようというものである。

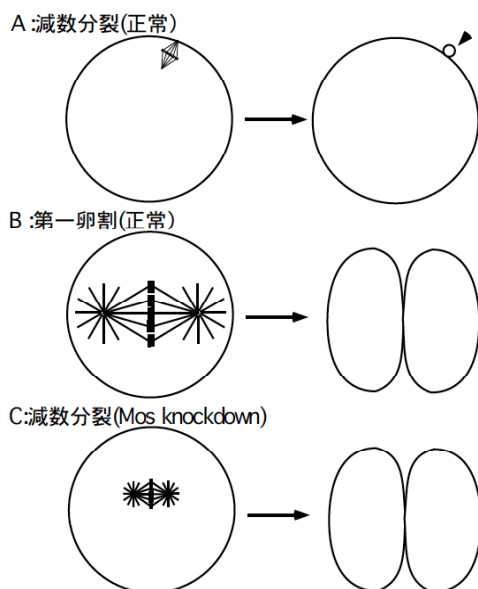


図1

2. 研究の目的

本研究では、卵減数分裂過程における極端な不等分裂(極体の放出)が起こるしくみを明らかにするために、その重要な必要条件で

ある紡錘体の細胞表層へ固定する分子機構の解明を目指している(図2参照)。この現象には *Mos*-MAP キナーゼの活性が必要であるので、*Mos*-MAP キナーゼの標的となる分子で紡錘体の細胞表層へのアンカーに関わる分子を明らかにすることを目的とした。

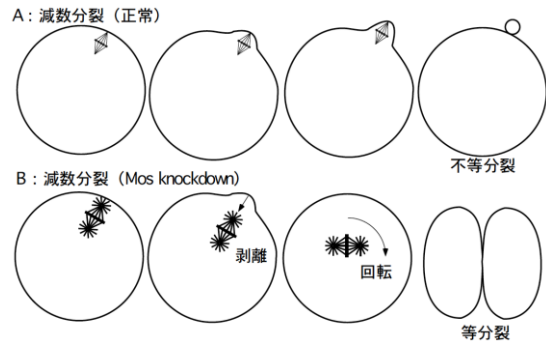


図2

3. 研究の方法

卵減数分裂過程における極端な不等分裂が起こるしくみを明らかにするために、その重要な必要条件である紡錘体を細胞表層へアンカーする分子機構の解明を目指している。このような分子は、第一に *Mos*-MAP キナーゼの基質である、すなわち、これらのキナーゼ依存的にリン酸化されると予測される。第二に、これまでのわれわれの研究で減数第一分裂中期の卵母細胞から単離した紡錘体に活性化した MAP キナーゼが存在することが判明していることから、このような分子は紡錘体に存在している可能性が高い。そこで、本研究計画においては、これらの二つの条件を満たす蛋白質を探索し、そのなかで紡錘体を細胞表層にアンカーする機能を持つものを選択するという方法を取った。

このような蛋白質の探索に当たっては、*Mos*-MAPK の下流で機能している *Rsk* によりリン酸化される蛋白質のリン酸化を受ける部位のコンセンサス配列を特異的に認識する抗体を用いて、免疫沈降と質量分析によって、このような蛋白質を網羅的に解析することを第一に行った。

次に、図3にみられるような紡錘体に局在にはアクチンキャップを形成する蛋白質群が関わることが知られているが、これらの蛋白質と、*Mos*-MAPK の下流で紡錘体のアンカーに機能している *Rsk* によりリン酸化される蛋白質が一致する可能性があると予測されるので、これらの蛋白質と相互作用する蛋白質をプルダウンして、その中で *Rsk* によりリン酸化を受けるものを探索した。

これら2つのアプローチによって共通する蛋白質が得られたならば、それは目的の蛋白質である可能性が非常に高いと予測され

る。

4. 研究成果

卵母細胞で紡錘体が局在を示す時期に、Rskによって特異的にリン酸化される蛋白質を、網羅的に同定するためにRskによりリン酸化を受けるコンセンサス配列にたいする抗体（抗PAS抗体）を用いて免疫沈降した蛋白質を、さらに、紡錘体の制御に関わる低分子量G蛋白質を固定化したビーズで回収し、精製されたタンパク質を質量分析して、紡錘体制御に関わる候補となる蛋白質をいくつか同定した。

その中には図3で示した紡錘体のアンカーされる位置に局在して、紡錘体のアンカーに関わると考えられるものもあり、現在、このような候補となる蛋白質とGFP（Green fluorescent protein）の融合蛋白質をコードするmRNAを作成して、この蛋白質の局在や既知の紡錘体の局在やアクチンの重合を制御する蛋白質との相互作用の有無を免疫沈降などで調べているところである。

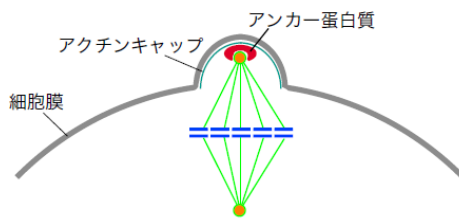


図3

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. Tachibana, K., Mori, M., Matsuhira, T., Karino, T., Inagaki, T., Nagayama, A., Nishiyama, A., Hara, M., and Kishimoto, T. Initiation of DNA replication by fertilization is regulated by p90Rsk at pre-RC/pre-IC transition in starfish eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 16, 5006-5011, (2010)（査読有り）.

2. Hara, M., Mori, M., Wada, T., Tachibana,

K., and Kishimoto, T. Start of the embryonic cell cycle is dually locked in unfertilized starfish eggs. *Development*, 136, 1687-1696 (2009).（査読有り）

3. Yamamoto, D. S., Tachibana, K., Sumitani, M., Lee, J. M., and Hatakeyama, M. Involvement of Mos-MEK-MAPK pathway in cytostatic factor (CSF) arrest in eggs of the parthenogenetic insect, *Athalia rosae*. *Mechanisms of Development* 125, 996-1008 (2008).（査読有り）

4. Tachibana, K., Hara, M., Hattori, Y., and Kishimoto, T. Cyclin B-Cdk1 controls pronuclear union in interphase. *Current Biology* 18, 1308-1313 (2008).（査読有り）

〔学会発表〕（計4件）

1. 立花和則、森雅志、熊野真弥、岸本健雄、イトマキヒトデの紡錘体局在の制御機構、日本動物学会、2010年9月22日、東京（査読無し）

2. 立花和則、International symposium on biological signal transduction from yeast to mammals、Rewiring MAP kinase pathways in animal oocytes、2009年11月19日、筑波（査読無し）

3. 立花和則、岸本健雄、卵母細胞の減数分裂、日本分子生物学会、2008年12月9日、神戸（査読無し）

4. 立花和則、岸本健雄、イトマキヒトデの卵成熟から受精におけるMKP2の動態、日本動物学会、2008年9月5日、福岡（査読無し）

〔図書〕（計2件）

1. 立花和則、岸本健雄、c-Mosによる卵子染色体半数化と単為発生

の抑制.

「卵子学」(森 崇英 編)、京都大学出版
会、印刷中 (2011). (査読無し)

2. 立花和則、岸本健雄、
細胞周期研究のモデル動物.

「カラー図説 細胞周期」(中山敬一、中山
敬子 監訳)、メディカルサイエンス
インターナショナル、pp11-25 (2008).
(査読無し)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立花和則 (TACHIBANA KAZUNORI)
東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合セ
ンター・准教授
研究者番号：60212031

(2) 研究分担者：なし