

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 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770200

研究課題名（和文） アクチン結合蛋白質トロポミオシン4の紡錘体形成における機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of actin-binding protein Tropomyosin4 in the spindle formation and orientation.

研究代表者

西住 紀子 (NORIKO NISHIZUMI)

東京大学・医科学研究所・技術専門職員

研究者番号：30396882

研究成果の概要（和文）：

マウス卵減数分裂では2回の不等分裂がおこり、1つの卵が形成される。不等分裂を行うために重要な紡錘体極性の制御機構の解明をめざし、本研究ではアクチン結合蛋白質トロポミオシン4 (Tm4) に注目して解析を行った。マウス卵の減数分裂時に、Tm4の発現抑制実験を行った結果、Tm4の発現抑制マウス卵では、紡錘体形成異常や、紡錘体の膜への局在異常が観察された。この結果から、Tm4はマウス卵減数分裂期において紡錘体極性を制御することでマウス卵の正常な不等分配の遂行に寄与している事が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The mammalian oocyte is highly polarized because asymmetrical spindle migration to the oocyte cortex ensures extrusion of small polar bodies in the two meiotic divisions. To elucidate the mechanism of maintain this polarity, I analyzed the function of an actin-filament associated protein tropomyosin 4 (Tm4). Tm4-depletion by siRNA causes abnormal spindles with diffused poles and polarity of spindles in oocyte. These data indicate that Tm4 plays important roles in spindle orientation and chromosome migration during meiosis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：ライフサイエンス(共通基礎研究)

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：減数分裂、紡錘体、リン酸化、アクチン、マウス卵

1. 研究開始当初の背景

発生過程に於いてマウス卵が減数分裂する際、細胞は非対称分裂し大きな卵と小さな極体を形成する。マウス卵減数分裂時には卵に対して小さい紡錘体が形成され、それが細胞膜近辺に移動し、そこで染色体分配を行う事により非対称分裂が実現する。この紡錘体の動態・極性制御にアクチンフィラメントが非常に重要な働きをしていることが知られているが、その分子機構については明らかになっていない点が多い。一方で体細胞分裂時の紡錘体形成過程では、アクチン細胞骨格系は、細胞質分離過程の収縮環形成のみならず、細胞の形態や前期での中心分離、中期での紡錘体形成や紡錘体の極性に働いていることが近年報告されはじめている。申請者らは、紡錘体形成過程の分子機構を体系的に解明するため、M期の進行に非常に重要な役割を果たしているM期キナーゼPlk1 (polo-like kinase 1)の基質を固相リン酸化法により探索し、基質候補分子の1つとしてアクチン結合蛋白質トロポミオシン4 (Tm4)を同定した。トロポミオシンファミリーは、細胞骨格であるアクチンフィラメントに沿って局在し、アクチンフィラメントの安定性を制御する因子の機能を調節することで細胞内でのアクチンフィラメントの様々な機能を制御している。申請者らは培養細胞を用いた解析から、Tm4発現抑制がM期前期における中心体動態の異常と紡錘体の極性喪失(紡錘体の軸が接着面と平行に位置されず、ランダムに位置する)を引き起こすことを見出した。この結果は、Tm4がアクチンフィラメントの動態制御を通し、紡錘体極の動態・紡錘体の極性制御に寄与する因子であることを示唆する。これらの知見からマウス卵減数分裂過程における紡錘体極性をTm4が制御している可能性が考えられ、その解析が待たれていた。

2. 研究の目的

卵細胞特有の紡錘体の極性がどのように制御されているのか、アクチン結合蛋白質Tm4の機能に注目し、減数分裂での非対称分裂の分子機構の解明をめざす。

3. 研究の方法

(1) Tm4のマウス卵における局在

Tm4の細胞内局在を第一減数分裂前から、第2減数分裂まで詳細な局在を、8-12週齢のBALB/cA×C57BL/6JのF1から採取したGV卵を培養、経時的に固定し、蛍光免疫染色法により検討した。

(2) Tm4のマウス卵における機能解析

Tm4に対するモルフォリノアンチセンスオリゴ、もしくは、siRNAをGV卵に導入し、Tm4の発現抑制の紡錘体の極性や、染色体の動態への影響を以下のマーカーを用いて、15分間隔のタイムラプスイメージングにより調べた。

① 染色体の動き：染色体のマーカーとして蛍光蛋白質HistonH2B-RFPをマウス卵に発現させ、観察した。

② 紡錘体形成：微小管を可視化するため、蛍光蛋白質融合チューブリンvenus-alpha-tubulinをマウス卵に発現させ、観察した。

③ アクチンフィラメントの様子：アクチンフィラメントのマーカーとして蛍光蛋白質融合Utr (utrophinのアクチンフィラメント結合ドメイン, GFP-Utr)をマウス卵で発現させ、観察した。

(3) Tm4のアクチンフィラメントに対する分子的な機能解析

Tm4がアクチンフィラメントの安定性や紡錘体極性にどのように寄与するのかを調べるため、アクチンフィラメントとともにアクチンミオシン構造を形成する、ミオシンIIAの局在について、培養細胞、およびマウス卵を用いて蛍光免疫染色により調べた。

(4) Tm4 の P1k1 によるリン酸化の意義
Tm4 の発現抑制細胞にリン酸化残基の変異体を導入して、Tm4 発現抑制でみられる異常のレスキュー実験を行った。

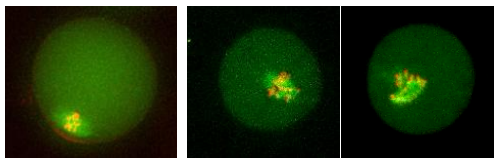
4. 研究成果

(1) Tm4 のマウス卵における局在

Tm4 の細胞内局在は、第一減数分裂前期である GV 卵では細胞質全体であったが、中期に入り紡錘体が形成されると、細胞質と紡錘体にも局在が見られた。紡錘体が膜近傍に移動しアクチンキャップが形成されるとアクチンキャップ、およびその周辺に局在した。この局在は、第一減数分裂後期の細胞質分裂の時の収縮管形成に参与している可能性も示唆される。一方で、リン酸化された Tm4 の局在はガンマチューブリンと一致した。紡錘体極の形成、維持に参与する可能性が示唆された。

(2) Tm4 のマウス卵における機能解析

第一減数分裂期において、紡錘体は卵の中央で形成され、膜の方へ移動して行き、膜に到達すると染色体依存的に卵の表層にアクチンキャップが形成され、分裂後期へ進行すると小さな極体と大きな卵という非対称分裂を行う。Tm4 の発現を抑制したマウス卵は、紡錘体が膜まで移動するが、そこでとどまる事が出来ずに移動してしまい、後期に移行できない様子や、紡錘体が維持できずに染色体がバラバラになる様子が観察された。



(図1. 左：コントロールマウス MII 卵、中右：Tm4 発現抑制マウス MII 卵、赤：染色体、緑：紡錘体)

このとき、アクチンキャップは形成される

が、形成される時間が遅く、紡錘体が膜に沿って移動するに従いアクチンキャップも移動している様子が観察された。これらの結果から、アクチンキャップの形成や紡錘体の移動そのものではなく、紡錘体の形態の維持や、細胞表層に紡錘体を留めておく紡錘体極性を維持するために、Tm4 が重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

(3) Tm4 のアクチンフィラメントに対する分子的な機能解析

Tm4 発現抑制細胞においては、アクチンフィラメントが膜表層部から離れ細胞質に広がってしまっている様子が観察され、さらに、ミオシン IIA も細胞質に拡散していた。膜表層部ではアクチンフィラメントの間にミオシン IIA が局在するアクトミオシン構造を形成し、表層の形態を保っていると考えられているが、Tm4 発現抑制細胞ではその構造が取れなくなっていることから、ミオシン IIA は Tm4 依存的にアクチンフィラメントに局在すると考えられた。紡錘体の極性は、紡錘体の星状体微小管と膜との間に発生する力により維持されると考えられるが、その力を担っているダイニンの局在も Tm4 発現抑制細胞では失われていた。すなわち、Tm4 はアクトミオシンを形成し膜の形態を安定化することで、紡錘体の極性を司るモータータンパク質の局在を維持し紡錘体極性を維持している可能性が示唆された。

(4) Tm4 の発現抑制細胞にリン酸化されない変異体を導入して、Tm4 発現抑制細胞でみられる紡錘体極性およびミオシン IIA の局在変化をレスキューできるか検証したところ、どちらもレスキューできなかった。この結果から、Tm4 の紡錘体極性やアクトミオシン形成における機能は、P1k1 のリン酸化により制御されているとた。

以上の結果から、減数分裂時におこる非

対称分裂を実現するため、Tm4 が重要な役割を担っている事を示すことができた。その機能はM期キナーゼPlk1により制御されていること、細胞分裂期のアクトミオシン形成に Tm4 が必須である事もわかり、紡錘体極性を制御する分子機構の一端を明らかにする事が出来た。

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)

[学会発表] (計 10件)

(1) 渡海-西住 紀子, トロポミオシン4による紡錘体と分裂期細胞表層アクチン構造の制御. 第29回染色体ワークショップ 2012年1月25日 仙台

(2) 渡海 紀子, Tropomyosin 4 contributes to the proper spindle orientation and cortical actomyosin organization during mitosis. 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月15、16日 横浜

(3) Noriko Tokai-Nishizumi, Tropomyosin 4, Actin binding protein, contributes to the proper spindle orientation during mitosis and meiosis. 2011 Annual Meeting The American Society for Cell Biology 2011年12月3日 Colorado Convention Center

(4) 渡海 紀子, トロポミオシン4は細胞分裂期表層アクチン構造の安定性と紡錘体極性に寄与する / toropomyosin 4 contributes to the proper spindle orientation and cortical actin organization during mitosis. 第63回日本細胞生物学会大会 2011年6月29日 北海道大学

(5) 渡海 紀子, アクチン結合蛋白質トロポミオシン4の紡錘体形成過程における機能. 第28回染色体ワークショップ 2011年1月11日 石川

(6) Noriko Tokai-Nishizumi, Toropomyosin 4, a possible substrate of polo-like kinase 1, contributes to the proper spindle orientation and cortical actin organization during mitosis. 第16回武田科学振興財団生命科学シンポジウム 2010年12月1日 東京

(7) 渡海-西住 紀子, Global COE International symposium 2010 2010年3月5日 東京大学

(8) 渡海-西住 紀子, アクチン結合蛋白質トロポミオシン4の紡錘体形成過程における機能. 第27回 染色体ワークショップ 2010年1月 御殿場

(9) Noriko Tokai-Nishizumi, Toropomyosin 4, a possible substrate of polo-like kinase 1, contributes to the proper spindle orientation during mitosis. 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月10日 横浜

(10) Noriko Tokai-Nishizumi, polo-like kinase 1の基質候補トロポミオシン4は細胞分裂過程の紡錘体の位置に寄与している 第61回日本細胞生物学会大会 2009年6月4日 名古屋

6. 研究組織

(1)研究代表者

西住 紀子 (Nishizumi Noriko)
東京大学・医科学研究所・技術専門職員
研究者番号: 30396882

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号: