

## 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25年 5月24日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570204

研究課題名（和文） アフリカツメガエル初期発生におけるミトコンドリア酵素の新規機能の解明

研究課題名（英文） A novel function of a mitochondrial enzyme in early development of African clawed frog.

## 研究代表者

岩尾 康宏 (IWAO YASUHIRO)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10144916

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、ミトコンドリア酵素のミトコンドリア外の細胞質中での機能を明らかにすることを目的とし、初期胚細胞周期の維持に必要な新規の分子機構と分化した組織・器官の細胞における細胞分化での普遍的な機能を検証した。とくに、アフリカツメガエルの初期胚細胞周期においてクエン酸合成酵素の分布と挙動を明らかにし、細胞周期転換と原腸胚形成において細胞質中でクエン酸合成酵素と相互作用している分子を明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, we tried to clarify the function of mitochondrial enzymes in the cytoplasm outside mitochondria, with particular attention to a novel molecular mechanism of cellular differentiation in differentiated tissues and organs. We found the distribution and behavior of citrate synthase and the molecules interacting with it during mid-blastula transition and gastrulation.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学、発生生物学

キーワード：細胞分化、細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

動物の初期発生では初期胚型（卵割型）から体細胞型の細胞周期への転換が起き、細胞の分化が始まる。受精後の卵由来の mRNA とタンパク質に依存した制御（母性型）から、接合核由来のゲノム遺伝子の発現を伴う制

御（胚性型）へと細胞周期が転換することは、哺乳類を含む多くの動物の発生過程で普遍的に見られ、発生に必須な現象である。脊椎動物における発生メカニズムの有用な研究モデル動物であるツメガエルでは、胞胚中期以降に体細胞型の分裂周期へ移行し

(Mid-Blastula Transition; MBT)、母性型／胚性型転移 (MZT) の分子メカニズムの解明は初期胚での細胞分化と形態形成のしくみを明らかにするために欠くことができない。我々が独自に開発した透明なツメガエル割球により、これらの細胞周期の調節分子の挙動を生きた割球（細胞）でのバイオイメージングに成功し、個々の細胞の細胞周期 (G1期、S期、G2期、M期) の調節機構を明らかにしてきた。さらに、受精時の初期胚細胞周期の再開において、精子細胞質中のクエン酸合成酵素が卵の Ca<sup>2+</sup> シグナル経路を活性化してM期を終了させることを始めた明らかにした。これは通常はミトコンドリア内で機能しているクエン酸合成酵素が、細胞質中でも重要な機能をもつことを初めて示したものである。また、イモリとツメガエル胚での初期胚細胞周期で核と紡錘体に特異的に発現しているクエン酸合成酵素があり、この発現は体細胞型分裂へ移行後の形態形成に必要であることがわかってきた。これは、脊椎動物の発生においてクエン酸合成酵素がミトコンドリア外の細胞質中で機能していることを国内外で初めて示したものである。本研究では、ミトコンドリア酵素（クエン酸合成酵素）のミトコンドリア外の細胞質中での機能を明らかにすることを目的としており、初期胚細胞周期の維持に必要な新規の分子機構を解明する。さらに、クエン酸合成酵素が分化した組織・器官の細胞においてもミトコンドリア外の細胞質中で機能しているかを明らかにすることにより、脊椎動物の発生過程において細胞分裂や細胞分化で普遍的に機能しているかを検証した。

## 2. 研究の目的

(1) クエン酸合成酵素のミトコンドリア外での分布と挙動の解明 アフリカツメガエルの初期胚細胞周期において、クエン酸合成酵素のミトコンドリア外細胞質中での分布と挙動を明らかにする。とくに、これまでに知られていなかった生きた細胞での核内と紡錘体微小管の周囲の分布を我々が開発した透明化割球イメージングシステムを用いて検証する。

(2) クエン酸合成酵素の初期胚発生における機能の解明 クエン酸合成酵素の初期胚での発現を阻害すること、または亢進することで、細胞分裂や細胞分化におけるこの酵素の役割を解明する。また、細胞質中でクエン酸合成酵素と相互作用している分子を調べる。さらに、この分子のミトコンドリア外での機能に酵素活性が必要であるかどうかを明らかにする。

(3) 細胞質型クエン酸合成酵素の分子機能の解明 細胞質型（高分子型）クエン酸合成酵素がどのような分子構造をもつか、あるいは

どのような修飾を受けているかを明らかにすることで、その機能と活性調節のしくみを明らかにする。

(4) 細胞分化におけるクエン酸合成酵素の役割の解明 クエン酸合成酵素が機能している可能性が高いアフリカツメガエル初期胚の神経形成をモデルとして、核内に分布するクエン酸合成酵素の細胞分化における遺伝子発現調節の機能を明らかにする。これにより、ミトコンドリア外のクエン酸合成酵素が発生過程において普遍的な役割をもつかを検討する。

これらにより、これまでに未知であったミトコンドリア酵素の新規機能を解明することができる。発生における細胞機能の制御に関して新たな概念を提起したいと考えている。

## 3. 研究の方法

(1) クエン酸合成酵素のミトコンドリア外での分布と挙動の解明

アフリカツメガエルの初期胚細胞周期において、クエン酸合成酵素のミトコンドリア外の細胞質中での分布と挙動を明らかにする。これまでの予備的な観察から、高分子型分子が細胞周期の間期には核に、またM期には紡錘体付近に分布していることがわかってきたので、抗クエン酸合成酵素抗体を用いた蛍光抗体法と共焦点レーザー顕微鏡による詳細な観察をおこない、その分布と細胞周期中での挙動を明らかにする。また、実際に生きた細胞内での挙動を確かめるため、GFP 蛍光タンパク質を融合させたクエン酸合成の mRNA を受精卵に注入して GFP 融合タンパク質を発現させる。さらに、我々の開発した透明化割球イメージングシステムを用いた観察により、細胞内での挙動を蛍光顕微鏡用高感度カメラにより生きた細胞で詳細に観察し、核と紡錘体での分布を証明する。

(2) クエン酸合成酵素の初期胚発生における機能の解明

アフリカツメガエルの初期胚では、MBT 期まではS期とM期からなる短い細胞周期をもっているが、その後、細胞の大きさの減少によりS期の伸張し、G2期とG1期が出現して体細胞型周期となり、細胞分化と形態形成が始まる。細胞質型クエン酸合成酵素の初期胚での発現を、特異的にタンパク合成を阻害するアンチセンス・モルフォリノオリゴを用いて低下させるか、mRNA の注入によって発現を増加させて発生での機能を調べる。とくに、細胞周期転換と原腸胚形成における機能を明かにする。また、細胞質中でクエン酸合成酵素と相互作用している分子の同定をおこなう。さらに、酵素の活性中心の欠失した分子を作成し、ミトコンドリア外でのクエン酸合成酵素の機能に酵素活性が必要か、あるいは

は他の分子との相互作用が必要性について検討する。これらにより細胞質型（高分子型）クエン酸合成酵素の分子構造とその作用機序を明らかにする。これらにより、クエン酸合成酵素のミトコンドリア外での分子作用を明らかにする。

### (3) 細胞分化におけるクエン酸合成酵素の役割の解明

ミトコンドリア外のクエン酸合成酵素は、繊毛虫では中間径繊維を形成することが知られており、細胞骨格分子と相互作用している可能性が高い。そこで、クエン酸合成酵素が細胞分化、とくに細胞骨格が重要な神経系細胞の分化と形態維持に果たす役割について明らかにする。アフリカツメガエル胚での神経形成をモデルとして、クエン酸合成酵素の分布を蛍光抗体法によって調べ、特異的な分子の発現を検索する。さらに、アンチセンス・モルフォリノオリゴを用いた機能阻害により、後期発生における形態形成での役割を追求する。以上の研究から、ミトコンドリア外のクエン酸合成酵素の役割とその機能の全容を明らかにできると考えており、これまでに未知であったミトコンドリア酵素の初期発生における新規機能を解明することができる。クエン酸合成酵素がミトコンドリア外でも重要な機能をもつことを明らかにすることで、脊椎動物の発生さらに細胞機能の制御に新たな分野を開拓する。

## 4. 研究成果

### (1) クエン酸合成酵素のミトコンドリア外での分布と挙動の解明

アフリカツメガエルの初期胚細胞周期において、クエン酸合成酵素のミトコンドリア外の細胞質中での分布と挙動を明らかにした。これまで、高分子型分子が細胞周期の間期には核に、またM期には紡錘体付近に分布していることがわかってきたが、抗クエン酸合成酵素抗体を用いた蛍光抗体法と共焦点レーザー顕微鏡による詳細な観察をおこない、その分布と細胞周期中での挙動を明らかにした。さらに、実際に生きた細胞内での挙動を確かめるため、GFP 蛍光タンパク質を融合させたクエン酸合成の mRNA を受精卵に注入して GFP 融合タンパク質を発現させ、遠心による透明化割球イメージングシステムを用いた観察により、細胞内での挙動を生きた細胞で詳細に観察し、核と紡錘体での分布を証明した。

### (2) クエン酸合成酵素の初期胚発生における機能の解明

アフリカツメガエルの初期胚では、MBT 期まではS期とM期からなる短い細胞周期をもっているが、その後、細胞の大きさの減少によりS期の伸張し、G2期とG1期が出現して体細胞型周期となり、細胞分化と形態形成が

始まる。細胞質型クエン酸合成酵素の初期胚での発現を、特異的にタンパク合成を阻害するアンチセンス・モルフォリノオリゴを用いて低下させた。また、mRNAの注入によって発現を増加させて発生での機能を調べた。とくに、細胞周期転換と原腸胚形成における機能を明かにした。細胞質中でクエン酸合成酵素と相互作用している分子、とくに細胞骨格分子を一部同定し、さらに検討を続けている。

### (3) 細胞質型クエン酸合成酵素の分子機能の解明

細胞質型クエン酸合成酵素とミトコンドリア型クエン酸合成酵素の細胞内局在化シグナルの相違点を明らかにするため、高分子型と低分子型の酵素の機能を明らかにした。翻訳後修飾の可能性も考えられるので、クエン酸合成酵素分子のリン酸化、糖鎖付加、部分切断の有無などを詳細に検討した。さらに、酵素の活性中心の欠失した分子を作成し、ミトコンドリア外でのクエン酸合成酵素の機能に酵素活性が必要か検討した。これらにより細胞質型（高分子型）クエン酸合成酵素の分子構造とその作用機序を明らかにした。

### (4) 細胞分化におけるクエン酸合成酵素の役割の解明

ミトコンドリア外のクエン酸合成酵素は、繊毛虫では中間径繊維を形成することが知られており、細胞骨格分子と相互作用している可能性が高い。そこで、クエン酸合成酵素が細胞分化、とくに細胞骨格が重要な神経系細胞の分化と形態維持に果たす役割について明らかにした。アフリカツメガエル胚での神経形成をモデルとして、クエン酸合成酵素の分布を蛍光抗体法によって調べ、特異的な分子の発現を検索した。さらに、抗クエン酸合成酵素抗体を用いて胚発生における形態形成での役割を追求した。これらにより、ミトコンドリア外のクエン酸合成酵素の発生過程における普遍的な役割を明らかにした。

クエン酸合成酵素が細胞骨格上で形成される構造の中でも母系 mRNA の機能調節に関わる P-body とどのように相互作用しているかを検討した。最近、哺乳類精子においてもクエン酸合成酵素がミトコンドリア外の細胞質中に多量に分布していることがわかった。これは、細胞質型クエン酸合成酵素が脊椎動物の発生過程で広く機能していることを示唆している。これらにより動物胚でのミトコンドリア外での酵素の機能を明らかにした。

## 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2件)

① 上野秀一、「ツメガエル胚の MBT 期に出現

する P-body における母性 mRNA 分解機構」、  
第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月  
13 日、福岡国際会議場（福岡市）

② 岩尾 康宏 "A novel role of  
extramitochondrial citrate synthase  
during Xenopus early embryonic  
development"、第 43 回日本発生生物学会、  
2010 年 6 月 21 日、国立京都国際会館（京都  
市）

[その他]

ホームページ等

[http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/  
~suenoscb/index.html](http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~suenoscb/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩尾 康宏 (IWAO YASUHIRO)  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：10144916

### (2) 研究分担者

上野 秀一 (UENO SHUICHI)  
山口大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：80363092

### (3) 研究連携者

( )  
研究者番号：