

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 2 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370091

研究課題名(和文)極体形成から卵割への分裂システム転換をもたらす卵母細胞の表層リモデリング

研究課題名(英文)Cortical changes of the amphibian oocytes during the maturation.

研究代表者

大隅 圭太 (Ohsumi, Keita)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20221822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,500,000円、(間接経費) 4,650,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、無尾両生類アフリカツメガエルの卵母細胞を用いて細胞表層の単離法を確立し、成熟前の卵母細胞と成熟後の卵の表層構成蛋白を比較した。その結果、表層に含まれるアクチン結合タンパク、アニリンの量が卵成熟期に2倍以上に増加することが見いだされた。また、特異抗体を用いたアニリン抑制や、アンチセンス法を用いたアニリンの新規合成阻害実験の結果などから、この増加は、第一極体放出、および受精後の卵割に不可欠であることが証明された。よって、卵成熟期には、アニリンを量的に増加させるという表層変化が起こり、これによって極体形成や受精後の卵割を保障するしくみがあることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed a method to isolate cell cortices from oocytes and eggs of the anuran amphibian *Xenopus laevis*. Using isolated cortices of *Xenopus* oocytes and eggs, we investigated the protein components of cell cortices of immature oocytes and mature eggs. We have found that the amount of anillin, an actin-binding protein, increased more than twice during oocyte maturation. To know the physiological meaning of the increase in the anillin amount, the newly synthesis of aniline during oocyte maturation was inhibited by the use of antisense oligonucleotides. We also inhibited the anillin function with anti-anillin antibodies. The results demonstrated that the increased anillin is required for the formation of the first polar body and also for cleavage division after fertilization. Thus, it is suggested that the cell cortex should change during oocyte maturation to render oocytes more competent in undergoing cytokinesis.

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：生殖細胞 細胞質分裂 細胞皮層

1. 研究開始当初の背景

動物の卵母細胞における減数分裂では、微小な極体と巨大な卵母細胞への著しい不等分裂が起こる。一方、減数分裂終了後の受精卵は、胚形成のために急速に細胞数を増加させる必要があり、そのために、卵割と呼ばれる、卵全体におよぶ等分裂もしくは低い程度の不等分裂を行う。卵母細胞と受精卵にみられるこのような分裂様式の顕著な違いは非常に興味深く、また、細胞質分裂研究のモデル系ともなる。申請者は、卵母細胞の表層には収縮環形成能が欠けており、卵母細胞が卵へと変わる卵成熟の過程で表層のリモデリングが起こることによって表層全体に収縮環形成能が賦与され、不等分裂から等分裂への分裂システムの転換が可能になるという作業仮説をたてた。この仮説の検証には、卵母細胞や受精卵の表層の構成成分を生化学的に比較解析し、卵成熟期における表層リモデリングの分子の実態を解明することが不可欠である。しかしながら、細胞表層をマスを単離する方法が確立されておらず、細胞表層の生化学的解析はほとんどなされてこなかった。申請者は、この問題に取り組むため、ツメガエル卵の表層単離法を開発し、表層タンパク質の生化学的解析を行うため、本研究を立案した。

2. 研究の目的

動物の卵母細胞では局所的な収縮環形成による著しい不等分裂によって極体が形成される。それに対し、受精卵では卵表層の全域にわたる収縮環形成によって卵割と呼ばれる等分裂が起こる。この卵母細胞と受精卵の細胞分裂様式の根本的な違いは、卵母細胞の表層が、限定された領域以外では収縮環形成能を欠き、卵成熟期に起こる表層のリモデリングによって受精卵の収縮環形成能が確立されることによるとの作業仮説を本研究では立て、これを検証するために、カエル卵母細胞の単離表層を用いて、卵成熟期における卵母細胞の表層タンパク質の動態を生化学的に解析する。ほとんどなされてこなかった細胞表層の生化学的解析によって表層リモデリングの分子の実態を明らかにし、不等分裂から等分裂への細胞分裂システム転換の分子基盤を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

解析対象となる単離表層のクオリティがきわめて重要であることから、まず、表層単離法の電気泳動解析への最適化を検討した後、単離表層の電気泳動解析を行なって卵成熟進行に伴う表層タンパク質の変動を詳細に調べ、卵成熟期の表層リモデリングに関与することが示唆されるタンパク質を同定した。同定されたタンパク質については、cDNA をクローニングし、抗体および、変異タンパク質を作製した。並行して、収縮環構成タンパク質や制御タンパク質などの既知のタンパク質について、cDNA のクローニングお

よび特異抗体と変異タンパク質の作製を行った。卵成熟期および卵割期の表層タンパク質の動態を特異抗体を用いたウエスタン解析、免疫蛍光染色、タグを付加した融合タンパク質の局在追跡などの方法によって調べた。また、種々の変異タンパク質の導入、特異抗体による機能阻害、アンチセンスオリゴによる合成阻害などの手法を用いて、表層タンパク質の機能を解析した。成熟前後の卵母細胞で明瞭に異なる表層タンパク質については、その動態の制御機構を検討した。それに基づいて卵成熟期の表層タンパク質の動態を実験的に操作し、操作した卵を成熟後に賦活して分裂溝様構造が形成されるかを調べて、卵母細胞における表層リモデリングの生理的意義を検討した。

4. 研究成果

本研究においては、まず、卵母細胞、成熟卵の表層単離法を確立し、それを用いて表層タンパク質の解析を行った。さらに、アクチン調節タンパク質のいくつかが卵成熟期の皮層リモデリングに関与することが示唆されたので、その各々について、特異抗体を作製し、それによる機能阻害実験を通して、その役割を解析した。

(1) 卵表層単離法

ポリシアノアクリレート系の接着剤を用いて大量の卵の皮層をシート状に単離し、これをもとに、種々の条件で洗浄、タンパク質の抽出を行い、そこに含まれるタンパク質成分をウエスタン解析した。その結果、生理食塩水の水流で丹念に細胞質、卵黄を除き、電気泳動用サンプルバッファーで直接抽出する方法で十分であることが示された。表層タンパク質の未成熟卵と成熟卵を比較したところ、収縮環の制御に重要なアクチン結合分子アニリンが卵成熟過程で増加することを見出した。アニリン以外のアクチン結合分子やアクチン制御分子については、調べた限り増加しているものなかったことから、成熟過程および受精後の量の増加はアニリンの機能上、重要な特徴であることが示唆された。

(2) アニリン

アニリン量の増加が卵成熟過程でどのような役割を果たすのかを調べるために、アンチセンスオリゴによって成熟過程のアニリン増加を抑制した。その結果、極体放出が阻害された。アンチセンスオリゴと同時にアニリンの mRNA を顕微注射することでアニリン量を正常レベルまで回復させたところ、極体放出阻害は回復した。極体放出にはアニリンの機能が重要なのかどうかをさらに検討するため、アニリンの特異抗体により機能阻害を図ったところ、極体放出は著しく阻害された。これらの結果から、アニリンは極体放出に重要な役割を果たしており、卵成熟過程の増加は極体放出に必要であることが明らか

となった。次に、卵成熟過程のアニン量増加が卵割と関連するのかどうかを検討するため、まず *in vitro* 成熟卵の受精実験系を確立した。*In vitro* 成熟卵の卵膜をピンセットで剥離し、あらかじめ卵ゼリー抽出液で活性化させた精子と懸濁すると、*in vitro* 成熟卵の受精および卵割が正常に進行することが確認された。この系を用いて、アンチセンスオリゴにより卵成熟期のアニン増加を抑制した *in vitro* 成熟卵を受精させたところ、卵割が阻害された。この阻害は、mRNA によるアニン量の回復により回復した。また、特異抗体による機能阻害によって卵割は阻害された。以上の結果から、アニンは卵割にも必要な分子であり、卵成熟過程で量が増加することは卵割においても必須条件であることが明らかとなった。

アニンの特異抗体を用いて卵母細胞および卵割時の局在を免疫染色によって観察したところ、アニンは卵母細胞においては細胞表層および卵核胞内に強いシグナルが検出され、卵活時の卵においては動物極側の細胞質および皮層、そして収縮環に多く存在していることが確認された。よって、培養細胞とは異なり、間期においても細胞表層に多量に存在すること、また卵割中のアニンの局在が本研究によって初めて明らかになった。

(3) コフィリン

ツメガエルのコフィリン (XAC: *Xenopus* ADF/cofilin) に対する特異抗体 (-XAC Ig) を作製し、未成熟卵に顕微注射することで XAC を阻害し、皮層リモデリングにおけるコフィリンの役割を検討した。-XAC Ig を未成熟卵に顕微注射後、卵成熟を誘起すると、第一極体の放出時期に 80% 以上の卵で動物半球の色素分布に乱れ (皮層異常) が生じ、さらに極体放出が正常に起こらなくなった。次に、*in vitro* 成熟卵の媒精実験を行ったところ、-XAC Ig 注射卵では、媒精後の分裂溝が正常に形成されなかった。また、皮層異常が生じた成熟卵の皮層の F-アクチンをファロイジン染色して観察したところ、対照卵に比べ、皮層アクチンの網目構造が緩く、壊れやすくなっていた。しかし、皮層に含まれるアクチンを定量化したところ、-XAC Ig 注射卵と対照卵で有意な差は見られなかった。さらに、コフィリンがツメガエル卵のアクチンダイナミクスの制御に関わるかを、卵抽出液の F-および G-アクチンを超遠心分離により解析したところ、-XAC Ig を用いてコフィリンを免疫除去した卵抽出液では G-アクチンの量が減少することが示された。これらの結果は、卵成熟期の皮層リモデリングにおいて、コフィリンが重要な調節的役割を果たすことを強く示唆する。さらに、皮層リモデリングが正常になされることが、受精卵の卵割に必要であり、コフィリンは分裂溝形成能の確立のために重要な因子の一つであ

ることを強く示唆している。また、コフィリンの阻害によって、アクチンの G-アクチン化が抑制され、成熟卵皮層のアクチン網目構造に異常が生じることから、コフィリンは皮層アクチンのダイナミクスにも関与していることが示唆される。これは、細胞質での G-アクチン化が抑制されるため、皮層アクチンの構造構築に障害が生じたためという可能性が示唆された。

(4) モエシン

ツメガエルのモエシンに対する特異抗体 (-moe) を作製し、-moe Ig の卵への影響を調べるため、卵成熟前、成熟中、成熟後の卵母細胞および賦活直後の卵に、-moe Ig または正常ウサギ抗体 (con Ig) を注射した。その結果、-moe Ig を成熟前および成熟中に注射した卵では、注射後の経過時間に関わらず、卵成熟の後期に色素の分布に異常 (表層異常) が観察された。一方、全ての con Ig 注射卵では表層異常は見られなかった。また成熟前の母細胞に -moe Ig を注射しても、卵成熟を誘起しなければ表層異常は起こらなかった。これらの結果は、卵成熟期にモエシンの機能が阻害されると、卵成熟の後期に表層異常が誘起されることを示しており、卵成熟期の表層構築にモエシンが関与していることが示唆された。また、成熟中に -moe Ig を注射した卵に賦活収縮能があるかを調べた結果、表層異常の有無に関わらず、賦活収縮が正常に起こった。一方、賦活後の表層収縮波 (SCW) の有無を観察した結果、成熟前および成熟中に -moe Ig を注射した卵では SCW が出現せず、成熟後に注射したものは出現した。これらの結果は、賦活収縮と SCW はモエシン抗体に対する感受性が異なることから、別の表層細胞骨格制御システムに基づく可能性が示唆された。最後に、-moe Ig による SCW の出現抑制が細胞周期の進行異常を介したものを検討するため、細胞周期の進行に伴ってタンパク質量が増減する、細胞周期制御因子サイクリン B 量の -moe Ig 注射卵における変化を調べた。その結果、-moe Ig を注射した卵のサイクリン B は周期的に合成、分解されていることが示され、SCW の出現抑制は、細胞周期の進行異常によるものではないことが確認された。以上の結果から、卵成熟期にはモエシンが関与する卵表層の構築がなされ、それによって SCW を生起させる卵表層の細胞骨格システムが確立されることが示唆された。

本研究では、ツメガエル卵の表層単離法を確立し、*in vitro* で成熟させたツメガエル卵を用いて、人工受精および、卵割が正常に進行させる系を確立した。これらは、いずれも新規のもので、細胞表層の生化学的解析、分裂溝形成の制御機構解明に貢献することが期待される。これらの系を適用することにより、ツメガエル卵の成熟過程と卵割の関連性

を解析することが可能となった。今後は、培養細胞の分裂において重要な役割を果たす分子が卵成熟過程および卵割ではどのような機能や局在性を示すのかを解析することで、卵割における分裂溝形成の詳細なメカニズムを明らかにできると期待される。また、本研究室では、アクチン結合能を有し細胞分裂に参与することが示唆されている複数の分子が、成熟過程の卵表層形成に重要な役割を果たすことが確認された。これらの分子についても、卵成熟期の表層形成において果たす役割が受精後のどのような現象と関連するのかを解明していくことにより、極体形成から卵割への分裂システムの転換を引き起こす表層リモデリングの分子基盤が明らかになると期待される。

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)

Jullien, J., Miyamoto, K., Pasque, V., Allen, G., Bradshaw, C.R., Garrett, N.J., Halley-Stott, R.P., Kimura, H, Ohsumi, K., Gurdon, J.B. (2014). Hierarchical molecular events driven by oocyte-specific factors lead to rapid and extensive reprogramming. *Mol. Cell*, 55, 524-536.

DOI:10.1016/j.molcel.2014.06.024
Hara, Y., Iwabuchi, M., Ohsumi, K., Kumura, A. (2013). Intranuclear DNA density affects chromosome condensation in metazoans. *Mol. Biol. Cell*, 24, 2442-2453.

DOI:10.1091/mcb.E13-01-0043

Matsuo, K., Ohsumi, K., Iwabuchi, M., Kawamata, T., Ono, Y., and Takahashi, M. (2012). Kendrin is a novel substrate for separase involved in the licensing of centriole duplication. *Curr. Biol.* 22, 915-921.

DOI:10.1016/j.cub.2012.03.048

Hasebe, T., Kajita, M., Iwabuchi, M., Ohsumi, K., and Ishizuya-Oka, A. (2011). Thyroid hormone-regulated expression of nuclear lamins correlates with dedifferentiation of intestinal epithelial cells during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Dev. Genes Evol.* 221, 199-208.

DOI:10.1007/S00427-011-0371-7

[学会発表](計12件)

白井菜月、小田春佳、浦菜緒子、大隅圭太、岩淵万里、アフリカツメガエル初期胚

における核アクチンの解析、第36回日本分子生物学会、2014年12月25日、横浜
浦菜緒子、今井薫、赤坂茉莉、岩淵万里、大隅圭太、アクチンフィラメントの細胞内動態を再現するツメガエル卵抽出液の調製、第35回日本分子生物学会、2014年12月3日、神戸

岩淵万里、味村知明、今井薫、赤坂茉莉、大隅圭太、卵および初期胚に特異的な細胞骨格の調節機構、題84回日本動物学会、2013年、9月27日、岡山

岩淵万里、本田皓子、小田春佳、大隅圭太、アフリカツメガエル初期胚細胞の核システム、第65回日本細胞生物学会、2013年6月20日、名古屋

赤坂茉莉、古屋亨、山口亜優美、岩淵万里、大隅圭太、アフリカツメガエル卵を用いた細胞表層単離法の確立、第83回日本動物学会、2012年9月14日、大阪

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/laboratory/dcb.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

なし

(3) 連携研究者

岩淵 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

赤坂 茉莉 (AKASAKA, Mari)

名古屋大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号: 30590377