

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 20 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580403

研究課題名(和文) 哺乳動物卵における中間径線維の再配置の意義とこれに関わるシグナル伝達経路の解明

研究課題名(英文) Physiological Significance of Redistribution of Intermediate Filaments in the Mammalian Oocytes and Its Signal Transduction Pathways

研究代表者

鈴木 裕之 (SUZUKI, HIROYUKI)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：50211313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物卵の成熟過程における中間径線維の分布と機能について検討した。ブタ卵ではケラチンとビメンチンは明確ではなかったが、ニューロフィラメント(NF)、GFAP、ネスチンおよびデスミンの卵成熟に伴う動態を明らかにした。NF、GFAPおよびデスミンは卵の成熟に伴い蛍光強度が増加したが、ネスチンは減少した。興味深いことに、NF、GFAPおよびネスチンは脂肪滴移動への関与が示唆された。さらにNFは、染色体分離に関与する可能性が、またデスミンはマイクロフィラメントと協働して、分裂装置を卵表層へ配置している可能性が示唆された。細胞周期因子ならびにRhoキナーゼが中間径線維の分布に及ぼす影響も考察した。

研究成果の概要(英文)：Function and redistribution of intermediate filaments in the mammalian oocytes during maturation were examined by confocal laser scanning microscopy. In porcine oocytes, distributional changes of keratin and vimentin were not clear, but those of neurofilaments (NF), GFAP and nestin were clarified during oocyte maturation. Interestingly, it is suggested that NF, GFAP and nestin may be included in the movement of lipid droplets in the ooplasm and that NF may function in chromosomal segregation at the second meiotic division. Furthermore, desmin may participate in anchoring the meiotic apparatus to the cortical region of oocytes, collaborating with actin microfilaments. Effects of the cell-cycle regulating factors and Rho kinase on the cytoskeletal architecture of the intermediate filaments were also discussed.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：卵母細胞 卵成熟 中間径線維 ニューロフィラメント GFAP ネスチン デスミン 哺乳動物

## 1. 研究開始当初の背景

これまで中間径線維は種々の体細胞を機械的ストレスから物理的に保護する構造物であると考えられてきた。しかし最近の研究により、中間径線維が非常に動的で、多くの重要な生理的機能、例えば細胞小器官の配置、シグナル伝達系、細胞極性の発現および遺伝子発現制御と関連することが示唆されている。

申請者はこれまで、哺乳動物卵における微小管とアクチン・マイクロフィラメントの動態、ミトコンドリアの再配置に関わる両者の機能分担について研究を進めてきた。これらの研究を遂行する中で、微小管とマイクロフィラメントの機能だけでは説明できない現象を観察している。

そこで本研究では、哺乳動物卵では全く検討されていない第3の細胞骨格と位置づけられている中間径線維に着目し、これらの再配置と減数分裂 - 受精 - 卵割との関連、ならびにそれらに関わる Rho キナーゼなどによるシグナル伝達経路ならびに細胞周期制御因子とを統合した分子制御機構を解析しようとした。

## 2. 研究の目的

(1)申請者はこれまで、哺乳動物卵に中間径線維ケラチンが存在し、卵成熟中にその分布が劇的に変化することを観察している。そこで、卵子に存在すると想定される各種の中間径線維を網羅的に検索する。

(2)ついで、各種の中間径線維の再配置の生理的意義とそれらを劇的に変化させる制御機構を検討する。

## 3. 研究の方法

(1)卵巣における中間径線維ケラチン、ビメンチン、ネスチンおよびデスミンの組織免疫化学的検討

ブタ卵巣を組織免疫化学的に検討し、卵

巣中の各組織における中間径線維ケラチン、ビメンチン、ネスチンおよびデスミンの分布を観察した。

(1-2)卵子中に存在が確認された場合には、ウエスタン・ブロット法により各成熟ステージでの濃度変化を追跡した。

(2) ハムスターの卵胞発育に伴う収縮性タンパク質アクチン、ミオシンおよびデスミンの分布変化

成熟雌ゴールデンハムスター卵巣および卵母細胞を免疫組織化学法により上記収縮性タンパク質アクチン、ミオシンおよびデスミンの局在を調べた。また、卵核胞期(GV期)、第1減数分裂中期(MI期)および第2減数分裂中期(MII期)の卵母細胞における各タンパク質の局在を共焦点レーザー顕微鏡法により観察した。

(3) ブタ卵母細胞における中間径線維ニューロフィラメント、GFAP およびネスチンの分布と機能

ブタ卵を体外成熟培養して、神経系の中間径線維であるニューロフィラメント(NF)、グリア細胞線維性酸性タンパク質(GFAP)およびネスチンの動態を共焦点レーザー顕微鏡法により追跡し、それぞれの生理的機能について考察した。

(4) ブタ卵母細胞における収縮性中間径線維デスミンの分布と機能

ブタ卵を体外成熟培養して、収縮性の中間径線維であるデスミンの動態を共焦点レーザー顕微鏡法により追跡し、その生理的機能について考察した。

(5)シグナル伝達機構が卵細胞骨格に及ぼす影響

卵成熟に伴い各ステージごとに特異的な動態を示す中間径線維のそれを指標として、シグナル伝達分子の影響を検討した。

(6) 細胞周期制御因子が卵細胞骨格系に及ぼす影響

細胞周期制御因子(MAPK や MPF)の阻

害剤(U0126 や Roscovitine)を卵に作用させて、細胞骨格の分布への影響を共焦点レーザー顕微鏡法により調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 卵巣における中間径線維ケラチン，ビメンチン，ネスチンおよびデスミンの組織免疫化学的検討

卵巣組織では，ビメンチン，ネスチンならびにデスミンは血管内皮細胞に共通して存在した。まず，ビメンチンは胞状卵胞に発育した卵胞の顆粒層細胞，特に基底部側と内腔側に染色性が認められた。しかし，卵母細胞はビメンチンの明確な陽性反応を示さなかった。このことから，ビメンチンは卵子に直接というよりはむしろ卵胞発育に関与していることが示唆された。次に，ネスチンは内卵胞膜細胞と卵母細胞に局在していた。内卵胞膜細胞は内分泌細胞であることが知られており，ネスチンとの関連性がある事が示唆された。また，卵母細胞においても局在が確認されたので，卵においてもネスチンが機能を持つ可能性がうかがわれた。

(1-2)ウエスタン・プロット法による中間径線維のステージ別濃度変化

GV 期の卵母細胞で最もネスチン濃度が高く，卵が成熟するにつれネスチン濃度が低下した。最後に，デスミンは成熟した卵母細胞の表層に強染した。その他の卵胞組織には存在しなかった。したがって，卵母細胞の表層収縮と卵胞腔の形成に関与しているものと推察された。

(2) ハムスターの卵胞発育に伴う収縮性タンパク質アクチン，ミオシンおよびデスミンの分布変化

卵子の減数分裂は卵表層で非対称性に起こり，これに伴い細胞小器官や特定の分子の分配が起こる。これらの現象には細胞骨格を含む収縮性のタンパク質が関与するが，

その詳細は不明な点が多い。そこで，本研究では卵胞発育に伴うハムスター卵胞内のアクチン，ミオシンおよびデスミンの分布変化を追求した。その結果，原始卵胞と一次卵胞では，いずれも陰性であった。二次卵胞以降の外卵胞膜では卵胞を被うように強い陽性反応が観察された。これらアクチン，ミオシンおよびデスミンの共存部位は細胞の形態学的特徴から平滑筋と判断された。ミオシンについては表層に貯留する領域が局在するのも認められた。卵母細胞においては卵細胞膜直下にアクチンとミオシン抗体によるリング状の細いバンドが観察された。これに対し，デスミンは卵成熟に伴い卵表層にやや厚みのある層状（厚さが約 20  $\mu\text{m}$ ）に分布変化するのが観察された。以上の結果から，卵母細胞における収縮性タンパク質，とくにミオシンとデスミンも卵母細胞の成熟に係わる何らかの機能を果たしている可能性が示唆された。

(3) ブタ卵母細胞における中間径線維ニューロフィラメント，GFAP およびネスチンの分布と機能

ラット卵にニューロフィラメント(NF)が発現し，卵成熟と退行に関与するが，不明な点が多い。そこで，ブタ卵母細胞における神経系中間径線維 NF，GFAP，ネスチンの分布とその機能について検討した。

その結果，卵細胞質には上記 3 種全ての中間径線維から構成される網目構造が認められた。また，ブタ卵母細胞には多胞性の脂肪滴が存在するが，微分干渉顕微鏡像と蛍光画像を比較すると中間径線維のネットワークが脂肪滴を網の目のように包んでいるものと推察された。卵細胞質の各中間径線維の平均蛍光強度は，MI 期から MII 期にかけ NF は有意に増加したが，ネスチンは減少した。他方，GFAP では卵成熟中有意な濃度変化は見られなかった。とくに，NF は MI 期で分裂装置の周囲に集中し始め，

MII 期では分裂装置の  $\gamma$ -チューブリンの局在に重なるように、すなわち紡錘糸に重なるように陽性反応を示した。したがって、ブタ卵の NF ,GFAP およびネスチン中間径線維は単に細胞骨格としての機能だけでなく、脂肪滴移動への関与が伺われた。さらに NF は、減数分裂時の染色体分離に関与する可能性が示唆された。

#### (4)ブタ卵母細胞における収縮性中間径線維デスミンの分布と機能

哺乳動物卵における中間径線維の生理学的な意義を明らかにするために、ブタ卵母細胞における中間径線維デスミンの分布と機能について検討した。

その結果、ブタ卵母細胞にデスミン検出され、蛍光強度は GV 期から MII 期にかけて増加する傾向があった。MI 期と MII 期にかけて分裂装置にデスミンが強く検出され、細胞質と比べて有意に増加した ( $P<0.01$ )。その蛍光強度は、一次極体の蛍光強度に匹敵して強かった。デスミンに強染される部分はマイクロフィラメントの局在と重なっていた。したがって、デスミンは減数分裂装置の周辺に局在し、マイクロフィラメントと協働して、卵表層へ分裂装置を配置している可能性が示唆された。

#### (5) シグナル伝達機構が卵細胞骨格に及ぼす影響

##### マイクロフィラメント形成への影響

Rho キナーゼ阻害剤で処理した卵母細胞のマイクロフィラメントの染色性が明らかに低下していた。また、前述の通り第 1 極体の放出が抑制され、卵丘細胞の膨化も阻害された。したがって、Rho キナーゼはマイクロフィラメントの形成や極体放出に重要な期トンをもちと判断された。

##### 微小管形成への影響

Rho キナーゼ阻害剤で処理した卵母細胞において紡錘体の形成には影響は全く認められなかった。したがって、Rho キナーゼ

は微小管への形成には影響しないものと判断された。

##### 中間径線維形成への影響

中間径線維のうちネスチンについて Rho キナーゼ阻害処理を施したが、ネスチンの分布には影響が認められなかった。

#### (6) 細胞周期制御因子が卵細胞骨格系に及ぼす影響

cdc2 の阻害剤である Roscovitine との 12 時間培養後では、卵母細胞の 66.7% (20/30) は GV 期のままで、ケラチン分布も GV 期の特徴を示す「表層」パターンのままであった。次いで、MAP キナーゼ阻害剤である U0126 と培養した結果では、ほとんどの卵母細胞 (83.9%, 26/31) が MII 期であり、それらのほとんど (76.9%, 20/26) は、MI 期のケラチン分布の特徴を示す「断片化」パターンであった。以上から、減数核分裂の進行のように、MPF はケラチン線維の再編のために必要で、MAP キナーゼ阻害剤は「断片化」の MI パターンから「顆粒状」の MII パターンへのケラチン線維の再編に関与していることが明らかとなった。

#### 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)

##### [雑誌論文](計 1 件)

Kabashima, K., Yoshinaga, D., Fang, J., Matsuzaki, M. and Suzuki, H.: Cell cycle-dependent dynamics of cytoskeleton involving mitochondrial redistribution in hamster embryos. *Reprod. Dom. Anim.*, 査読有, 2013, 48(2):267-271.

##### [学会発表](計 6 件)

鈴木裕之, 塩崎洋輔, 佐藤大樹, 佐藤 梓, 滝浦 舞, 房 家シン, 松崎正敏: ブタ卵母細胞における中間径線維 Neurofilament ,GFAP および Nestin の分

布と機能. 日本畜産学会第 119 回大会 (宇都宮大学), 2015.

Murase, Y., Kimura, S., Matsuzaki, M., Fang, J. and Suzuki, H.: Distributional changes of contractile proteins, actin, myosin and desmin during follicle growth in the hamster. *Hirosaki University - Yanbian University Joint Symposium on Applications of Local Bioresources, Hirosaki*, 2014.

Yamaguchi, M., Watanabe, A., Suzuki, H. and Matsuzaki, M.: Improved growth performance of embryo-transferred Japanese Black calves born to and nursed by Japanese Shorthorn cows in cow-calf grazing systems. *International Symposium on Ruminant Physiology (Cambera, Australia), Proceedings of the 30th biennial conference of the Australian society of Animal Production*, 381, 2014.

村瀬優希・木村壮志・松崎正敏・房家シン・鈴木裕之: ハムスターの卵胞発育に伴う収縮性タンパク質アクチン、ミオシンおよびデスミンの分布変化. 日本畜産学会第 118 回大会 (つくば国際会議場), 2014.

椛嶋克哉, 房家シン, 松崎正敏, 鈴木裕之: ハムスター卵成熟過程におけるミトコンドリアの再配置は, 微小管ではなくアクチン繊維によって制御される. 日本哺乳動物卵子学会第 53 回大会 (千里ライフサイエンスセンター), 2012.

椛嶋克哉・房家シン・松崎正敏・鈴木裕之: アクチン繊維がハムスター卵成熟過程のミトコンドリアを再配置する. 東北畜産学会第 62 回大会 (秋田市). 2012.

〔図書〕(計 2 件)

Suzuki, H.: Chapter 7. Cytoskeleton and

regulation of mitochondrial translocation in the mammalian eggs. In: Schatten, H. (ed.) *The Cytoskeleton in Health and Disease*, Springer Science + Business Media, New York. 2015 (in press).

Suzuki, H.: Chapter 13. Possible functions of intermediate filaments in mammalian ovarian follicles and oocytes. In: Schatten, H. (ed.) *The Cytoskeleton in Health and Disease*, Springer Science + Business Media, New York. 2015 (in press).

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 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 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/lab/3/animsci/reference.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 裕之 (SUZUKI HIROYUKI)  
弘前大学・農学生命科学部・教授  
研究者番号 : 5 0 2 1 1 3 1 3

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :