

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650005

研究課題名(和文)体細胞核の転写リプログラミングを誘起する卵無細胞系の確立

研究課題名(英文)A cell-free system of Xenopus eggs that induces transcriptional reprogramming

研究代表者

岩淵 万里 (IWABICHI, MARI)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40275350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物における細胞の分化能調節の分子機構解明は生命科学の重要課題の一つである。カエル卵における核のリプログラミングには核のF-アクチンが重要との、Gurdonらの近年の報告に基づき、本研究では、カエル卵無細胞系を用いて核内アクチン動態を再現する核質抽出液を調製し、これを用いて、転写制御における核F-アクチンの役割検討を試みた。核質抽出液の調製法は確立されなかったが、カエル卵で核にF-アクチンを発達させる、初期胚特異的なアクチン調節機構を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Understanding the regulatory mechanism of the cellular potency for differentiation is one of important goals in biological sciences. Based on a recent report by the Gurdon's group that nuclear F-actin is involved in transcriptional reprogramming induced in the frog oocyte nucleus, we tried to prepare nucleoplasmic extract by the use of frog egg extracts that are able to reproduce intracellular actin dynamics. We have not been successful in its preparation because of technical difficulties but instead have found that in eggs and blastula cells, the early embryonic subtype of an actin-binding protein promotes actin polymerization in the nucleus.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核アクチン 卵無細胞系

1. 研究開始当初の背景

細胞の分化能がどのように調節されているか、その分子機構の解明は、生物学、医学を含む生命科学の重要課題の一つである。4つの転写因子の導入によって分化した細胞に多分化能を回復させた、Yamanaka らによる iPS 細胞の創出は (Takahashi & Yamanaka, *Cell*, 2006)、細胞の分化能の調節が基本的には転写制御によることを実証した点で、文字通り画期的なものであった。しかし、その分子機序は多くが未解明である。一方、細胞核の分化能については、除核卵への核移植による研究が古くからなされてきた。除核卵への核移植によってクローン動物が作出されることから、限定的な分化能しかない体細胞の核が、卵に移植されることで多分化能を回復する、「核のリプログラミング」が起こることが示され、卵に存在するリプログラミング因子の同定が試みられてきた。近年、Gurdon らによってなされた実験では、カエル卵母細胞の巨大な核 (germinal vesicle, GV) の中に移植された体細胞核では、iPS 細胞への転換を誘起する転写因子の1つ、Oct4 の転写活性化が誘起され、この転写のリプログラミングには、カエル卵母細胞では古くから知られている核の F-アクチンの働きが不可欠であるとされた (Miyamoto et al., *Genes & Dev.*, 2011)。さらに、GV に含まれるアクチン調節蛋白質の働きが、受精後の胚発生に必須の役割を果たすことが示された (Miyamoto et al., *Science*, 2013)。また、マウスでは、移植核のリプログラミングに卵の核の内容物 (核質) が重要であることが示されている (Egli & Eggan, *Develop.*, 2010)。こうした近年の知見は、核におけるアクチン細胞骨格の制御が、卵における核のリプログラミングに重要な役割を果たすことを示唆している。しかし、卵の核におけるアクチン細胞骨格の働きについては、F-アクチンが存在するののかも含めて、不明であった。

2. 研究の目的

ヒトを含む多細胞動物において、細胞の分化能調節の分子機構解明は、生物学、医学を含む生命科学の重要課題の一つである。iPS 細胞の創出は、真核細胞の分化能に対する人為的な制御が可能であることを実証した。しかしながら、細胞核の分化能がどのようにして調節されているのか、その分子機構は依然として多くが不明である。近年、Gurdon らは、カエルの卵母細胞の核内に体細胞核を注入すると、核の F-アクチンに依存して移植核の転写リプログラミングが誘起されることを見いだしたが (Miyamoto et al., 2011, 2013)、この核アクチンの作用機序も未解明である。この報告を受け、本研究では、近年、申請者らが調製に成功したアクチン細胞骨格の細胞内動態を再現する新規のカエル卵抽出液を用いて、卵における体細胞核の転写リプログラミングに対して核の F-アクチン

が関与するかについて検討する。

3. 研究の方法

卵において核のリプログラミングがなされる際に、核内のアクチン、特に F-アクチンが関与するかを、アクチンの細胞内動態を再現するアフリカツメガエルの卵抽出液を用いて検討する。従来はアクチン重合阻害剤を用いて調製されてきた卵の細胞質抽出液を一切の阻害剤を使わずに調製する。この無細胞系で精子クロマチンを基質として核を形成させ、これを回収して超遠心により核質を抽出する。阻害剤を用いずに調製された卵抽出液で形成される核には F-アクチンがよく発達することが予備的に示されていたことから、この核質抽出液でも F-アクチンが発達し、さらに、従来の卵抽出液で調製した核質抽出液 (Walter et al., *Mol. Cell*, 1998) と同様に、DNA 複製などの核内の現象を再現できると考えられる。

4. 研究成果

(1) F-アクチンを含む核質抽出液の調製：カエル卵抽出液は細胞質の分離をよくするため、アクチン重合阻害剤を用いて調製されてきた。阻害剤を全く使わずにカエル卵を遠心すると、細胞質の分離程度は低下する。しかし、細胞質画分の回収は可能で、さらにスウィングローターを用いた遠心分離を数回行うことによって、色素顆粒やミトコンドリアを含む重い膜成分の多くを除くことができた。これをネイティブ卵抽出液 (NEE: native egg extract) とした。この卵抽出液は、アクチン重合阻害剤を用いて調製される従来の卵抽出液 (CEE: conventional egg extract) に較べて、色素顆粒、膜成分、脂質を多めに含むが、間期のものに精子クロマチンを加えてインキュベーションすると、CEE 同様に、直径が 50 μm に及ぶよく成長した核が形成された。この核を回収して蛍光標識したファロイジンで染色したところ、CEE で形成された核は全く染色されなかったのに対し、NEE で形成された核には強い蛍光が

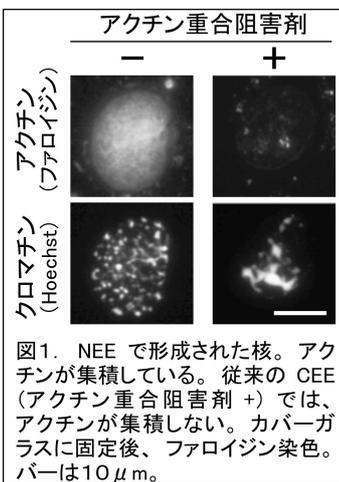


図1. NEE で形成された核。アクチンが集積している。従来の CEE (アクチン重合阻害剤 +) では、アクチンが集積しない。カバーガラスに固定後、ファロイジン染色。バーは10 μm 。

認められ、F-アクチンがよく発達していることが示された (図1)。また、CEE 同様、高い密度 ($4 \times 10^4 / \mu\text{l}$ extract) で精子クロマチンの核形成を誘起できた。CEE では、多量の核を含む卵抽出液を

20,000 g 程度で遠心すると、核が卵抽出液上部に回収され、これを超遠心して核質抽出液 (NPE: nucleoplasmic extract) が調製される。そこで、核を形成させた NEE を同様に遠心したが、F-アクチンがよく発達して卵抽出液の粘性が高まっているせいか、核が上部に集中せず、高密度の核画分を得ることができなかった。卵抽出液を様々な緩衝液で希釈後に遠心、スクロースの密度勾配を用いた分離などを試みたが、膜成分の混入が多く、NPE の調製に必要な密度の核画分を十分量調製することができなかった。核形成後の NEE にアクチン重合阻害剤を加えてから遠心すると、CEE 同様に核が回収されることから、NEE で核が単離できないのは F-アクチンの発達によるものと考えられた。しかし、核形成後の NEE にアクチン重合阻害剤を添加すると、核内の F-アクチンも速やかに消失するため、核の単離のために、アクチン重合阻害剤やアクチン脱重合を引き起こす非生理的な条件を用いることはできない。そこで、核アクチンの重合、脱重合に関わる主要な調節因子とその作用機序を明らかにし、それを利用して胚の核アクチン量を実験的に操作するという方法を検討することにした。

(2) 核アクチンの重合促進因子：ツメガエルでは、卵母細胞の核に F-アクチンが含まれているのに加え、胞胚期特異的に、核に F-アクチンが発達することを私たちは見いだした (投稿論文作成中)。すなわち、胞胚期の細胞核は蛍光ファロイジンでよく染色されるのに対し、原腸胚の細胞核はほとんど染色性を示さなかった。並行して、私たちは、アクチン重合、脱重合の双方に働くアクチン結合蛋白質 INF2 には、卵母細胞および初期胚特異的に発現するサブタイプ (INF2-S) が存在すること、このサブタイプは、他の細胞で発現する INF2-L の一部が欠損したものであることを見いだした。さらに、蛍光タグを付加したこれらサブタイプを培養細胞で発現させて細胞内局在を調べたところ、INF2-L が主に細胞質の小胞体に局在化するのに対し、INF2-S は核に局在化することが判明した (図2)。また、特異抗体を用いたウェスタン解析により、INF2-S は卵母細胞の核に含まれていることが確認された。よって、

INF2-S が卵母細胞、胞胚細胞における核の F-アクチンの発達に与える可能性を示唆さ

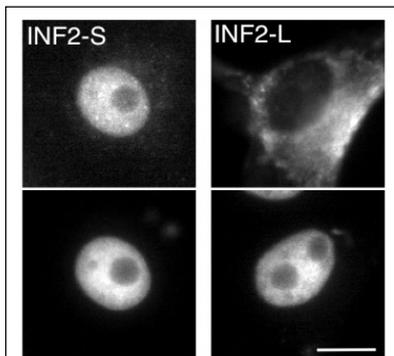


図2. A6細胞にEGFP-INF2-S(左)またはDsREDm-INF2-L(右)を発現させたのち各々のタグ特異抗体(上)とHoechst(下)で免疫蛍光染色した。バーは10 μm。

れた。この可能性を検討するため、まず、INF2 に対する特異抗体を NEE に加えてから、精子クロマチンを添加して核を形成させた。その結果、核の形成、成長は影響を受けなかったが、核のファロイジン染色性が減少した (図3A)。さらに、INF2-S の mRNA を NEE に加えてインキュベーションし、INF2-S の蛋白量を増加させてから同様に核を形成させたところ、この核のファロイジン染色性が高まった (図3B)。

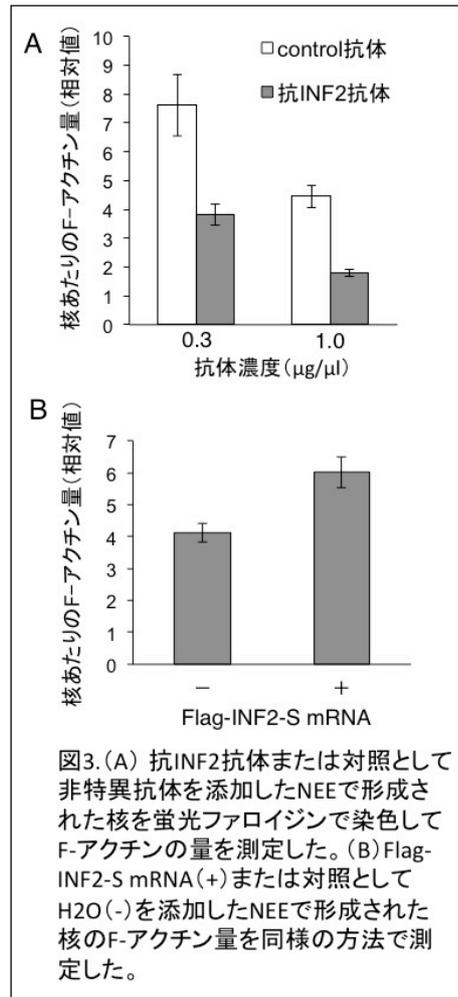


図3.(A) 抗INF2抗体または対照として非特異抗体を添加したNEEで形成された核を蛍光ファロイジンで染色してF-アクチンの量を測定した。(B) Flag-INF2-S mRNA (+)または対照としてH₂O (-)を添加したNEEで形成された核のF-アクチン量を同様の方法で測定した。

これらの結果から、胞胚期の核に F-アクチンを発達させる仕組みの1つが、核局在性を示す INF2 サブタイプの発現にあることが示唆された。現在、核局在化シグナルを付加して核局在性を高めた INF2-S を発現させた胚の核での F-アクチン量の変化を調べている。

一方、アクチンの脱重合を促進するアクチン結合蛋白質として、コフィリンが知られている。コフィリンがツメガエル卵で実際にアクチンの重合を促進しているかを、NEE を用いて検討した。NEE を超遠心して得られる上清には、多量のアクチンが含まれている。これを緩衝液で希釈してから F-アクチンを沈殿させることができる条件で超遠心すると、沈殿、上清の両画分にアクチンが含まれていた。F-アクチンの安定化剤を加えると、沈殿に含まれるアクチ

ンの量が著しく増加したことから、F-アクチンが選択的に沈殿していると結論された。この系を用いて、大腸菌の発現系で調製したコフィリンの作用を調べたところ、NEEの超遠心上清にコフィリンを加えると、超遠心で沈殿するアクチンの量が減少した。また、コフィリンに対する特異抗体を用いてNEEの超遠心上清から内在性のコフィリンを免疫除去したところ、アクチンの沈殿量が増加した。よって、コフィリンは、ツメガエル卵でもアクチンの脱重合を促進していることが示された。しかし、核内でも同様にアクチンの脱重合を促進するかは不明である。現在、核移行シグナルIBB (importin beta-binding sequence) を付加したコフィリンを作成し、NEEにおける核局在性、および核のF-アクチンにたいする作用を検討中である。並行して、受精卵にIBB-コフィリンのmRNAを顕微注射し、胞胚における核のF-アクチンがどのような影響を受けるかを検討している。

上記の2つのF-アクチン量を正および負に制御する調節蛋白質を核に導入する系を用いて、胞胚期の核のF-アクチンを実験的に操作したときに、胚の転写パターンおよび胚発生に伴う細胞分化がどのような影響を受けるかを検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 11件)

- ① 岩渕万里、小野田衣里、小田春佳、大隅圭太、胞胚型核システムの分子基盤、第33回染色体ワークショップ・第14回核ダイナミクス研究会、2016. 1. 13、松島町(宮城県)
- ② 小田春佳、第33回染色体ワークショップ・第14回核ダイナミクス研究会、2016. 1. 13、松島町(宮城県)
- ③ 岩渕万里、小野田衣里、小田春佳、大隅圭太、カエル胞胚細胞の核システム、第86回日本動物学会、2015. 9. 18、新潟
- ④ 岩渕万里、小田春佳、白井菜月、浦菜緒子、小田春佳、大隅圭太、カエル初期胚における未分化細胞の核システム、第32回染色体ワークショップ・第13回核ダイナミクス研究会、2014. 12. 16、廿日市(広島県)
- ⑤ 白井菜月、小田春佳、浦菜緒子、大隅圭太、岩渕万里、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37回日本分子生物学会、2014. 11. 25、横浜
- ⑥ 大隅圭太、浦菜緒子、小田春佳、白井菜月、岩渕万里、カエル初期胚における核アクチンの役割、第85回日本動物学会、2014. 9. 11、仙台
- ⑦ 岩渕万里、浦菜緒子、小田春佳、白井菜月、大隅圭太、核アクチンフィラメントの動態を再現する新規ツメガエル卵無細胞

系を用いたクロマチン-核膜結合制御機構の解析、第87回日本生化学会シンポジウム「核構造タンパク質によるクロマチン時空間制御の理解とマニピュレーション」、2014. 10. 18、京都

〔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)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/laboratory/deb.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩渕 万里 (IWABUCHI, Mari)
名古屋大学・理学研究科・講師
研究者番号：40275350

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

大隅 圭太 (OHSUMI, Keita)
名古屋大学・理学研究科・教授
研究者番号：20221822