

## 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：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650083

研究課題名(和文) 初期胚発生におけるクエン酸合成酵素の新規機能の解明

研究課題名(英文) The elucidation of novel mechanisms of citrate synthase during early embryonic development

研究代表者

岩尾 康宏 (IWAO, Yasuhiro)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10144916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：両生類の受精から初期胚発生におけるクエン酸合成酵素(CS)の細胞骨格系と小胞体での分布と機能を明らかにした。生きた細胞内で蛍光CSなどを受精卵で発現させ、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化を調べた。卵割での紡錘体伸張における細胞骨格質型CSの機能を明らかにし、神経系細胞や体節筋の周囲に特異的に分布することを確認した。イモリ透明化割球の作成に成功し、Ca<sup>2+</sup>イメージング法でCSの発生過程での役割を明らかできる手法を確立した。

研究成果の概要(英文)：The role and localization of citrate synthase (CS) in cytoskeletons and ER were clarified from fertilization to early embryonic development. The changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration was determined with fluorescent CS expressed in living fertilized eggs. The role of CS in the elongation of spindles during cleavage was investigated, and the localization of CS in the neural cells and muscle cells was confirmed. We succeeded to produce translucent blastomeres in the newt to establish the procedure for analyzing the role of CS during embryonic development.

研究分野：発生生物学

キーワード：クエン酸合成酵素 初期発生 受精 細胞骨格 細胞分裂 微小管

## 1. 研究開始当初の背景

動物の初期発生では1つの受精卵が極めて急速な細胞分裂である卵割をおこない、形態形成に必要な多数の細胞を産生する。体積が大きな受精卵では、M期の紡錘体は染色体を数百 $\mu\text{m}$ もの距離を数分間で正確に両極へ移動させなくてはならない。このために、M期中期の紡錘体はとても太くて大きな構造であるが、卵割時の長距離の素早い染色体移動と大きな後期星状体の形成がどのような分子機構でおこなわれているかは未解明である。我々は独自に開発した透明なツメガエル割球により、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することに成功し、個々の細胞の細胞周期(G1, S, G2, 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(Citrate synthase, CS)が卵の $\text{Ca}^{2+}$ シグナル経路を活性化してM期を終了させることを初めて明らかにした。これは通常はミトコンドリア内で機能しているCS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。両生類の初期胚においてCSは微小管(チューブリン)と結合し、M期の星状体と紡錘体に特異的に分布していることがわかった。これは、脊椎動物の発生過程においてCSが微小管細胞骨格の機能を調節している可能性を示している。卵割における細胞骨格と細胞内小器官の移動でのCSの新規機能を明らかにすることが重要である。

## 2. 研究の目的

動物の初期発生に必須な卵割では、極めて大きな細胞が急速に分裂することが必要である。クエン酸合成酵素(CS)がミトコンドリア外で微小管と相互作用し、卵内の $\text{Ca}^{2+}$ シグナル経路の活性化して減数分裂を再開する。本研究では、この酵素が体細胞分裂(卵割)における新規機能を両生類胚をモデルとして解明する。卵割における高機能な紡錘体形

成と $\text{Ca}^{2+}$ イオンによる分裂シグナルの調節機構を、我々が開発した透明化割球システムを用いて生きた細胞で詳細に明らかにする。CSが新たな細胞骨格機能の調節因子として、脊椎動物の初期発生において普遍的な役割をもつことを明らかにし、動物の胚発生と細胞分裂における新たな研究概念の発展に役立てる。(1)イモリとアフリカツメガエルの初期胚細胞周期において、CSの細胞骨格系と $\text{IP}_3$ リセプター型 $\text{Ca}^{2+}$ ストアである小胞体での分布と挙動を明らかにする。(2)CSの初期胚での機能を阻害または亢進することで、卵割や細胞分化におけるこの酵素の $\text{Ca}^{2+}$ シグナル調節と細胞骨格系での役割を解明する。(3)細胞骨格に分布する高分子型のCS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)CSが細胞骨格系と共局在している筋肉や神経の形成をモデルとして、分化して細胞周期を停止した細胞での細胞骨格系に分布するCSの $\text{Ca}^{2+}$ シグナル調節と細胞分化における機能を明らかにする。これらにより、これまでに未知であったエネルギー代謝系酵素(CS)のミトコンドリア外での新規機能を解明することができる。さらに、発生における細胞分裂と細胞分化の制御に関して新たな概念を提起したい。

## 3. 研究の方法

### 研究計画・方法(概要)

両生類(ツメガエル、イモリ)の初期胚細胞において、クエン酸合成酵素(CS)の細胞骨格系と $\text{Ca}^{2+}$ ストア小胞体での分布と機能を、蛍光抗体法や透明化割球での蛍光融合タンパク質の発現と観察を用いて明らかにする。機能欠失分子の導入や抗体による機能阻害により、CSの卵割と $\text{Ca}^{2+}$ シグナル経路における役割を明らかにし、細胞骨格系でCSと相互作用している分子を同定する。さらに、この酵素の後期発生での細胞分化においても

共通して機能しているかを検証する。これらにより、CS の多様な役割とその分子機能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エネルギー代謝系酵素 (CS) のミトコンドリア外での新規機能を解明する。

#### 4. 研究成果

##### (1) クエン酸合成酵素 (CS) の細胞骨格系と $Ca^{2+}$ シグナリングでの役割の検討

ツメガエルとイモリの卵成熟過程から初期胚細胞周期において、クエン酸合成酵素 (CS) の細胞骨格系と IP3-リセプター型  $Ca^{2+}$  ストア (小胞体) での分布と機能を明らかにした。抗 CS 抗体、抗チューブリン抗体、抗 IP3-リセプター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、その細胞骨格と小胞体での分布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とシグナル伝達機構を確かめるため、蛍光タンパク質を融合させた CS、小胞体マーカー (KDEL タンパク質)、ミトコンドリアマーカー (移行シグナルペプチド) の mRNA を受精卵に注入して蛍光融合タンパク質を発現させ、イメージングシステムを用いて観察にした。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化とともに、細胞表面の MMP や GM1 との関連を調べた。

##### (2) クエン酸合成酵素 (CS) の卵割における機能の解明

卵割は、ツメガエル卵では S 期 (20 分) と M 期 (10 分) だけからなる極めて短い細胞周期をもつ。また、卵の直径は 1.2 mm であるため、星状体微小管は 1 mm 以上伸びることが必要であり、紡錘体も数分間で 500  $\mu$ m 以上伸張して染色体を娘細胞に運搬する必要がある。卵割期での細胞骨格質型 CS の機能を調べるために、抗 CS 抗体を受精卵に注入して機能阻害を検討した。

##### (3) 細胞骨格型クエン酸合成酵素 (CS) の分子機能の解明

高分子の細胞骨格型 CS の細胞内局在化の分子機構を明らかにするため、高分子型 CS のリン酸化の状況を詳しく調べた。イモリとツメガエルで比較をおこなうと、これらの変異はリン酸化可能なアミノ酸が異なることがわかった。また、ミトコンドリア外の CS は、細胞骨格分子と密接に相互作用していると考えられるので、とくに長くて安定した細胞骨格が細胞分化に必要である神経系細胞や筋細胞の形態形成における細胞骨格型 CS の役割について検討した。CS が体節の周囲に特異的に分布することが確認できた。イモリ初期胚での核内や細胞質での  $Ca^{2+}$  シグナル経路における役割を調べる方法として、イモリ透明化割球の作成に成功し、 $Ca^{2+}$  感受性蛍光色素による細胞内  $Ca^{2+}$  イメージング法を用いて解析した。これらにより、ミトコンドリア外の CS の発生過程における役割を明らかにできる手法を確立した。

#### 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)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 8 件)

Yasuhiro Iwao, Mechanisms of Egg Activation and Polyspermy Block in the Fertilization of Amphibians: Model Animals for Vertebrate Fertilization, "International meeting on aquatic model organisms for human disease and toxicology research", 2016 年 3 月 19 日, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県・岡崎市)

ツメガエルの単精受精における電気的多精拒否の分子機構, 岩尾康宏, 志賀圭子, 城下歩美, 崎家真穂, 井崎顕太, 上野智代,

井尻貴之, 佐藤賢一, 2015年12月2日, 第38回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

井崎顕太, 崎家真穂, 城下歩美, 岩尾康宏, ツメガエル受精における卵内  $Ca^{2+}$  上昇と電気的多精拒否のしくみ, 日本動物学会 第86回新潟大会, 2015年9月17日, 新潟コンベンションセンター朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

大神健博, 上野智代, 岩尾康宏, イモリ受精時の  $Ca^{2+}$  波と接合核形成におけるクエン酸合成酵素と微小管の機能, 日本動物学会 第85回仙台大会, 2014年9月11日, 東北大学(宮城県・仙台市)

井崎顕太, 城下歩美, 岩尾康宏, ツメガエル卵における電位依存的な受精のしくみ, 日本動物学会 第85回仙台大会, 2014年9月11日, 東北大学(宮城県・仙台市)

崎家真穂, 城下歩美, 佐藤賢一, 岩尾康宏, ツメガエル受精における精子 MMP-2 と卵リセプターの役割, 日本動物学会 第85回仙台大会, 2014年9月11日, 東北大学(宮城県・仙台市)

崎家真穂, 志賀圭子, 城下歩美, 佐藤賢一, 岩尾康宏, ツメガエル受精における膜接着・融合と卵内  $Ca^{2+}$  イオン濃度上昇のしくみ, 日本動物学会 中国四国支部第66回大会, 2014年5月10日, 岡山理科大学(岡山県・岡山市)

大神健博, 上野智代, 岩尾康宏, イモリ卵における  $Ca^{2+}$  イオン濃度上昇と接合核形成の仕組み, 日本動物学会 中国四国支部第66回大会, 2014年5月10日, 岡山理科大学(岡山県・岡山市)

〔図書〕(計 1件)

Yasuhiro Iwao and Kenta Izaki, Universality and diversity of a fast, electrical block to polyspermy during animal fertilization, "Reproductive and Developmental Strategies", (Eds., Kazuya Kobayashi, Takeshi Kitano, Yasuhiro Iwao, Mariko Kondo)(2016), Springer Japan, 印刷中

〔その他〕

ホームページ等

<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