

千葉大学審査学位論文（要約） (Summary)

融合科学 研究科 ナノサイエンス 専攻 ナノバイオロジー コース
Graduate School Division Department

学生証番号 11YD0301
Student ID Number

氏 名 岩瀬 祥平
Name

論文題名（外国語の場合は、その和訳を併記） Thesis Title (foreign language title must be accompanied by Japanese translation)
Studies on regulatory mechanism of an ADF/cofilin phosphatase, Slingshot, during oocyte maturation of <i>Xenopus laevis</i> <i>Xenopus</i> 卵成熟過程における ADF/コフィリンフォスファターゼ Slingshot の活性調節機構に関する研究

要旨

ADF/コフィリンは真核生物に広く存在するアクチン調節タンパク質であり、アクチンフィラメントを切断・脱重合することにより細胞内のアクチンダイナミクスを制御していることが知られている。本研究では、アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の卵成熟過程における ADF/コフィリンを脱リン酸化（活性化）するフォスファターゼ *Xenopus Slingshot (XSSH)* の活性制御機構について解析を行った。XSSH の tail ドメインは卵核胞崩壊の直後に非常に多くの部位がリン酸化され、それと連動するように *Xenopus ADF/cofilin (XAC)* が脱リン酸化されていることが確認された。この卵成熟進行に伴う XAC の脱リン酸化はアクチンモノマー隔離剤 *latrunculin B* によって抑制され、逆に F-アクチン安定化剤 *Jasplakinolide* を作用させることにより促進された。これらの結果は、CSF-extracts においても再現でき、XSSH を除去することにより *Jasplakinolide* による XAC の脱リン酸化は抑制された。これらの結果より、XSSH はアクチンフィラメントセンサーとして機能し、XAC を介してアクチンダイナミクスを制御していることが示唆された。また、XSSH 抗体を卵母細胞にインジェクションすると、卵核胞崩壊後の XSSH の多重リン酸化が抑制され、XAC の脱リン酸化阻害と、紡錘体の形成異常が認められた。これらの結果より、XSSH のリン酸化に伴う XAC の活性化、それによって引き起こされるアクチンダイナミクスの増加は紡錘体の形成に必須であることが明らかになった。さらに、多重リン酸化に関与するキナーゼの探索も試み、MPF をはじめいくつかのキナーゼを同定した。

結果

卵成熟過程における XAC および XSSH のリン酸化状態

卵成熟過程において XAC および XSSH のリン酸化状態を解析したところ、XAC は卵核胞崩壊 (GVBD) 直後より急速に脱リン酸化 (活性化) されており、その脱リン酸化を担う XSSH もまた、GVBD 直後にリン酸化制御を受けていることが明らかとなった。

XSSH の tail ドメインは成熟卵内において高度にリン酸化されている

in vitro でのリン酸化解析により、XSSH の tail ドメインには 14 箇所以上のリン酸化部位が見出され、非常に高度にリン酸化されていることが判明した。

XSSH のリン酸化を担うキナーゼの探索

XSSH をリン酸化し得る様々なキナーゼを用いて、*in vitro* キナーゼアッセイを行い、Cdk1/cyclin B (MPF) が XSSH の tail ドメインのいくつかの部位を直接リン酸化していることを明らかにした。

リン酸化型 XSSH は F-actin との結合性を高め、XAC へのフォスファターゼ活性を亢進する

in vitro においてリン酸化型 XSSH および非リン酸化型 XSSH の XAC へのフォスファターゼ活性を測定した結果、リン酸化型 XSSH は非リン酸化型 XSSH と比べわずかながらその活性を亢進していた。また、F-actin との共沈実験の結果より、リン酸化型 XSSH は F-actin との結合性が高まることが明らかとなった。XSSH が活性を持つためには F-actin との結合が必要なことをふまえると、リン酸化型 XSSH は F-actin との結合性を高め、その結果、XAC へのフォスファターゼ活性が亢進すると考えられる。

XSSH は F-actin 量を認識するセンサーとして機能し、XAC の脱リン酸化する

卵母細胞および CSF-extracts に薬剤を作用させアクチンフィラメント量を変化させたところ、F-actin 量が増加すると XAC の脱リン酸化が誘導され、アクチンフィラメント量が減少すると XAC のリン酸化が引き起こされることを見出した。また、このアクチンフィラメント量増加による XAC の脱リン酸化は XSSH を除去した CSF-extracts では阻害されたため、XSSH は F-actin 量の増加を認識し、XAC を脱リン酸化することで細胞内のアクチンフィラメント量のバランスを維持していることが示唆された。

抗 XSSH 抗体注入による XSSH 機能阻害の卵成熟への影響

抗 XSSH 抗体を卵母細胞へマイクロインジェクションし、XSSH の機能阻害を試みた。今回用いた抗体は *in vitro* においては XSSH の XAC へのフォスファターゼ活性は阻害しなかったが、卵成熟後の XSSH の完全なリン酸化を阻害し、GVBD 後に起きる XAC の脱リン酸化を阻害した。抗 XSSH 抗体注入卵においては成熟斑の形成が起こらず、卵核胞植物側への MTOC-TMA の集積および紡錘体形成の異常が認められた。これと同様の紡錘体形成の異常はアクチン繊維安定化剤 Jasplakinolide によってアクチンダイナミクスを阻害した場合においても見られた。これらの結果より、XSSH のリン酸化に伴う XAC の活性化、それによって引き起こされるアクチンダイナミクスの増加は紡錘体の形成に必須であることが示唆された。

考察

本研究において、抗 XSSH 抗体注入により、卵成熟過程における XSSH の高リン酸化を阻害することで GVBD 後の XAC の脱リン酸化が阻害され、その後の紡錘体の形成に異常が起きることを示した。これらの結果より、紡錘体の形成には XAC を介したアクチンダイナミクスの制御が必要であり、卵成熟過程において XAC が正常に機能するためには XSSH の高リン酸化が必須であることが示唆された。近年、アフリカツメガエルの卵母細胞においてアクチンフィラメントが紡錘体の形成に関与しているという報告がいくつかなされているが、本研究において紡錘体形成時におけるアクチンフィラメント制御機構の新たな一端を明らかにすることができた。

紡錘体の形成異常は MTOC-TMA の集積の阻害が原因だと考えられる。抗 XSSH 抗体注入卵においては通常では卵核胞植物側に集積する微小管が動物極側にも見られ、その後の MTOC-TMA の集積が見られなかった。卵核胞周辺のアクチンダイナミクス調節に異常が起きたことにより、正常な微小管の集積が阻害されたと思われる。

また、XAC のリン酸化状態はアクチンフィラメント量に依存して変化することが明らかとなり、F-actin 量増加による XAC の脱リン酸化は XSSH が担っていることを示した。アクチンフィラメント量増加時において XSSH は活性化し XAC を脱リン酸化（活性化）する、活性化した XAC はアクチンフィラメントを切断・脱重合させ、F-actin 量を低下させる。このような XAC を介したアクチンダイナミクスの調節によって細胞内のアクチンフィラメント量は一定に保たれていると考えられる。また、アクチンフィラメント量減少時においては Lim-kinase などのキナーゼが XAC を不活性化しアクチンフィラメントを増加させていると考えられる。

in vitro において、XSSH はリン酸化されることで F-actin との結合性を高め XAC に対するフォスファターゼ活性を亢進することを示した。しかし、その活性の変化は小さなものであり、実際の卵母細胞内においては他のタンパク質との相互作用や細胞内での局在を変化させ、その機能変化をより大きくしている可能性も考えられる。卵成熟過程においては XSSH が高度にリン酸化されることにより、その活性を高め、XAC を脱リン酸化している。その結果、今まで保たれていたアクチンの重合・脱重合のバランスが変化し、アクチンダイナミクスの増加が引き起こされていると推測できる。この XSSH のリン酸化、それに伴う XAC の活性化を介したアクチンダイナミクスの増加が正常な紡錘体の形成に重要な役割を果たしているのではないかと考えられる。

材料と方法

卵母細胞

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞は、低温麻酔した♀の腹腔から卵巣を摘出し、卵母細胞用生理的塩溶液 (OR2) 中で濾胞細胞をピンセットで剥離することにより得た。卵成熟は OR2 にプロゲステロンを 5 μ M になるように加えることで開始した。卵成熟過程の進行は、80%以上の卵が成熟斑を形成した時点を 1.0 とした相対時間でモニターした。

電気泳動およびイムノブロット

SDS-PAGE は Laemmli の方法に従って行った (Laemmli et al., 1970) 。濃縮ゲルに 4%、分離ゲルに 10%もしくは 12%のポリアクリルアミドゲルを用いた。

イムノブロット法は Towbin らの方法 (Towbin et al., 1979) に従って行った。SDS-PAGE によって展開したタンパク質をニトロセルロース膜に電氣的に転写し、5%スキムミルク in PBS で 1 時間ブロッキングした。一次抗体には 1% BSA を含む PBS で適宜希釈したものを、二次抗体には Alkaline phosphatase (AP) で標識された Goat anti-rabbit IgG または Goat anti-guinea pig IgG (Bio Rad) を用いて、それぞれ 1 時間室温で反応させた。抗体反応後にニトロセルロース膜を PBS で洗い、発色は AP buffer (100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5) 中で NBT と BCIP を用いて行った。

マイクロインジェクション法

濾胞細胞を除いた卵母細胞を 5% Ficoll を含む OR2 中に移し、実体顕微鏡 (ZEISS Stemi 2000-C) 下で、抗 XSSH 抗体を卵母細胞での終濃度が 120 ng/oocyte になるように CELL INJECTER (SHIMAZU CIJ-1) を用いて注入した。抗体は 8 mg/ml まで濃縮し、injection buffer (60 mM KCl, 5 mM HEPES-KOH, pH 7.2) で透析したものを用い、注入位置は卵母細胞の帯域に統一した。

質量分析

GST-N-tail を CSF-extract 中で 1 時間反応させ十分にリン酸化させた後、グルタチオンビーズで回収・洗浄し、SDS sample buffer で処理したものを電気泳動のサンプルとした。このリン酸化 GST-N-tail を SDS-PAGE により分解物と分離し、分解物を含まない GST-N-tail を回収し質量分析の試料とした。リン酸化 GST-N-tail の質量分析は Dr. Christophe Ampe (Ghent University, Belgium) に依頼した。

CSF-extract kinase assay

CSF-extract 20 μ l に対し、精製した各 GST 融合タンパク質を終濃度 100ng/ μ l となるように加え、22°C で 1 時間反応させた。その後、CSF-extract buffer で平衡化した Glutathione Sepharose 4B beads 10 μ l と 4°C で 1 時間反応させ GST 融合タンパク質を吸着させた。beads を PBS および 0.1% Triton X-100 を含む PBS で十分に洗浄した後、beads 10 μ l に対して 100 μ l の SDS sample buffer (4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 20 mM Tris-HCl, pH6.7) で処理した。

Phosphatase assay

0.2 μM の GST-XSSH あるいはリン酸化 GST-XSSH (pXSSH)を 4.7 μM の F-actin 存在下あるいは非存在化で混合し、10 μM のリン酸化 XAC (pXAC)を加えることで反応を開始した。

共沈実験

XSSH および XAC と F-actin との共沈実験は、F-buffer (60 mM KCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 20 mM HEPES, pH7.2)中で室温 3 時間反応させた後に、436,000 g で 20 分間超遠心することにより行った。

Immunodepletion

CSF-extractからの XSSH の除去は、抗 XSSH 抗体を用いて行った (Rosenblatt et al., 1997)。

蛍光抗体染色法

パラフィン包埋切片を一次抗体で室温 1 時間反応させ、PBS で洗浄した後、二次抗体 (FITC-conjugated goat anti-mouse, RITC-conjugated goat anti-rabbit)を室温 1 時間反応させた。PBS で洗浄した後、Anti-fader(0.1% p-phenylenediamine, 90% Glycerol, PBS)で封入し、蛍光顕微鏡観察した。