

# 魚類卵形成に関わる卵母細胞核マトリクスタンパク質の解析

## Structure and Function of Nuclear Matrix in Fish Oocytes

研究代表者 九州大学大学院農学研究院海洋生物学分野 助手 山口明彦  
Lab. of Marine Biology, Department of Animal and Marine  
Bioresource Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University,  
Assistant Professor, Akihiko Yamaguchi

魚類卵母細胞核である卵核胞 ( Germinal vesicle:GV ) は巨大であり、かつ大量単離の技術が開発されているので核構造の詳細な解析が可能である。キンギョ単離 GV から調整した核マトリクスは顆粒繊維構造から成り、坑中間径繊維モノクローナル抗体によって認識されるラミン様タンパク質を含む事が明らかになった。二次元電気泳動法により核マトリクスタンパク質を展開すると、主に骨格タンパク質 ( アクチン、ラミン B3 ) と ATP 結合、分解部位をもつ AAA ファミリーに分類できた。ビオチン標識した組換えラミンをツメガエル卵母細胞へ微小注射し、坑リン酸化抗体を用い解析した結果、GV 内部のドメインでラミンのリン酸化が起き、その後ラミナ構造へ局在することが明らかになった。これらの結果は、リン酸化によりラミンを中心とした核マトリクス構造が制御され、その上で AAA ファミリーを含む巨大分子複合体の会合が生ずる事を示唆する。

### Abstract

Germinal vesicle (GV) is a huge, highly specialized nucleus in animal oocytes. Taking advantage of recently developed a method to isolate large numbers of GVs from vitellogenic oocytes of goldfish, the structure and protein composition of the nuclear matrix (NM) were analyzed. The GVM has an insoluble fibrogranular filamentous structure. Anti-intermediate filament (IF) specific monoclonal antibody recognized a filamentous structure of peripheral-nucleoli stage of goldfish or zebrafish oocytes. The NM proteins were resolved in 2D-PAGE, then microsequenced. Identified major proteins are classified into structural protein, (lamin B3, actin) and AAA family proteins (ATPases associated to variety of cellular activities: RFC, TIP49, BAF53 etc.) that assembles with DNA transcription or replication factors in huge complexes.

The phosphorylation of lamin *in vivo* was monitored following the microinjection of biotinylated recombinant goldfish lamin B3 protein into *Xenopus* oocytes. Anti-phosphoserine specific antibody recognized nuclear domains where phosphorylation of lamins occur. These results suggest that the phosphorylational state of nuclear lamin plays a important role to build a nuclear matrix network where AAA proteins assemble in a huge complex, then regulate nuclear activities in oocytes.

## 1. 研究目的

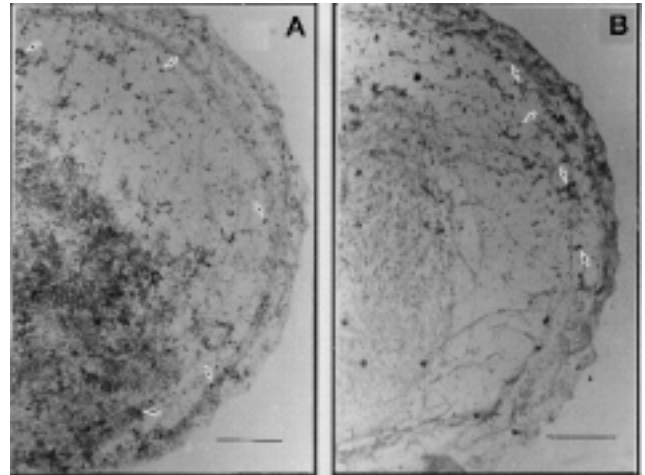
真核生物のゲノム DNA は核内部でクロマチン構造を形成し、遺伝子の発現は時間的、空間的な制御を受けている。細胞質に細胞質骨格と呼ばれる構造があるのと同様に、核にも核マトリクスと呼ばれる構造が存在し、電子顕微鏡による観察では中間径繊維に類似したフィラメントによって構成されている事が示されている。しかしその正体は未だに明らかになっていない。動物卵母細胞核は巨大であり卵核胞(Germinal vesicle; 以下 GV)と呼ばれ、核の構造やタンパク質の解析には都合が良い。申請者は、魚類の卵母細胞から GV を大量単離する方法をすでに確立していたので、この技術を用い GV の核マトリクス構造とその構成成分を明らかにし、真核生物共通の遺伝子の発現場所である核の内部構造とその機能を理解する事を目標に研究を行った。

## 2. 研究経過

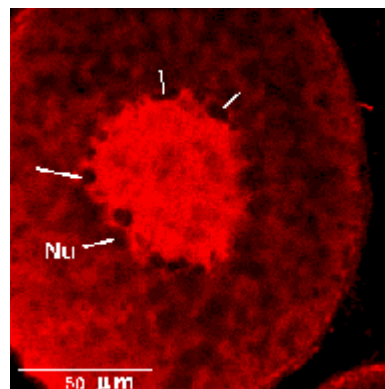
### 2.1 卵母細胞核マトリクスの構造

キンギョ卵母細胞から単離した GV から核酸消化および高濃度の塩でほとんどの可溶性蛋白質を除去した核マトリクスは光学顕微鏡下で顆粒繊維状構造から構成されていることが明らかになった(Fig. 1)。GV 内部の顆粒繊維構造を構成するフィラメントを特異的に認識するモノクローナル抗体を作製した。この抗体は魚類赤血球核から精製した体細胞型ラミンを抗原にしてつくられたが、エピトープ解析により、いくつかの中間径繊維コイル 2 の C 末端側に特徴的な Y(Q/E)(E/Q)LL を含む領域を認識する。免疫組織染色法では、このエピトープを持つ蛋白質はキンギョとゼブラフィッシュの減数分裂前期(周辺仁期)のステージで特異的な発現がみられた(Fig.

2)。一方ラミン B3 は核膜にしかその局在生が見られないことから、GV 内部の顆粒繊維構造にはラミン B3 以外の中間径繊維蛋白質が関与している可能性が強まった。



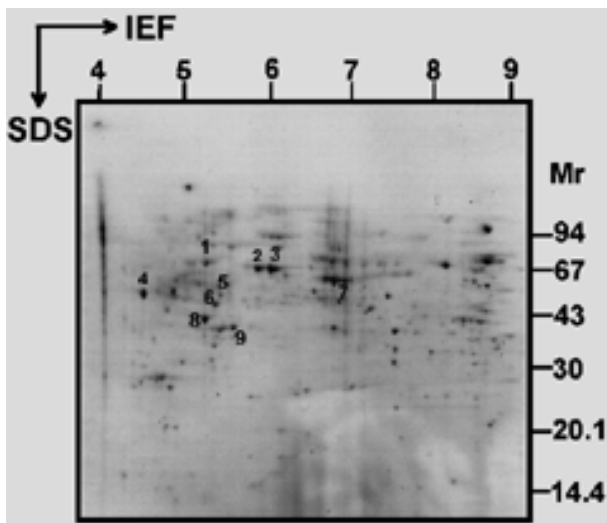
**Figure 1.** Nuclear matrix structure of isolated GV from goldfish immature oocytes. (A) Residual nuclear matrix after extraction with 0.25 M ammonium sulfate, (B) with 1 M NaCl after digestion of nucleic acids. Arrows indicate granules associated with nuclear filamentous structure. Bar=10 μm



**Figure 2.** Nuclear filamentous structure in goldfish immature oocytes (previtellogenic stage) recognized by anti-IF specific monoclonal antibody. Arrows indicate the position of nucleoli.

## 2.2 二次元電気泳動による核マトリクスタンパク質成分の解析

GV 核マトリクスの構成成分を 2 次元電気泳動によって分離展開し、等電点 4 - 7 の主要なスポットをペプチドシーケンスによって解析した結果、骨格蛋白質として中間径繊維蛋白質核ラミン B3 とアクチンが同定された。他の蛋白質の多くは転写や複製に参与するもので、そのほとんどが ATP 結合、分解モチーフを持つ AAA (ATPases associated to variety of cellular activities) ファミリーに分類する事ができた。また AAA ファミリーの中には BAF (Barrier-to-autointegration factor) に分類される蛋白質も存在した (Fig. 3)。

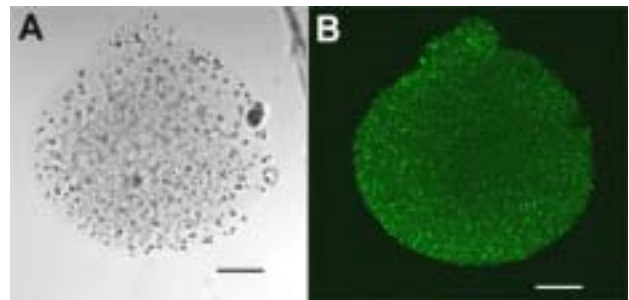


**Figure 3.** 2-D(IEF/SDS)PAGE analysis of nuclear(GV) matrix proteins of goldfish vitellogenic oocytes. Spot 1, hsp70; spot 2, 3, lamin B3; spot 4, RBP 48 (Retinoblastoma binding protein); spot 5, highly homologous to YPL235W which belong to AAA family; spot 6, BAF53 (Barrier-to-autointegration factor belong to AAA family); spot7, TIP49 (TATA box binding protein interacting protein); spot 8, actin; spot 9, RFC

(replication factor C 40kDa subunit).

## 2.3 核質内でのラミンのリン酸化

ラミン B3 は GV 核ラミナに存在する主要繊維蛋白質であり、核マトリクスネットワークの重要な構成成分の1つである。従って、ラミン重合、脱重合の核マトリクス構造を理解する糸口と考え、ラミンに特有のリン酸化ペプチドを抗原に用い、M-期にリン酸化を受けると考えられている cdc2 キナーゼリン酸化セリンに対する抗リン酸化(および脱リン酸化)モノクローナル抗体の作製に成功した。解析の結果、リン酸化は M 期だけではなく減数分裂の G2 ですすでに起きている事が明らかになった。またラミンのリン酸化反応は GV 内部のドメイン構造で起こっている事が判明した (Fig. 4)。これらの局所領域が、核マトリクス構造形成の基点になっている可能性が示唆された。



**Figure 4.** Confocal image of phosphorylated goldfish lamin B3 in isolated *Xenopus* GV. Goldfish lamin B3 were microinjected into *Xenopus* oocytes, then GV were isolated and fixed. Phosphorylated lamins were visualized by anti-phosphoserine (p34<sup>cdc2</sup> site) monoclonal antibody. (A) DIC image (B) FITC-conjugated phosphorylated lamin B3. Notice nuclear dot-like domains where lamin B3 were phosphorylated.

### 3 研究成果

本研究で魚類 GV 内には中間径繊維特有の構造を認識するモノクローナル抗体に免疫反応する顆粒繊維構造が存在する事が明らかになった。また、本研究で同定された核マトリクスタンパク質の TIP49, BA53 などは酵母菌や他動物の細胞でも核マトリクスに結合し、転写因子複合体を形成しているという報告がある。従って、魚類卵母細胞核である GV を用いた研究は、真核生物や脊椎動物に共通の核構造である核マトリクスの解析に有効である事が示された。

### 4 今後の課題と発展

現在、当初の目的に沿って GV 内部を構成する主要繊維構造を構成する新規中間径繊維様タンパク質をコードする遺伝子の単離、同定を継続中である。しかし現時点で、ラミンは核に局在する唯一の中間径繊維タンパク質であるので、今後は(1)ラミンのリン酸化を介した重合、脱重合制御機構を解析し、ラミンネットワーク構築のしくみを、(2)同定された AAA ファミリーを中心とした巨大分子複合体がどのように、新規核フィラメントを含む核マトリクスに結合し、機能するかという、全ての生物の細胞核に共通の機構を解明していく。

生殖細胞の形成は受精時における遺伝的性決定にはじまり、体細胞分裂による細胞増殖を経た生殖腺の性分化、減数分裂へのコミットメントを経て、メスでは特有の減数分裂形態である卵母細胞が形成される。これらの各ステップは細胞の分化のプロセスであり、それに伴い核の構造形態も変化する。従って、今後のもう一つの研究目標として、生殖細胞の分化を核マトリクス上で生ずる遺伝子転写機構の制御という観点から研究を展開

する方針である。

### 5 発表論文リスト

1 Mutations of N-terminal Head Domain of Goldfish Oocyte Lamin B3 that Inhibit Nuclear Transport And Lamina Assembly in *Xenopus* Oocytes *in vivo*. Yamaguchi, A. and Nagahama, Y (投稿中)

2 Phosphorylation of p34<sup>cdc2</sup> targeting site of goldfish germinal vesicle lamin B3 before oocyte maturation. Yamaguchi et al. (投稿中)

3 Protein kinase activity associated with *Xenopus* oocyte nuclear lamina. Yamaguchi A. (投稿準備中)