

マウス卵減数分裂過程に
おけるMosの役割

藤本 晃久

マウス卵減数分裂過程に
おける Mos の役割

藤本 晃久

目次

要約	3
序文	4
材料及び実験方法	9
結果	13
考察	17
参考文献	20
謝辞	24
図	25

要約

c-mos 原癌遺伝子の転写産物である Mos は、脊椎動物卵母細胞の成熟において必須の役割を果たしている。アフリカツメガエル卵において、Mos は減数分裂の開始、減数分裂間期での核形成の抑制、第2分裂中期における分裂停止に作用することがこれまでに報告されている。マウスにおいては、第2分裂中期における分裂停止に関与することはわかっているものの、その他の役割についてはまだ十分に解明が進んでいない。そこで、我々は Mos が、第1減数分裂—第2減数分裂間期においてどのような役割を果たすかについて、詳細に検討を加えた。第1極体放出、すなわち第1減数分裂終了後からのマウス卵の染色体、および tubulin を染色し観察したところ、第1極体放出直後、*c-mos* ホモ欠損マウス卵、およびコントロールとして用いたヘテロ欠損マウス卵は、ともに凝縮した染色体を有し、第1分裂終期にあった。極体放出1時間後、*c-mos* ホモ欠損マウス卵においてのみ、染色体は一時的に核形成初期のような脱凝縮状態を呈した。しかし、極体放出2時間後には再び凝縮し、第2分裂中期に至った。この過程において、*c-mos* ホモ欠損マウス卵の *cdc2* kinase の再活性化が遅延し、cyclin B の蓄積が遅れていることが明らかになった。この結果により、Mos の機能は第1分裂—第2分裂間期における cyclin B の速やかな蓄積を促進し、マウス卵減数分裂間期における染色体凝縮の維持に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

序文

卵母細胞の減数分裂

配偶子成熟過程における減数分裂は、DNAを倍加させた後2回の分裂によってDNAの半数体を生み出すことを特徴とする。有性生殖を行う生物にとっては種の保存に必要な不可欠のものであり、その制御には通常の体細胞分裂とは異なった機序が働いていると考えられる。

卵母細胞の形成過程を図1に示した。ヒトにおいて胎生3週末に卵黄嚢壁の内胚葉の間に原始生殖細胞として出現した細胞は、第6週に生殖堤へと移動し、生殖腺の発生分化を誘導する。原始生殖細胞から分化した卵祖細胞は体細胞分裂によって数を増すが、第13週頃から卵母細胞への分化とともに体細胞分裂から減数分裂への移行がはじまる。減数分裂を開始した卵母細胞はDNA合成を行った後、第1分裂前期のdiplotene期に至り分裂停止するが、このまま長い休止期に至る。この間卵母細胞は1個ずつ将来卵胞細胞となる体細胞に取り囲まれ原始卵胞を形成する。原始卵胞のうち一部は卵胞細胞の分化と共に発育し、卵母細胞も増大する。この状態で出生となるが、その後卵胞刺激ホルモンの作用により卵母細胞の周囲をとりかこむ顆粒膜細胞は増殖して卵胞腔を形成し、卵母細胞の体積は増大する。この時期にはその後の卵成熟・初期発生に必要なmRNAおよびタンパクが蓄積されてくるが、減数分裂は停止したままである。

排卵時の黄体形成ホルモンの刺激を受けて卵母細胞は分裂を再開する(図2)。第1減数分裂前期の卵母細胞は、卵核胞(germinal vesicle)と呼ばれる大きな核を有する。減数分裂再開と共に、卵核胞は崩壊(germinal vesicle breakdown)し、染色体が凝縮し、やがて紡錘体を形成。第1減数分裂中期(Metaphase I)に至る。その後染色体は二分され、著しい不等分裂によって小さな第1極体を放出する。その後染色体は凝縮したまま核形成、DNA合成

を経ることなく再び紡錘体を形成、第2減数分裂中期に至る。ここで分裂は再び停止、精子の侵入により分裂停止は解除され、染色体は二分され第2極体を放出して雌性前核を形成し、減数分裂は終了する。

減数分裂の進行と MPF (Maturation Promoting Factor)

Masui らはホルモン処理によって成熟させたカエル卵の細胞質中に、未成熟卵を成熟させる働きのある物質が存在することを示し、これを卵成熟促進因子 (Maturation Promoting Factor:MPF)と呼んだ[1]。その後の解析により、MPF は真核細胞の細胞分裂において普遍的に存在すること、マウス卵減数分裂においては、MPF 活性は未成熟卵ではみられないが第1減数分裂中期に高い活性を示し、分裂間期には低下、第2減数分裂中期に再活性化を示し、受精後に再び低下することが報告された[2]。体細胞分裂においても MPF 活性は分裂中期(M 期)に高くなることから、MPF は M-phase promoting factor の略であるともされている。

さらに、その後の解析により MPF は cdc2 と cyclin B という二種類のタンパク質の複合体であることが示された[3-5]。体細胞分裂においては、cdc2 は常に存在するが3つのアミノ酸のリン酸化状態により活性が制御されている。一方 cyclin B は M 期の前後で合成・分解を繰り返しており、cdc2 との複合体形成により活性を制御する。マウス卵減数分裂においては、はじめからある程度の量の cyclinB が存在しており、GVBD 期では量的変化はないが、第一分裂中期に向かい急速に合成が進み、さらに極体放出の際に一時的に分解されていることが報告されている[6]。

カエル卵減数分裂における Mos

c-mos 遺伝子は、当初マウス肉腫ウイルスの細胞内ホモログとして発見された[7]。その遺

伝子産物である Mos 蛋白は、セリン・スレオニンキナーゼ活性を持ち、細胞内情報伝達シグナルの一つである MAP キナーゼカスケードを活性化する。c-mos 遺伝子の発現は精巣や卵巣において高く、他の組織では低いと報告されており[8]、生殖細胞の分化に何らかの役割を果たしているのではないかということが示唆されてきた。精巣における Mos の役割についてはなお不明な点が多いものの、卵巣においては、比較的解析の容易なカエル卵母細胞を中心に役割が明らかにされてきた。Sagata らは、カエル卵に c-mos antisense nucleotide や抗 Mos 抗体を注入することにより成熟過程の変化をみることによってその役割を解析した。その結果 Mos は、

- (1)卵成熟の開始シグナルであるプロゲステロン刺激により誘導され、卵成熟を開始させること[9]
 - (2)減数分裂間期における核形成・DNA 合成を抑制すること[10]
 - (3)第二分裂中期において分裂停止させることに関わっていること、またその作用には MPF 活性の制御を介していること[11]
- が明らかとなった。

マウス卵減数分裂における Mos

マウス卵減数分裂においては、ジーンターゲットイングにより c-mos 遺伝子欠損マウスが作成され、その表現型を解析することにより Mos の役割が明らかにされてきた[12, 13]。

c-mos ホモ欠損マウス(c-mos^{-/-})は外見上、また卵巣以外の器官においては組織学的にも野生型との違いは認められなかった。ホモ欠損マウスの生殖能力をみたところ、雄マウスでは野生型と同様の生殖能力が見られたのに対し、雌マウスでは妊娠の頻度および産仔数の著しい低下がみられ、妊孕性の低下が見られることがわかった[12]。さらにホモ欠損マウスには、卵巣奇形腫が多発することが明らかになった[12, 13]。奇形腫はしばしば両側性に発育、顕微鏡的に認められるものから腹腔内を占拠するものまで大きさはさまざまであり、組織

学的には、内胚葉、中胚葉、外胚葉由来の組織がみられ、なかには悪性転化を示すものもみられた[14]。卵巣奇形腫は卵母細胞の単為発生によるものと考えられるため、Mos はカエルと同様にマウス卵成熟においても、単為発生の抑制に関与しているのではないかと、ということがわかってきた。

Mos の卵成熟に対する関与は、マウス卵母細胞の体外成熟によっても明らかにされた。十分発達した卵胞中の卵母細胞は、卵胞腔外で培養すると自然に成熟を開始する。マウスにおいては培養開始から約2時間で GVBD をきたし、12時間前後で第1極体を放出して第1分裂を終え、その2-4時間後に第2分裂中期に至る。Mos の発現は、GVBD のころよりはじまり、第2分裂中期に至るまで徐々に増加していく[15]。c-mos ホモ欠損マウスの卵母細胞を体外培養すると、野生型と同様に約2時間で GVBD をおこし、減数分裂が再開する。この時点で減数分裂再開に Mos が必須であったカエルとは異なっている。やがて双方の卵は第1分裂中期に達する。この時点でホモ欠損マウス卵では微小管形成に異常が見られるものの、分裂装置そのものは形成される[16, 17]。その後の第1極体の放出に関しても、野生型と違いホモ欠損卵ではほぼ等割されるものから野生型と同様の不均等分裂を起こすものまで様々である。培養開始後時間を経た c-mos 欠損卵では、野生型と異なり前核を形成するものがみられ[12]、Mos が単為発生の抑制に関与することがこのことから示される。

しかし、減数分裂間期における Mos の役割に関しては詳細な検討がなされていない。第1極体放出前の卵に c-mos アンチセンスヌクレオチドを注入した実験では、卵は第1極体放出後核を形成し、第2分裂への移行が阻害された[18]。一方、c-mos 欠損マウス卵では、2回の分裂の間に軽度脱凝縮した染色体がみられるが、第2分裂への移行は行われる[15]との報告の他に、第1分裂終了後核を形成して間期に入った、とする報告も見られる[16]。ただし、これらはいずれも詳細な時間経過を追ったものではなく、厳密な検討がなされていない。ここでは、Mos の、減数分裂間期における役割を明確にするために、c-mos 欠損マウス卵を用いて第1極体放出後の染色体の変化、および各種細胞周期制御因子の変化を、極体放出時刻を基準として細胞周期をシンクロナイズさせることにより詳細に検討した。その結

果 *c-mos* 欠損マウス卵においては、第1極体放出後に一過性の染色体の脱凝縮が観察され、これは核形成の初期段階であることが示唆された。従って、Mos の機能は(1)減数分裂間期における染色体凝縮の維持に必要であること、さらに(2)減数分裂間期において、cyclin B の合成促進を介して、cdc2 kinase を早期に活性化させることが明らかとなった。

材料および実験方法

卵成熟、体外培養

第1減数分裂前期で停止した未成熟マウス卵は、*c-mos* ホモ欠損マウス(-/-)、ヘテロ欠損マウス(+/-)および野生型マウス(+/+)より得た[12]。実験に使用するマウスは、主にホモ欠損雄マウスとヘテロ欠損雌マウスを交配させ、得られた仔を用いた。また、野生型マウスとして、ヘテロ欠損マウス同士を交配させ得られたマウスを用いた。

マウスの遺伝子型判定には、PCR 法を用いた。離乳後のマウスの尾部の先を切断し、メスで細切した後、DNAzol (GIBCO)を用いてゲノム DNA を採取、鋳型として用いた。プライマーの塩基配列は、以下の通りである[12]。

mos102: 5'-TCTGTGGCCCCGTTATGCTTAGGAAAAGCA-3'

mos105: 5'-TGGGATTGAAGGCAGCCATCTTCAGCCATG-3'

mos107: 5'-TCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATT-3'

PCR 条件は、

94 °C 30", 55°C 40", 72°C 1'40", 35 cycle

とした。

マウスは3週齢から10週齢の間で実験に用いることとした。PMSG 6 I.U.(帝国臓器)を腹腔内投与し、48 時間後に頚椎脱臼にて屠殺、L-15 medium(GIBCO)中で実体顕微鏡下に卵巣を単離した。鋭利なピンセットの先で卵胞を穿刺し、ピペッティングにて周囲の顆粒膜細胞を除去し、回収、培養を開始した。培養液としては standard egg culture medium[19]を用い、Brinster [20]の方法に従って、50 μ l の drop をパラフィンオイル(for amino acid analysis, Nakarai Chemical Co.)で被い、培養条件は 5% CO₂、37°Cで行った。

培養9時間後より1時間おきに、実体顕微鏡下に第1極体放出の有無を観察し、極体を放

出した卵母細胞を別のドロップに移した。この時に移した卵母細胞を極体放出0時間後として、培養を継続、経時的にサンプリングした。

タンパク合成の阻害には、cycloheximide(Sigma) を 100 μ g/ml の濃度で用いた。

免疫染色

サンプリングした卵を酸性タイロイド液(pH2.5)で処理し、透明帯除去を行った後、standard egg culture medium 中で3回洗浄し、extraction buffer (25 mM imidazole, 10 mM KCl, 10 mM EGTA, 20% glycerol, 1% Triton X-100, pH 6.9)に移した。1 時間後、卵を poly-L-lysine にてコーティングした カバースリップ上におき、TBBS solution (162 mM boric acid, 35 mM NaOH, 144 mM NaCl, 0.05% Triton X-100) 中に移し 100%メタノールを周囲より徐々に加えた。最終的に 100%メタノールで -20 $^{\circ}$ C、15 分固定し、TBBS solution 中に移し、以下の免疫染色を行った[2]。

チューブリン染色については、1 次抗体として 抗 α チューブリン抗体(Amersham)、2 次抗体として FITC-conjugated goat anti-mouse IgG を用いた。その後、1 μ g/ml 4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride(DAPI;Sigma)を用いて染色体を染色した。卵は PBS containing 20% glycerin and 100 μ g/ml 1,4-diazabicyclo(2,2,2)-octoneを用いて封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

染色体標本の作成については、卵を 1%クエン酸溶液中で 5 分間処理した後、酢酸エタノール(酢酸:エタノール=3:1)にてスライド上に固定し[21]、DAPI を用いて染色し、同様に蛍光顕微鏡で観察した。

In vitro kinase assay

サンプリングした卵を5個1組として、PBSにて3回洗浄した後、8 μ l の Reaction Buffer (20 mM HEPES-NaOH(pH7.2), 80 mM β -glycerophosphate, 20 mM EGTA, 15 mM MgCl₂ 1 mM DTT, 1 mM NaF supplemented with 10 μ M sodium vanadate, 10 nM Calyculin A ,

1 \times Protease inhibitor Cocktail Tablet (Boehringer Mannheim)) 中に加え、液体窒素にて凍結させた後、-70°Cで保存した。

リン酸化反応に先立ち、卵を液体窒素と水(25°C)中で凍結融解を3回繰り返し、細胞を破壊した。その後、cdc2 kinase の基質として Histone H1(Boehringer Mannheim)、さらに 5 nM ATP、1 μ Cl (γ -³²P) ATP を加え、全量で 10 μ l とし、30°C で 30 分間、kinase 反応を起こさせた。反応終了後 Leamml sample buffer[22]を加え、100°C で 5 分間加熱後、サンプルを 12.5% SDS-polyacrylamide gel を用いて泳動した。その後イメージアナライザー(Fuji film:FRA2000)を用い Histone H1 への取り込み量を定量し、解析した。

ウエスタンブロッティング

50 個または 100 個の卵を 1 組として、Leamml sample buffer [22] 中に回収し、5 分間バイルした後、10%SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。分離したタンパク質を電気的に poly vinylidene difluoride (PVDF) メンブレン(Trans blot,Biomed)上に転写し、10%スキムミルク加 TBT (10mM Tris-HCl pH7.6 , 0.15M NaCl , 0.1% Tween 20)によりブロッキングを行った。メンブレンを、CBB 染色したマーカーを用いて分子量 43kD 以下、およびそれ以上の部分に分けた。43kD 以上の部分については、cyclin B1 の検出に用いることとし、1 次抗体として抗ヒトサイクリン B1 抗体 (UB1)、2 次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG 抗体を用い、Phosphatase Substrate System Kit(KPL)を用いて発色反応を行った。43kD 以下の部分については p34cdc2 の検出に用いることとした。p34cdc2 の 161-

Threonine のリン酸化を検出するために、1 次抗体として同部位のリン酸化を認識するポリクローナル抗体 (Kawabe et al.unpublished)を用いた。次いで ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体、horseradish peroxidase 標識 streptavidin と反応させた後、化学発光法 (Reneissance,NEN)を用いて検出した。XOMAT-AR(KODAK)に現像した後、PVDF メンブレンを glycine-HCl(pH2.5)で処理し、抗体を除去した。再びブロッキングした後、p34cdc2 の総量の検出を行った。検出には、1 次抗体として p34cdc2 の C 末端 20 塩基対を認識するポリクローナル抗体(Hashimoto and Ogashiwa,unpublished)を、2 次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体を、発色には Phosphatase Substrate System Kit を用いた。

結果

減数分裂間期における Mos の有無による卵母細胞染色体の変化

Mos の減数分裂間期における役割を明らかにするためには、減数分裂進行の時間経過を厳密に追う必要がある。第 1 極体放出は第 1 減数分裂の終了を意味し、実体顕微鏡下に形態的に区別できるが、培養開始後、第 1 極体の放出にいたるまでの時間には卵ごとに差がある[2]。従って、厳密な解析を行うためには、極体放出後の時間経過を一定にする必要がある。第 1 極体は培養開始 10 時間後から 16 時間後にかけて放出されたが、この間、1 時間ごとに極体放出を観察し、極体放出から 1 時間以内の卵母細胞を回収することにより、減数分裂間期の進行をシンクロナイズさせた。ヘテロ卵を第 1 極体放出直後にサンプリングし、DAPI 染色を行ったところ、凝縮した染色体の集合体が認められた。また抗 α チューブリン抗体により、卵母細胞と第 1 極体をつなぐように微小管束が存在し、終期(telophase)にあることがわかった(図 3A,A')。第 1 極体放出 1 時間後には、染色体は凝縮したままの状態であり(図 3B,B')、さらに第 1 極体放出 2 時間後では染色体は赤道面上に並び、紡錘体形成が認められた(図 3C,C')。一方ホモ卵の核相の進行を同様に追跡したところ、第 1 極体放出直後には、ヘテロ卵と同様、凝縮した染色体が観察された(図 4A,A')。その 1 時間後、ホモ卵においてのみ、染色体が集合し、核様の構造をとっていることが観察された(図 4B,B')。第 1 極体放出 2 時間後まで培養したものでは、染色体は再び凝縮し、赤道面に並びと共に紡錘体の形成が認められ、ヘテロ卵と同様、第 2 分裂中期に移行した(図 4C,C')。この一時的に認められた核様構造が染色体脱凝縮によるものか否かを検討するため、第 1 極体放出 1 時間後の卵を低張溶液で処理することにより、スライドガラス上に染色体を個々に分離させ、DAPI 染色により染色し、観察した。ヘテロ卵では、個々に分離した染色体が

観察されたが(図 5A)、ホモ卵の DNA は一塊となり、染色体構造は認められなかった(図 5B)。これはこの核様の構造体が、単に染色体が凝集したものではなく、染色体の構造変化の結果生じたことを示唆している。このことより、ホモ卵においては、減数分裂間期に一時的に染色体脱凝縮を生じることが示唆された。

減数分裂間期においてタンパク合成を阻害した際の、Mos の有無による卵母細胞染色体の変化

先の実験で、*c-mos* ホモ欠損マウス卵において、減数分裂間期に染色体が一時的に脱凝縮することが示唆された。ホモ卵に見られた脱凝縮状態は、核小体がなく、DNA 密度が一樣(DAPI 染色が一樣)であることなど、形態的に正常な核とは明らかに異なっていた。この核様体は正常な核形成とどのような関連性があるのかを確かめるため、次に我々は、第 1 極体放出後の卵を、タンパク合成阻害剤である cycloheximide を用いて処理し、染色体構造の変化を観察した。ヘテロ卵に対し、極体放出直後より cycloheximide 処理を行った場合、徐々に染色体の脱凝縮が進み、処理後 4 時間で明瞭な核小体を持ち、不均一な染色性を示す核を形成した(図 6,A-C)。しかし、同じくヘテロ卵に、第 1 極体放出 1 時間後より cycloheximide 処理を行った場合、染色体は凝縮したまま、第 2 分裂中期へと移行し、cycloheximide 処理開始 6 時間後においても、第 2 分裂中期に停止したままであった(図 7,A-C)。一方、ホモ卵を第 1 極体放出直後より cycloheximide 処理した場合は、ヘテロ卵と同様、染色体は徐々に脱凝縮し、4 時間後には核を形成した(図 6,D-F)。しかし、先の実験において脱凝縮の起きていた、第 1 極体放出 1 時間後の卵母細胞を cycloheximide 処理した場合、ヘテロの卵とは異なり、ホモ卵の染色体は再凝縮することなく、明瞭な核小体を持つ核を形成した(図 7,D-F)。このことより、極体放出 1 時間後のホモ卵にみられた染色体の脱凝縮は、正常な核形成の初期段階であることが示唆された。またホモ卵における染色体の脱凝縮は、第 1 極体放出 1 時間以内に合成されるべきタンパクの欠損、もしくは不足

によるものであり、そのタンパクが存在することにより正常卵(野生型)では第1極体放出後の卵は第2分裂中期へと移行しうることが示された。

減数分裂間期の cdc2 kinase 再活性化における Mos の作用

cdc2 kinase は MPF(M-phase promoting factor)の本体であり、M 期における染色体の凝縮を制御すると考えられている。マウス卵成熟において、cdc2 kinase は第1分裂中期ならびに第2分裂中期において高い活性を示し、減数分裂間期に活性が低下することが報告されている[6]。われわれは、*c-mos* ホモ欠損マウス卵の減数分裂間期における脱凝縮が、第1極体放出後の cdc2 kinase の再活性化の制御と何らかの関連を持つ可能性があると考え、再活性化の過程を詳細に調べた(図8)。

これまでの報告に一致して、第1極体放出時の cdc2 kinase 活性はホモ卵、ヘテロ卵ともに著しく低下していた。ヘテロ卵においては、第1極体放出1時間後には cdc2 kinase 活性は2倍近く上昇し、次の1時間にさらに約2倍になった。一方、ホモ卵では第1極体放出1時間後にも cdc2 kinase 活性の上昇は認められず、第1極体放出後2時間で約1.5倍程度上昇するにとどまった。この再活性化の遅れは、染色体脱凝縮の時期に一致していた。すなわち、Mos は減数分裂間期において、低下した cdc2 kinase の迅速な再活性化を介して染色体凝縮の維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

減数分裂間期の cyclinB の再蓄積における Mos の作用

次に、先に示した、Mos と cdc2 kinase との関係をより詳細に検討するため、cdc2 kinase の個々の構成成分の量的、質的変化を調べた。cdc2 kinase は、p34cdc2 と cyclinB の2つのタンパクの複合体であり、さらに p34cdc2 には、活性を制御するリン酸化部位が3個存在することがこれまでに知られている[23]。cdc2 kinase が活性型となるためには、p34cdc2 の14-

Thr,15-Tyr がともに脱リン酸化されており[24, 25]、かつ 161-Thr がリン酸化されていることが必要である[25, 26]。

このうち、p34cdc2 の 15-Tyr のリン酸化に関しては、電気泳動の移動度の差となって検出可能であるが、161-Thr に関しては、はっきりした移動度の差は検出されないと考えられた。そこで我々は、p34cdc2 の 161-Thr のリン酸化を特異的に検出するポリクローナル抗体を用いて検討した。ヘテロ卵においては、第1極体放出時にはcyclinBはほとんど検出されない。しかし、第1極体放出1時間後にはcyclinBの著明な増加が認められ、次の1時間でさらに増加した(図9-A,4-6)。また、p34cdc2の総量、および電気泳動の移動度には明らかな変化はなく(図9-C,4-6)、161-Thrのリン酸化レベルも変化しなかった(図9-B,4-6)。一方ホモ卵においては、第1極体放出直後のcyclinBは、やはりほとんど検出されなかった。極体放出1時間後、cyclinBはごくわずかに増加せず、次の2時間後にはやや増加したものの、ヘテロ卵に比べ、蓄積量は明らかに低下していた(図9-A,1-3)。また、p34cdc2の総量には変化は認められなかったものの(図9-C,1-3)、161-Thrのリン酸化レベルは、第1極体放出直後および1時間後において、若干の低下がみられた(図9-B,1-3)。すなわち、ホモ卵の減数分裂間期における染色体脱凝縮は、主としてcyclinBの蓄積の遅れによる、cdc2 kinaseの再活性化の遅延が原因となっていることが強く示唆された。従ってMosは、マウス減数分裂間期において、cyclinBの蓄積を促進し、染色体凝縮の維持に関与しているものと考えられる(図10)。

考察

マウス卵成熟中の第1分裂-第2分裂間期におけるMosの役割については、多くの対立する結果が存在する[15, 16, 18]。それらのほとんどは、サンプリング時間を未成熟期もしくは卵核胞崩壊期をもとにした培養時間によっている。しかし、この報告で述べたように、分裂間期の細胞中の染色体は1時間毎に著しい形態変化を起こす。それゆえ、分裂間期における詳細な検討を行うためには、第1極体放出時間を基準とした同調法が有効である。ただし、極体放出直前の変化については今回の方法では限界があり、今後の課題である。

cdc2 kinase は、catalytic subunit である p34cdc2 と、regulatory subunit である cyclinB1 からなり、染色体凝縮を介して細胞分裂の中期を制御すると考えられている[27-31]。アフリカツメガエルでは、卵成熟における cdc2 kinase 活性は Mos-MAPK シグナル伝達カスケードに支配されている[32, 33]。しかし、マウスにおいては、卵成熟開始時の cdc2 kinase 活性の上昇は、*c-mos* 欠損卵でも起こり、第1分裂中期にピークに達した後、第1極体放出とともに低下する。一方、*c-mos* 欠損卵では、MAPK 活性は上昇しておらず、第1減数分裂中には、cdc2 kinase は Mos-MAPK カスケードの影響を受けていない[15, 16]。

第1極体放出後、*c-mos* 欠損卵の cdc2 kinase 活性は第2分裂中期に向けて再上昇し、単為発生の開始と共に再び低下する[15]。第1極体放出前後の cdc2 kinase 活性変化は、主に第1分裂後期における cyclinB の分解、および再合成によっている、とされる[34]。アフリカツメガエルでは、cyclinB2 は、Mos の基質としてリン酸化を受ける[35]、あるいは間接的にリン酸化される[36]と報告されており、Mos によって cyclinB が制御されていることが示唆される。

卵成熟過程においては、cyclinB の合成と分解が共に起きており、全体量を調節している。では、Mos は cyclinB の合成・分解のどちらにかかわっているのだろうか？卵母細胞の發育途中で、後の成熟・受精および初期発生に必要な mRNA はすでに合成されており、

maternal stock として存在する。そのため、タンパク合成は転写後および翻訳後での制御を受ける[37]。転写後の制御に関しては、mRNA のポリ A 付加が翻訳調節に重要である。最近、アフリカツメガエルの *c-mos* mRNA のポリ A 付加が cyclinB mRNA のポリ A 付加に必要であることが示された[38]。マウスにおいても、*c-mos* 欠損卵において、分裂間期における cyclinB mRNA のポリAデニレーションが抑制されていることが確かめられれば、Mos が cyclinB の合成に関与することがより明確に示されるであろう。

なお、別の実験において単為発生の時期において同様に In vitro kinase assay および Western blotting を用いて cdc2 kinase 活性および構成成分について検討した結果では、*c-mos* 欠損卵においてのみ、単為発生の開始時期に一致して cdc2 kinase 活性の低下、および cyclinB 蓄積量の減少が見られた。この時期に 35S-Met を用いて合成されるタンパクをラベルし、抗 cyclinB 抗体を用いて免疫沈降反応を行ったところ、単為発生の開始時期に一致して cyclinB の合成レベルが低下し、一方合成された cyclinB の分解は亢進していないことが明らかになった。このことよりも、Mos が cyclinB の合成に関与することが示唆される。

第1極体放出1時間後のヘテロ卵をタンパク合成阻害剤で処理した時、卵は第2分裂中期に移行した。一方、*c-mos* 欠損卵は核を形成した。このことは、*c-mos* 欠損卵における第1極体放出1時間後の染色体脱凝縮が、実際に核形成の初期段階であることを示唆する。また、Mos の機能が第1極体放出後1時間以内に第2分裂への移行に十分な cyclinB を蓄積するために必要であり、その結果 cdc2 kinase を速やかに活性化させ、分裂間期における染色体を凝縮状態に保っていることが明らかになった。

ヘテロ卵およびホモ卵において、p34cdc2 の総量は第1極体放出ー第2分裂中期にかけて変化しなかった。p34cdc2 の活性化は3つのアミノ酸残基のリン酸化により調節されと考えられている[23-26]。Tyr-15 は、野生型マウス卵において、未成熟卵ではリン酸化されているが、卵核崩壊期に脱リン酸化を受け、卵成熟中は脱リン酸化されたままである[6]。また Thr-161 は、野生型マウス卵においては GV 期から第1分裂中期にかけてリン酸化さ

れ、その後はリン酸化状態を保ったままとなる(Kawabe et al, unpublished data). 我々の p34cdc2 の 161Thr のリン酸化認識抗体を用いた検討においても、ヘテロ卵では第 1 極体放出ー第 2 分裂中期間で 161Thr のリン酸化レベルには変化が見られなかった。一方ホモ欠損卵では、第 1 極体放出直後および 1 時間後に、リン酸化レベルが、微妙ではあるが若干低下した。Mos は、p34cdc2 の 161-Thr をリン酸化する CAK、あるいは脱リン酸化する KAP 活性になんらかの作用を及ぼし、野生型マウス卵において第 1 極体放出時の 161-Thr の脱リン酸化を防いでいる可能性がある。第 1 極体放出時の KAPあるいは CAK 活性が測定できれば、このことはより明らかになると考えられる。ただし、この軽度の低下は、cdc2 kinase の再活性化や染色体脱凝縮に関しては、劇的に変化する cyclinB に比較すると、重要性の小さいものであるかもしれない。

分裂間期における染色体凝縮の維持はどのような意味を持つのであろうか。c-mos 欠損卵では、卵成熟開始から単為発生するまでの過程では BrDU の取り込みがみられず、分裂間期においても DNA 合成がされていないと考えられる[39]。また、われわれの行った予備実験においても、核膜の構成成分である laminB は、この脱凝縮の際には検出されなかった。laminB は未成熟卵においては存在しないため、必ずしも核膜形成のマーカーとならない可能性はあるものの、減数分裂間期の一時的な染色体脱凝縮は、核膜の形成や DNA 合成の開始には不十分な核形成の初期に過ぎないことが示唆される。c-mos 欠損卵において、異所的な DNA 複製や光学顕微鏡レベルでの染色体異常は生じていないが、この時期に染色体の再編成や微細な変化が起きている可能性は残されている。このことが、c-mos 欠損卵のうち 30%が単為発生を起こさず、第 2 分裂中期にとどまっているにもかかわらず、妊孕性が著しく低い原因なのかもしれない。第 2 分裂中期に停止した c-mos 欠損卵の染色体構造を詳細に分析することで Mos による卵減数分裂間期における染色体凝縮維持の生物学的意義が明らかになるかもしれない。

参考文献

1. Masui, Y. and H.J. Clarke, *Oocyte maturation*. Int Rev Cytol, 1979. **57**: p. 185-282.
2. Hashimoto, N. and T. Kishimoto, *Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation*. Dev Biol, 1988. **126**(2): p. 242-52.
3. Draetta, G., et al., *Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF*. Cell, 1989. **56**(5): p. 829-38.
4. Labbe, J.C., et al., *MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B*. Embo J, 1989. **8**(10): p. 3053-8.
5. Gautier, J., et al., *Cyclin is a component of maturation-promoting factor from Xenopus*. Cell, 1990. **60**(3): p. 487-94.
6. Choi, T., et al., *Activation of p34cdc2 protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos*. Development, 1991. **113**(3): p. 789-95.
7. Oskarsson, M., et al., *Properties of a normal mouse cell DNA sequence (src) homologous to the src sequence of Moloney sarcoma virus*. Science, 1980. **207**(4436): p. 1222-4.
8. Propst, F. and G.F. Vande Woude, *Expression of c-mos proto-oncogene transcripts in mouse tissues*. Nature, 1985. **315**(6019): p. 516-8.
9. Sagata, N., et al., *Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in Xenopus oocytes*. Nature, 1988. **335**(6190): p. 519-25.
10. Daar, I., R.S. Paules, and G.F. Vande Woude, *A characterization of cytostatic factor activity from Xenopus eggs and c-mos-transformed cells*. J Cell Biol, 1991. **114**(2): p.

11. Sagata, N., *et al.*, *The c-mos proto-oncogene product is a cytosolic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs [see comments]*. *Nature*, 1989. **342**(6249): p. 512-8.
12. Hashimoto, N., *et al.*, *Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice [see comments] [published erratum appears in Nature 1994 Aug 4;370(6488):391]*. *Nature*, 1994. **370**(6484): p. 68-71.
13. Colledge, W.H., *et al.*, *Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs [see comments]*. *Nature*, 1994. **370**(6484): p. 65-8.
14. Furuta, Y., *et al.*, *Ovarian teratomas in mice lacking the protooncogene c-mos*. *Jpn J Cancer Res*, 1995. **86**(6): p. 540-5.
15. Verlhac, M.H., *et al.*, *Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse*. *Development*, 1996. **122**(3): p. 815-22.
16. Araki, K., *et al.*, *Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase*.
17. Choi, T., *et al.*, *The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(14): p. 7032-5.
18. O'Keefe, S.J., *et al.*, *Microinjection of antisense c-mos oligonucleotides prevents meiosis II in the maturing mouse egg*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(18): p. 7038-42.
19. Biggers, J.D., *Metabolism of mouse embryos*. *J Reprod Fertil Suppl*, 1971. **14**: p. 41-54.
20. Brinster, *A method for in vitro cultivation of mouse ova from two cell to blastocyst*.

- Exp. Cell Res., 1963. **32**: p. 205-208.
21. Tarcowski, *An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs*. Cytogenetics, 1966. **5**: p. 394-400.
 22. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(259): p. 680-5.
 23. Morla, A.O., et al., *Reversible tyrosine phosphorylation of cdc2: dephosphorylation accompanies activation during entry into mitosis*. Cell, 1989. **58**(1): p. 193-203.
 24. Coleman, T.R. and W.G. Dunphy, *Cdc2 regulatory factors*. Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(6): p. 877-82.
 25. Morgan, D.O., *Principles of CDK regulation*. Nature, 1995. **374**(6518): p. 131-4.
 26. Solomon, M.J., *The function(s) of CAK, the p34cdc2-activating kinase*. Trends Biochem Sci, 1994. **19**(11): p. 496-500.
 27. Hunt, T., *Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase*. Curr Opin Cell Biol, 1989. **1**(2): p. 268-74.
 28. Doree, M., *Control of M-phase by maturation-promoting factor*. Curr Opin Cell Biol, 1990. **2**(2): p. 269-73.
 29. Nurse, P., *Universal control mechanism regulating onset of M-phase*. Nature, 1990. **344**(6266): p. 503-8.
 30. Maller, J.L., *Mitotic control*. Curr Opin Cell Biol, 1991. **3**(2): p. 269-75.
 31. Kishimoto, T., *Cell reproduction: induction of M-phase events by cyclin-dependent cdc2 kinase*. Int J Dev Biol, 1994. **38**(2): p. 185-91.
 32. Kosako, H., Y. Gotoh, and E. Nishida, *Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in Xenopus oocyte maturation*. Embo J, 1994. **13**(9): p. 2131-8.
 33. Huang, C.Y. and J.E. Ferrell, Jr., *Dependence of Mos-induced Cdc2 activation on MAP kinase function in a cell-free system*. Embo J, 1996. **15**(9): p. 2169-73.

34. Hampl, A. and J.J. Eppig, *Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes*. Development, 1995. **121**(4): p. 925-33.
35. Roy, L.M., et al., *The cyclin B2 component of MPF is a substrate for the c-mos(xe) proto-oncogene product*. Cell, 1990. **61**(5): p. 825-31.
36. Xu, W., K.J. Ladner, and L.D. Smith, *Evidence that Mos protein may not act directly on cyclin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(10): p. 4573-7.
37. Gebauer, F. and J.D. Richter, *Synthesis and function of Mos: the control switch of vertebrate oocyte meiosis*. Bioessays, 1997. **19**(1): p. 23-8.
38. Ballantyne, S., D.L. Daniel, Jr., and M. Wickens, *A dependent pathway of cytoplasmic polyadenylation reactions linked to cell cycle control by c-mos and CDK1 activation*. Mol Biol Cell, 1997. **8**(8): p. 1633-48.
39. Hashimoto, N., *Role of c-mos proto-oncogene product in the regulation of mouse oocyte maturation*. Horm Res, 1996. **46**(Suppl 1): p. 11-4.

謝辞

本研究を行うにあたり、多大なご指導とご援助をいただきました東京大学医学部産科学婦人科学教室・武谷雄二教授，堤治助教授，および三菱化学生命科学研究所・橋本有弘博士に心から感謝いたします。

また，本研究を遂行するにあたり，東京大学医学部産科婦人科学教室，ならびに三菱化学生命科学研究所の皆様には様々なご支援をいただきました。あわせて深くお礼を申し上げます。

図1 卵子形成過程

図2 卵母細胞減数分裂過程

図3 c-mos ヘテロ欠損卵の第1極体放出後の卵母細胞の染色体, 微小管構築の変化
A-C; DAPI 染色, A'-C'; 抗チューブリン抗体染色
A&A', 第1極体放出直後; B&B', 第1極体放出1時間後; C&C', 第1極体放出
2時間後

図4 c-mos ホモ欠損卵の第1極体放出後の卵母細胞の染色体, 微小管構築の変化
A-C; DAPI 染色, A'-C'; 抗チューブリン抗体染色
A&A', 第1極体放出直後; B&B', 第1極体放出1時間後; C&C', 第1極体放出
2時間後

図5 c-mos ヘテロ欠損卵, ホモ欠損卵の第1極体放出1時間後の卵母細胞染色体の
低張処理標本 (DAPI 染色)

図6 c-mos ヘテロ欠損卵, ホモ欠損卵を第1極体放出直後より cycloheximide 処理
した際の染色体構造の変化 (DAPI 染色) A, ヘテロ卵, 処理前; B, ヘテロ卵,
処理1時間後; C, ヘテロ卵, 処理4時間後; D, ホモ卵, 処理前; E, ホモ卵,
処理1時間後; F, ホモ卵, 処理4時間後

図7 c-mos ヘテロ欠損卵, ホモ欠損卵を第1極体放出1時間後より cycloheximide
処理した際の染色体構造の変化 (DAPI 染色) A, ヘテロ卵, 処理前; B, ヘテ
ロ卵, 処理1時間後; C, ヘテロ卵, 処理4時間後; D, ホモ卵, 処理前; E, ホ
モ卵, 処理1時間後; F, ホモ卵, 処理4時間後

図8 c-mos ヘテロ欠損卵, ホモ欠損卵の, 第1極体放出以降の cdc2 kinase 再活性化
Histone H1 を基質として, ^{32}P -ATP を加えて kinase 反応を行った後,
12.5% SDS-PAGE にてタンパクを分離し, 基質への取り込みを定量し, グラ
フ化した。

図9 c-mos ヘテロ欠損卵, ホモ欠損卵の, 第1極体放出以降の p34cdc2, cyclinB の変

化 第 1 極体放出時刻をシンクロナイズさせた 100 個の卵を 1 組とし、
SDS-PAGE にてタンパクを分離した後、Western blotting にてタンパクの検出
を行った。A, 抗 cyclinB 抗体; B, 抗リン酸化 161-Thr(p34cdc2)抗体; C, 抗 p34cdc2
抗体; 1, ホモ卵, 第 1 極体放出直後; 2, ホモ卵, 第 1 極体放出 1 時間後; 3,
ホモ卵, 第 1 極体放出 2 時間後; 4, ヘテロ卵, 第 1 極体放出直後; 5, ヘテロ
卵, 第 1 極体放出 1 時間後; 6, ヘテロ卵, 第 1 極体放出 2 時間後

図 10 まとめ

圖1 卵子形成過程

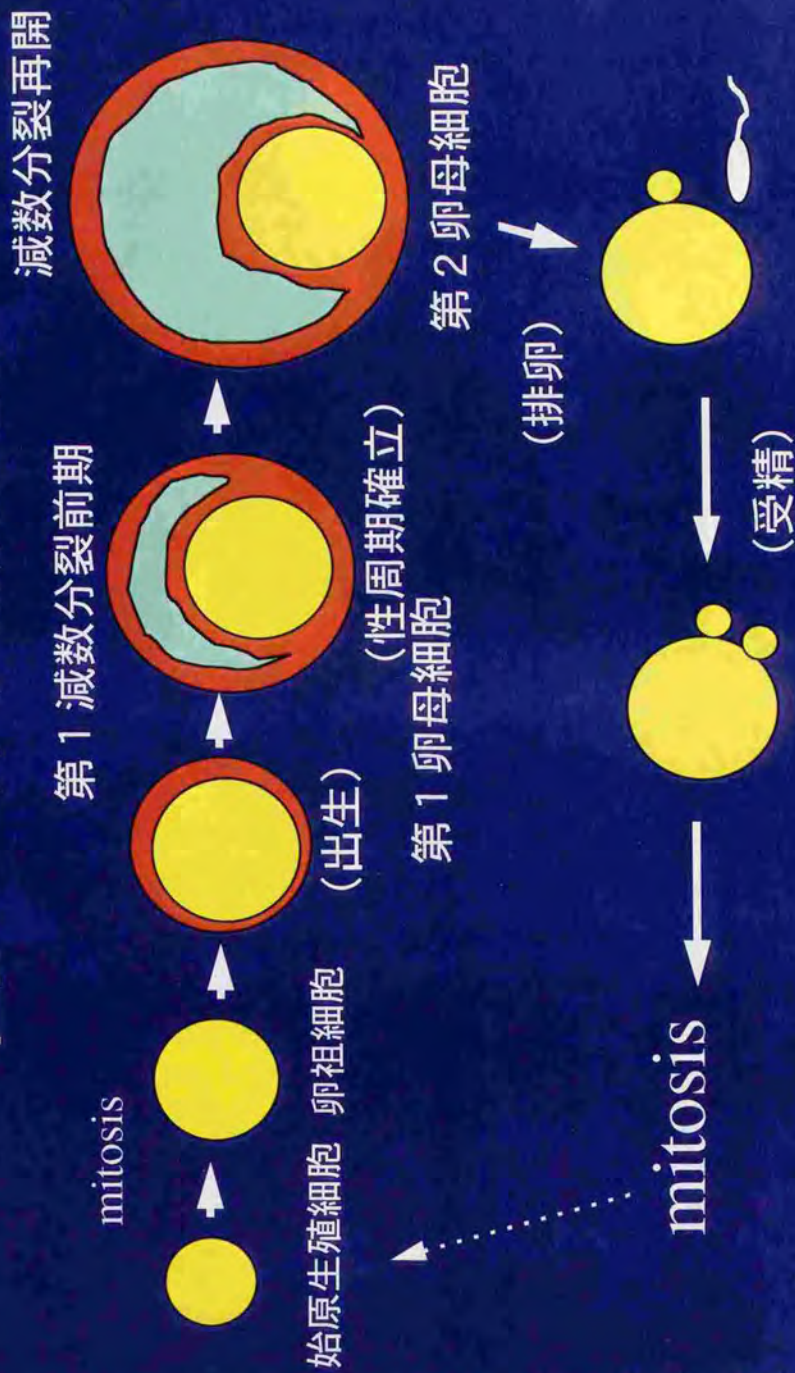


図2 脊椎動物卵の減数分裂



A



B



C



A'



B'



C'


 3

A



B



C



A'



B'



C'

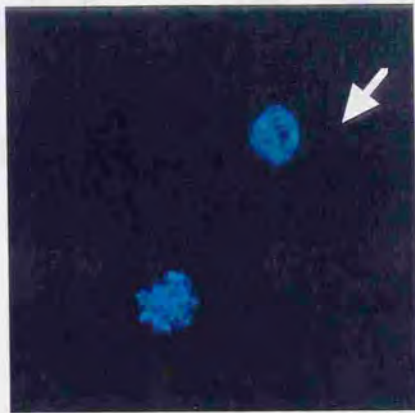


图 4

c-mos(+/-)



c-mos(-/-)



A



B



C



D



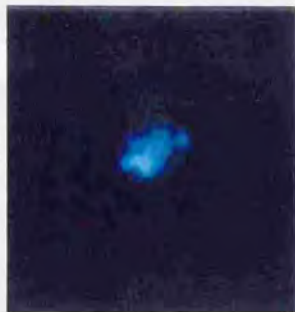
E



F



A



B



C



D



E



F



A

c-mos^{-/-}

1

2

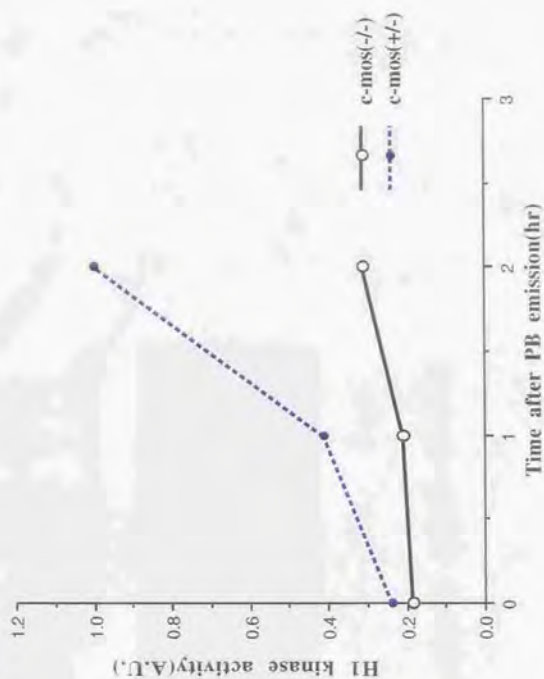
3



c-mos^{+/-}



B



1 2 3 4 5 6



A



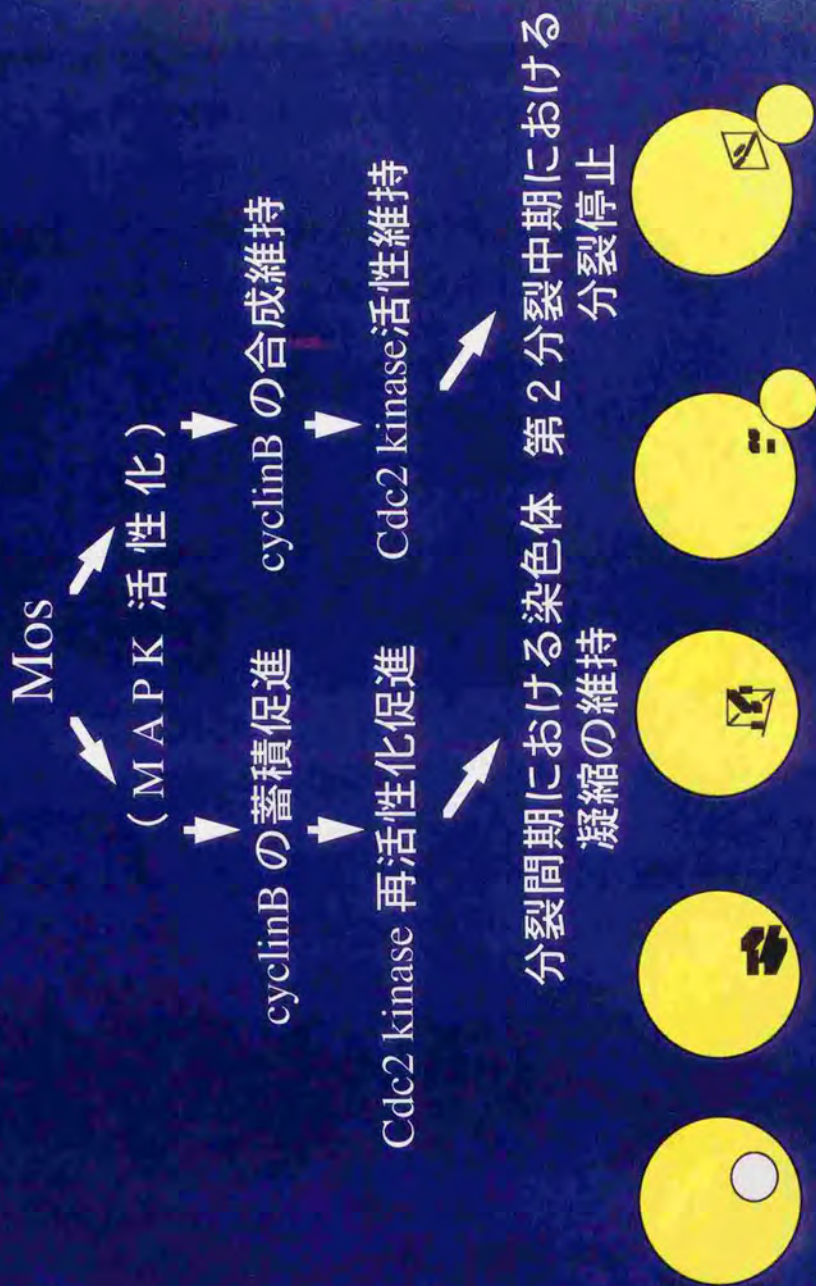
B

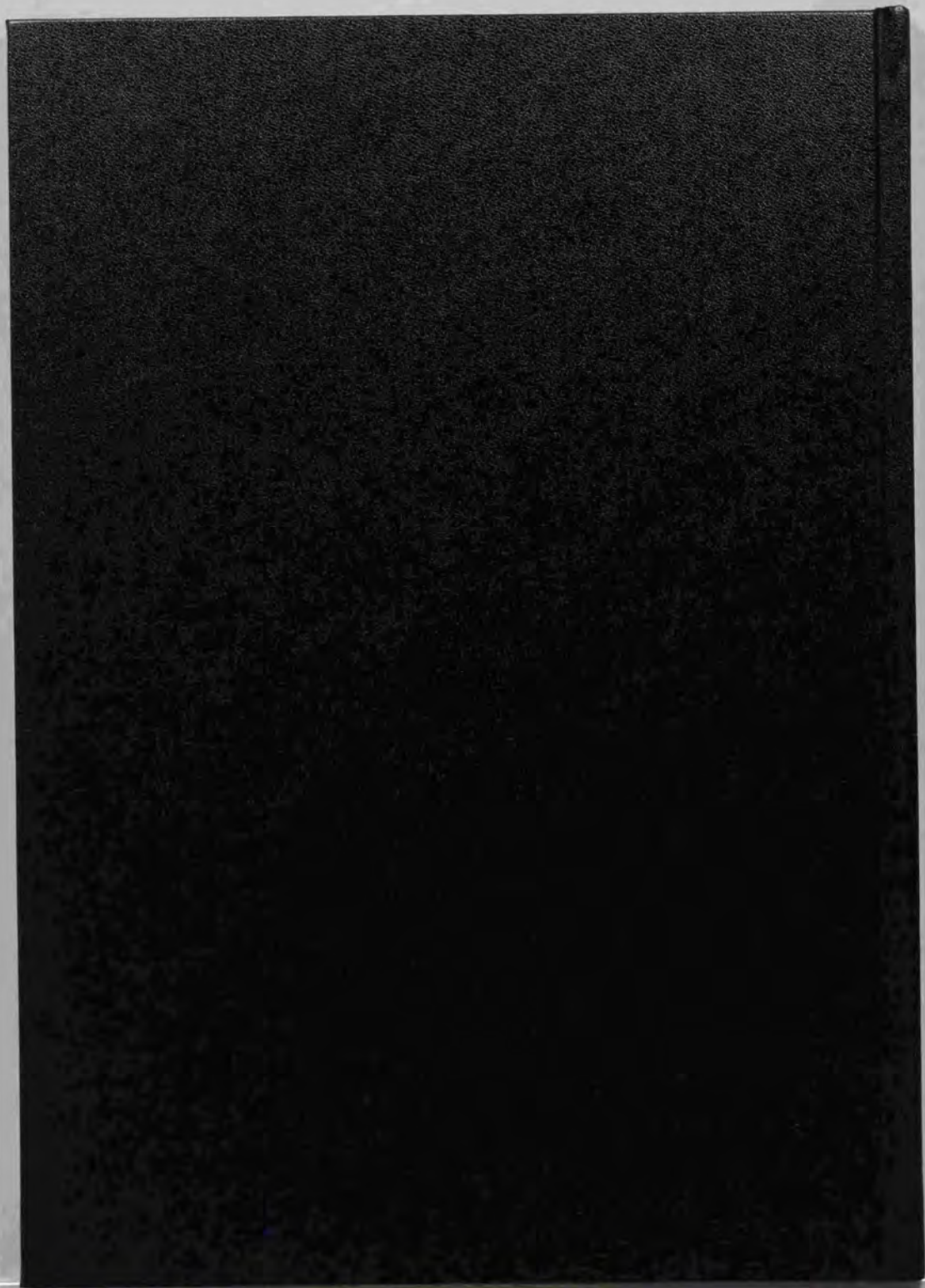


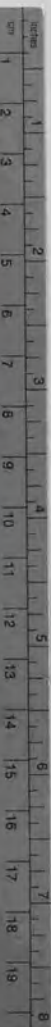
C

9

図10 まとめ







Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

