

マウス受精卵における前核形成時の分裂後期遅延の分子機構とその生理学的意義

その他のタイトル	The molecular mechanisms and physiological importance of prolonged anaphase in mouse zygote s
著者	添田 翔
学位授与年月日	2016-03-24
URL	http://doi.org/10.15083/00073462

論文内容の要旨

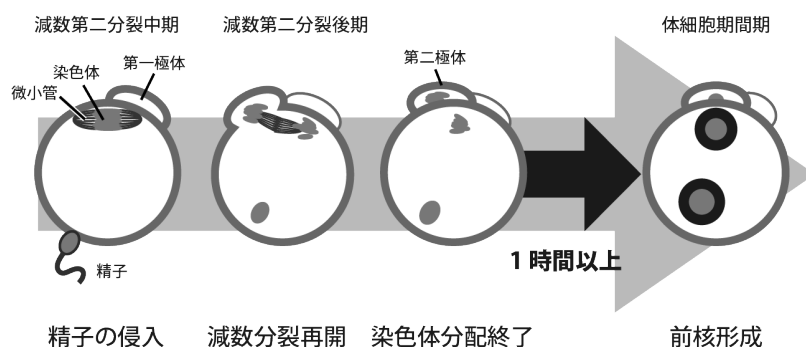
論文題目

マウス受精卵における前核形成時の分裂後期遅延の分子機構とその生理学的意義
(The molecular mechanisms and physiological importance of prolonged anaphase in mouse zygotes)

氏名 添田翔

背景

マウス卵において減数第二分裂中期(MII)で停止していた雌性染色体は受精に伴い後期へと進行し、これに引き続き前核と第二極体が形成される。この際、減数第二分裂後期の染色体分配運動を終えてから前核形成開始まではおよそ1.5時間の時間を要する。このように前核形成に長時間を要することはヒトを含む他の哺乳類でも共通している。一方で、体細胞分裂や、他の脊椎動物の前核形成時には染色体分配運動の終了と核膜形成開始の時間的なずれはほとんどないことから、哺乳動物の前核形成時に卵特異的な制御があることが伺える。この前核形成時間制御という卵細胞の特殊な分裂期制御が、他の現象のために起こる単なる副次的なものであるか、またはそれ自体が正常な発生などに対して必要あるものであるかは全く不明であった。そこで本研究ではこの前核形成の時間制御の分子機構とその生理的意義の解明を目的とした。



背景図. 受精卵の前核形成までの過程

MOS-MEK-ERK 経路は卵細胞の MII 停止に働く kinase cascade であるが、哺乳動物では前核形成時間の制御にも関与することが知られている。しかし前核形成制御における ERK 下流ターゲットなど、その制御機構の詳細については不明であった。本研究では ERK 活性と前核形成開始タイミングの関係について細胞生物学的手法を用いて精査し、ERK の役割について再考した。

体細胞分裂終了時には脱リン酸化酵素活性の上昇が重要な働きをすることが知られているが、分裂期終了時に起こる個々のイベントの責任脱リン酸化酵素や活性制御機構について決定的な理解はなされていない。Mastl-Ensa-PP2A B55 経路は核膜再形成を制御する有力な候補経路であり本研究ではこれに注目した。この経路は kinase である Mastl が Cdk1 によりリン酸化され活性化し、活性化 Mastl は Ensa をリン酸化し、リン酸化 Ensa は PP2A B55 に結合しその活性を阻害するという機構からなる(図 2 参照)。分裂期終了時には Cdk1 不活性化からこの経路を通じ、PP2A B55 活性化へと至る。卵細胞でも Mastl 経路は存在し、MII 期開始に働くことが知られている。本研究ではこの経路が前核形成にも寄与することを示し、さらに前核形成時には経路中のどの過程がいかんして延長されるかについて解析した。

結果・考察

ERK-RSK 活性の前核形成への役割。

ERK は MII 停止解除後も数時間活性を維持し、これが不活性化することが前核形成の必要条件と考えられてきた。しかし核膜孔構成分子の免疫染色を用いた前核形成タイミングの精査を行うと、これまで明視野観察から測定されてきた時期より早く前核形成が開始していることが明らかとなった。そこで活性化型リン酸化 ERK 免疫染色を用いた ERK 活性の測定と、前核の観察を同一の卵で行うことで両者の関係を精査すると、ERK 不活性化より早く前核形成が開始していることが明らかとなり、ERK 不活性化は前核形成に必要ないことが示された。次に MEK 阻害剤 U0126 による ERK 早期不活性化の前核形成への影響を見た。U0126 処理により ERK は直ちに不活性化され、前核形成は早まったが、それでも分裂後期開始から前核形成開始までは約 1 時間を要していた。すなわち ERK は前核形成に抑制的に働くが、その不活性化は前核形成開始に十分ではないことが明らかとなった。

前核形成における ERK ターゲットとして下流 kinase の RSK に着目した。RSK はカエル、ヒトゲ等では卵の細胞周期停止を担うが、マウスでは MII 期停止に RSK は働かず、その機能は未知であった。RSK の阻害の前核形成への影響を見ると、ERK 活性に影響を及ぼすことなく前核形成を ERK 阻害と同程度早める効果があった。したがって ERK は前核形成制御において RSK を下流ターゲットとしていることが示唆された。以上より ERK-RSK

は、前核形成開始に直接的に働く経路を抑制し前核形成を遅らせることが示唆された。

Mastl 経路は前核形成タイミングを制御する。

前核形成に直接働く制御因子の候補として PP2A 活性を制御する Mastl 経路の前核形成における役割を検討した。まず Mastl 経路が前核形成に寄与するか解析した。PP1、PP2A 阻害剤オカダ酸は低濃度では前核形成を遅らせ、高濃度ではこれを完全に阻害した。さらに Mastl ノックダウンは前核形成を早め、逆に過剰発現は前核形成を遅らせた。これらの結果は Mastl 経路が前核形成開始を制御することを示唆している。次に Mastl 経路構成因子のリン酸化動態を調べた。Mastl、Ensa の脱リン酸化は Cdk1 不活性化から遅れて起こり、そのタイミングは前核形成の直前であった (図 1)。以上より Mastl の脱リン酸化タイミングの制御により前核形成開始時間が制御されることが強く示唆された。

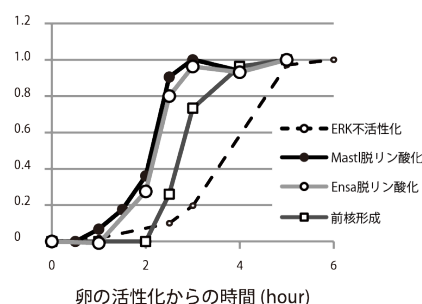


図 1.前核形成、ERK 不活性化、Mastl-Ensa 脱リン酸化タイミングの比較

さらに RSK 阻害により Mastl、Ensa の脱リン酸化が早まったことから、ERK-RSK 経路の Mastl 経路への交流が示唆された。以上の結果から推察される前核形成時間 制御の分子機構の概形を図 2 に示した。RSK は Mastl 活性を高めるように働き、PP2A 活性化を遅らせ前核形成開始時間が制御されるというモデルが示唆された。

前核形成を早期に誘導すると雄性前核形成に異常が起こる。

次に前核形成に長時間を要することの意義について、人為的に前核形成を早めその影響を見ることで検討した。脱リン酸化酵素の過剰発現により前核形成開始を染色体分配終了と同時程度まで早めた単為発生胚 (受精刺激と同等の刺激を与え、極体放出を抑制し、雌性染色体のみで発生を開始させた卵) と受精卵を観察した。前核形成を早めた単為発生胚では前核形成に異常は見られず、その後の第一卵割分裂でも異常は見られなかった。一方で前核形成を早めた受精卵では雄性前核の形成に異常が見られ小さな雄性前核が形成された。さらに続く第一卵割で染色体分離異常が引き起こされた。したがってマウス卵細胞では精子核から雄性前核への雄性染色体の正常な変化の為の時間を、細胞周期を調整することで確保していることが示唆された (図 3)。

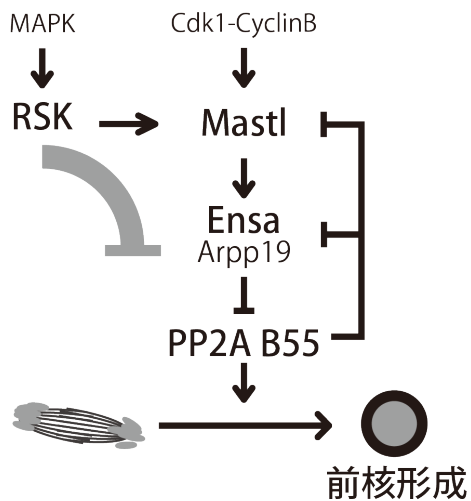


図 2
本研究から提唱される
前核形成時間制御機構

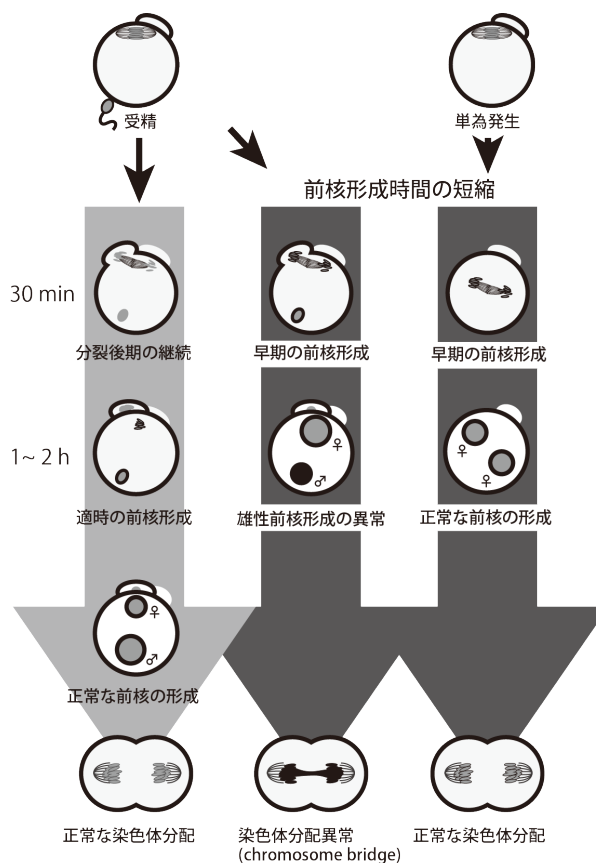


図 3
前核形成時間制御の意義と
その破綻による発生異常

まとめ

本研究ではマウス前核形成の時間的制御機構として *Matl-Ensa-PP2A B55* 経路に対する *ERK-RSK* 経路による調整が働くことを明らかにした。一方で *RSK* 阻害条件下でも分裂後期開始から前核形成まで 1 時間程度は要していたことから、*RSK* による *Mast1* 経路の調整以外にも *Mast1* 経路を調整する機構があることが伺える。*Mast1* 経路と関連する因子の解析により前核形成開始制御機構の全容が明らかになると期待される。また生理的意義として精子侵入から雄性前核形成までの時間を卵の細胞周期を制御することによって確保し、胚発生に必要な正常な雄性ゲノムの変化を保証することを明らかにした。ここで精子核の変化には雄性前核を形成する前にある程度の時間分裂後期細胞中に置かれる必要があることがわかったが、どのような変化が必要であるのか、核膜の存在や細胞周期の進行など、何がこの変化を阻害するのかについて、さらなる解析を行うことは生殖・発生、核・染色体制御などの分野において重要な意義があるものと考えられる。