

学位論文

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)**

平成 27 年 12 月博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

添田 翔

<目次>

略語	1
Abstract	2
1 章. 序論	5
2 章. 結果	
2.1. リン酸化 ERK 抗体による ERK 活性の測定	13
2.2. 雌性前核形成は ERK 不活性化より先に起こる.....	14
2.3. 阻害剤による ERK 不活性化または RSK 阻害は前核形成を早める.....	15
2.4. リン酸化 Ensa は前核形成の直前に減少する.....	16
2.5. PP2A 活性は前核形成タイミングを制御する.....	18
2.6. Mastl 発現量に応じて前核形成タイミングは変化する.....	20
2.7. RSK 阻害は Ensa 及び Mastl の脱リン酸化タイミングを早める.....	21
2.8. 実験結果より予想されたシグナル経路の挙動の数理モデリング.....	22
2.9. RSK は Mastl Thr297 を in vitro でリン酸化する.....	24
2.10. 前核の早期形成は雄性前核の矮小化、 第一卵割での染色体不分離を引き起こす.....	24
3 章. 考察	27
4 章. 材料、手法	34
5 章. 参考文献	42
謝辞	51
図	52

<略語>

M II 期 ; 減数第二分裂中期

MPF ; M-phase promoting factor

CSF ; cytostatic factor

Cdk1 ; cyclin dependent kinase 1

PP1 ; protein phosphatase 1

PP2A ; protein phosphatase 2A

Mast1 ; microtubule-associated serine/threonine kinase-like

Ensa ; α -endosulphine

Arpp19 ; cyclic AMP-regulated phosphoprotein 19

INM ; 核膜の内膜 (inner nuclear membrane)

ONM ; 核膜の外膜 (outer nuclear membrane)

ER ; 小胞体 (endoplasmic reticulum)

NPC ; 核膜孔複合体 (nuclear pore complex)

NEBD ; 核膜崩壊 (nuclear envelope breakdown)

APC/C ; 分裂後期促進複合体 (anaphase-promoting complex/cyclosome)

RSK ; 90 kDa ribosomal S6 kinase (p90^{RSK})

M II 卵 ; M II 期で停止している卵細胞

BAF ; barrier to autointegration factor

U-Act ; U0126 存在下での卵の活性化

B-Act ; BI-D1870 存在下での卵の活性化

GST ; グルタチオン S トランスフェラーゼ

<Abstract>

マウス卵において減数第二分裂中期（MII期）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、これに引き続き第二極体が放出され、次いで前核が形成される。この際、減数第二分裂後期開始から前核形成開始までは2時間弱の時間を要する。体細胞分裂では後期開始から核膜再形成までは十数分であることから、卵特異的な制御があることが伺える。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を解析した。

卵細胞における主要な細胞周期制御因子はM-phase promoting factor (MPF) と cytostatic factor (CSF) である。CSFはMOS-MEK-ERKから成り、卵特異的なMII期停止を担う経路である。MPFはCdk1-Cyclin B1を本体とし、さらに脱リン酸化酵素PP2Aの活性を調整することで制御するCdk1-Mastl-Ensa-PP2A経路を構成因子として含む、体細胞分裂期にも重要な働きを持つ経路である。これらの因子の働きについて解析した。ERKやその下流のRSKの阻害により前核形成が早まった一方で、前核形成はERK不活性化前に開始していたことから、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。次にMastl、Ensa脱リン酸化は前核形成の直前に起こり、PP2A阻害、Mastl過剰発現は前核形成を遅らせたことから、Mastl経路が前核形成開始を直接制御することが示唆された。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のMastl経路への交流が示唆され、前核形成時間制御の分子機構の概形が明らかとなった。

次に前核形成に長時間を要することの意義について調べた。人為的に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、続く第一卵割での染色体分離異常が引き起こされた。雌性染色体のみで発生させた単為発生胚ではこのような前核や分裂の異常は見られなかった。したがってマウス卵細胞では精子核から雄性前角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。

<Abstract>

Mammalian matured oocytes are arrested at metaphase II. After the fusion with sperm, oocytes resume meiosis, leading to female chromosome segregation, polar body emission and pronuclear formation. During this process, it takes more than one hour for female chromosomes to be enveloped after chromosome segregation ends. This is in contrast to somatic cells in which nuclear envelope reassembly begins just after chromosome segregation has completed. Here, I investigated the regulatory mechanisms and the physiological significance of this nuclear formation delay during mouse pronuclear formation.

Two factors play key roles in the regulation of cell cycle in oocytes: CSF, which is composed of MOS-MEK-ERK, and MPF, which is composed of Cdk1-Cyclin B1. MPF also contains Cdk1- Mastl- Ensa- PP2A B55 pathway to suppress the phosphatase which opposes Cdk1. I first show that inhibition of MEK or p90^{RSK}, which is a downstream kinase for MOS-ERK pathway in oocytes, accelerates pronuclear formation. However my results also demonstrated that pronuclear formation preceded the inactivation of ERK-p90^{RSK} pathway, indicating that the other factors than p90^{RSK} determines the timing of pronuclear formation. I speculated that the factors that counteract MOS-ERK-p90^{RSK} pathway are the potent candidates for pronuclear formation accelerators and thus focused on mitotic phosphatases. Pronuclear formation timing is delayed by okadaic acid, which is an inhibitor for PP1 and PP2A in a dose dependent manner, suggesting that pronuclear formation timing is determined by the degree of these phosphatase activities. To address the question of how phosphatase activity delay is achieved, I investigated the Mastl pathway. I found that phospho-Ensa was maintained

for more than one hour after the onset of anaphase II, but decreased just before pronuclear formation. These results suggest that PP2A regulated by Mastl-Ensa determines pronuclear formation timing. Moreover I found that inhibition of p90^{RSK} accelerated the decrease of phospho-Mastl and phospho-Ensa as well as pronuclear formation, suggesting that p90^{RSK} is involved in upstream of Mastl pathway to delay PP2A activation.

I next investigated the physiological importance of delayed pronuclear formation by accelerating the pronuclear formation timing. I found that acceleration of pronuclear formation in zygotes caused small paternal pronuclear formation and further caused severe chromosome bridge in first cleavage division stage while acceleration of pronuclear formation didn't affect pronuclear size nor cause mitotic defect in first cleavage division in parthenogenetic embryos. Thus I propose that anaphase elongation during pronuclear formation is required for sperm chromatin to be reorganized into proper zygotic chromatin.

<1 章. 序論>

受精卵での雌性染色体分裂の特徴

排卵された脊椎動物未受精卵は減数第二分裂中期 (MII 期) に停止している。受精に伴い雌性染色体は減数第二分裂を再開し分裂後期へと入り、分配された染色体の一方は卵細胞から極体として排出され、もう一方は卵細胞内で前核 (雌性前核: 半数対ゲノムを含んだ核) を形成する。この時、同時に卵細胞内では侵入した精子核がクロマチンリモデリングを起こした後、雄性前核が形成される。この過程で精子核からはクロマチン高度凝集因子プロタミンが放出され、卵内のヒストンが取り込まれる。このように雌性、雄性染色体はそれぞれ特徴的な変化を起こし同時に前核形成を起こす (序論図 1 A)。

哺乳動物ではこの受精の過程で、分配された雌性染色体が前核を形成するまで 2 時間弱の時間を要する。対して培養細胞の体細胞分裂では分裂後期開始から核膜再形成は十分程度である (序論図 1B)。前核形成時の様子をより詳細に記述すると染色体分配運動は約 30 分で終了しており、その後、染色体が 1 時間以上凝縮したままである。後期紡錘体中央部に局在した Aurora B の働きにより核膜再形成が阻害され、染色体分配運動が未完了であると核膜再形成を起こさないようにする機構があることが知られているが (Afonso, et al., Science, 2014)、上述のように染色体分配運動終了後も前核形成までは長時間かかることは、この機構では説明できない。また雌性減数第二分裂では細胞サイズ、紡錘体サイズが大きい、それらがほとんど同じサイズの第一卵割での分裂後期開始—核膜再形成時間は約 30 分でこれは染色体分配運動の時間とほぼ同じである。したがって前核形成に長時間がかかることは、その形態的な特徴 (細胞サイズが大きいこと) により副次的に起こされるものではなく、そのための卵細胞特異的な機構があることがうかがえる。また、前核形成時間は受精卵でも単為発生卵 (受精の代わりに擬似受精刺激: 卵の活性化刺激、を与え細胞周期を進行させた卵) でも同じであることから、精子より持ち込まれた因子や精子クロマ

チンからのシグナルによる制御ではなく卵内に存在する因子による制御であることが伺える。この前核形成の特徴的な時間制御メカニズムおよびその生理的意義は未解明である。

細胞周期制御の観点から

Cdk1-Cyclin B1 は細胞分裂期の開始と終了に主要な役割を果たす kinase-cofactor であり、細胞を分裂期へと移行させる M-phase promoting factor (MPF) の本体である。MPF は機能の面から初め発生工学的手法を用いてカエル卵より maturation promoting factor として発見された (Masui and Markert, *J. Exp. Zool.*, 1971)。その後 Cyclin が生化学的手法によりウニ初期胚から発見され (Evans, et al., *Cell*, 1983)、それ以前に遺伝学的手法により出芽酵母から発見されていた Cdc2/Cdk 1 の機能が同定され (Hartwell, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1970; Simanis, et al., *Cell*, 1986)、これらが MPF の本体であること、卵細胞周期のみならず体細胞周期も制御することが明らかにされた (Lohka, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1988, Gautier, et al., *Cell*, 1988, Labbe, et al., *EMBO J.*, 1989)。分裂期開始時に Cdk1-Cyclin B は様々な分子をリン酸化し、染色体の凝縮、核膜の崩壊、紡錘体の形成などを促す。姉妹染色体の紡錘体微小管への双方向性結合が確立すると分裂後期促進複合体 APC/C が活性化し直ちに Cyclin B1 が分解へと導かれ Cdk1 は不活性化し、分裂期を終了する。マウス卵減数第二分裂においても Cyclin B の分解、Cdk1 の不活性化は分裂後期開始から直ちに (30 分以内に) 起こることが分かっている。

分裂期終了には Cdk1 によりリン酸化された基質の脱リン酸化が必要である。出芽酵母においては Cdc14 がこれを担うことが知られている。他の種でも Cdc14 のホモログは確認されているが、この分裂期終了における働きは保存されていないと考えられている (Berdougo et al., *Cell Cycle*, 2008; Mocciaro and Schiebel, *J. Cell Sci.*, 2010)。他の種においては、分裂期終了を担う phosphatase およびその制御機構について完全には理解されていないが、

protein phosphatase 1 (PP1)、protein phosphatase 2A (PP2A) が有力な候補とみられている (Che et al., FEBS letter, 1998)。PP1 の制御機構としては Cdk1 によるリン酸化によって不活性化—自己脱リン酸化による活性化といった機構や (Wu, et al., Nat. Cell Biol., 2009)、膨大な種類の活性制御因子 (主には抑制因子) による制御などが知られている。PP2A は足場サブユニット (A サブユニット)、制御サブユニット (B サブユニット)、触媒サブユニット (C サブユニット) から成る。B サブユニットには B55、B56、B^{''}、B^{'''} の 4 つのファミリーが存在し、この内 B55 ファミリーは Cdk リン酸化コンセンサスに高い特異性を持つことが *in vitro* での解析から示されている (Ferrigno, et al., Mol. Biol. Cell, 1993)。PP2A (B55 複合体) には後述するように Cdk1-Microtubule-associated serine/threonine kinase-like (Mastl) - α -endosulphine (Ensa) - PP2A (Mastl 経路) からなる制御機構が存在する。PP1、PP2A とともに分裂期終了時に働くことを示す実験が様々行われているが、Cdk1 基質と PP2A は共精製されるが PP1 はされないことから、PP1 より PP2A のほうが Cdk1 基質の脱リン酸化を担う直接の因子のより有力な候補と考えられている (Ferrigno et al., Mol. Biol. Cell, 1993; Che et al., FEBS letter, 1998)。

Mastl/Greatwall kinase は変異により分裂期進行が妨げられる遺伝子としてショウジョウバエより発見された kinase である (Yu et al., J. Cell Biol., 2004)。その後アフリカツメガエル卵抽出液の実験系より Greatwall/Mastl-Ensa-PP2A 経路は Cdk1 活性化から PP2A 不活性化を結ぶことにより分裂期開始と分裂期状態の維持を制御する経路であることが明らかとなり、ヒト培養細胞、マウス卵でも重要な働きを持つことがわかっている (Adhikari, et al., J. Cell Biol., 2014)。Mastl 経路では、まず Cdk1 によるリン酸化により Mastl が活性化され、次に活性化した Mastl により Ensa または類似の cyclic AMP-regulated phosphoprotein19 (Arpp19) がリン酸化され、リン酸化 Ensa または Arpp19 が PP2A-B55 に結合することにより PP2A 複合体が不活性化されるという機構からなる (Mochida et al., Science, 2010; Gharbi-Ayachi et al., Science, 2010)。

Mastl 経路は分裂期開始時の働きに加えて分裂期終了時にも役割を持つことが知られている。正確な染色体分配のためには染色体分配終了後に細胞質分裂という順序は守られなくてはならないが、どちらも APC/C による基質（それぞれ cohesin、Cyclin B1）の分解を引き金としている。ここで、Cyclin B1 分解とそれに伴う Cdk1 不活性化から PP2A 活性化までの時間に Mastl 経路の働きにより猶予を持たせることで細胞質分裂を引き止め、分裂期終了時のイベントの順序を制御することが報告されており、Mastl 経路が分裂期終了のタイマーとして働くことが提唱されている (Cundel, et al., Mol. Cell, 2013)。Mastl 経路の不活性化においては PP2A からの Mastl、Ensa にフィードバックループが働くことが知られるが、この他にも PP1 が Mastl 経路不活性化に働くとの報告もある (Heim, et al., EMBO Rep., 2015)。

Cdk1 活性と PP2A 活性による基質のリン酸化—脱リン酸化と分裂期開始—終了制御の概略を序論図 2 に示した。

核膜形成の観点から

核膜は脂質二重膜より構成され、内側 (INM) と外側 (ONM) で異なる構成のタンパク質が局在する。ONM は小胞体 (ER) に連続し、INM はそこに局在するタンパク質を介して核ラミナ及び、クロマチンと連結する。核膜には輸送のために INM と ONM が連結された穴 (核膜孔) があり、そこに核膜孔複合体 (NPC) という 30 種程の nucleopolin (Nups) 等のタンパク質からなる巨大複合体が挿入されている (Hetzer et al., Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 2005)。

高等生物は細胞質に紡錘体を形成するため、核内で凝縮した染色体が紡錘体微小管と結合することを可能にする機構として分裂期に核膜の崩壊 (NEBD) が起こる。NEBD はまず Nups の解離から始まる。Nup98 の NPC からの解離が引き金となり NPC が崩壊する (Dultz, et al., J. Cell Biol., 2008)。これに続き核ラミナの脱重合、INM タンパク質の核ラミナやクロマチンとの結合の解離が起こり、核膜が崩壊する (Gerace and Blobel, Cell, 1980; Beaudouin, et al.,

Cell, 2002)。これらの分子は単体あるいは部分的な複合体を形成したまま、一部は細胞質に、一部は崩壊した核膜とともに分裂期 ER に局在する。NEBD における核膜タンパク質同士やクロマチンとの相互作用の変化は、CDK1 や PKC、PLK1、Aurora A などの分裂期 kinase によりこれらの核膜タンパク質が直接リン酸化されることによる制御があることが知られる (Güttinger, et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2009)。

分裂後期から終期にかけて核膜は再びクロマチン周辺に再形成するが、これは単純な NEBD の逆再生という訳ではない。核膜再形成の最初期には NPC の再形成が開始することが知られる。Nup107-160 複合体からなる核膜孔前駆体や、そのリクルーターの ELYS がクロマチン周辺に集合し、次いで分裂期 ER がクロマチンに結合する (Walther, et al., Cell, 2003; Harel, et al., Mol. Cell, 2003)。分裂期 ER からの核膜シートは INM タンパク質により DNA/クロマチンと結合し、これによりクロマチンは膜で覆われる (Anderson and Hetzer, Nat. Cell Biol., 2007; Anderson and Hetzer, J. Cell Biol., 2008)。その後 NPC の再構成が完了し、これを通り大部分の核ラミナが核内に運ばれる。

体細胞期における核膜形成開始の制御機構に関して、空間的な制御機構に関してはクロマチン上に存在する RanGEF による RanGTP 産生が importin β を介して Nup107-160 複合体を制御する機構が知られる (Clarke and Zhang, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2008)。一方で核膜再形成の時間的制御に関する知見としては Hela 細胞を用いた RNAi スクリーニングから制御因子として PP2A-B55 が同定されており、そのノックダウン細胞では核膜再形成までの時間が長くなることが報告されている (Schmitz et al., Nat. Cell Biol., 2010)。この報告では PP2A の別のサブユニットのノックダウンでも同様の効果が確認されたが、他の脱リン酸化酵素は同定されなかった。したがって核膜の再形成のタイミング制御機構に関して一つの鍵となるステップとして、核膜崩壊の際に CDK1 をはじめとする様々な kinase によりリン酸化された基質の (おそらく PP2A B55 による) 脱リン酸化による制御が重要であると考えられる。しかしその脱リン酸化

されるべきターゲットに関しては未知であり、またその他の核膜の再形成の開始制御機構に関しても詳細は未だはっきりとわかっていない。

卵細胞特異的な細胞周期制御の観点から

卵での細胞周期の調節には Cdk1-Cyclin B1 からなる MPF に加え、MOS-MEK-ERK 経路により構成される cytostatic factor (CSF) が大きな役割を果たしている (Sagata, et al., *Nature*, 1989; Haccard, et al., *Science*, 1993)。CSF は MPF の発見と同時に、ヒョウガエルにおいて MII 卵内に存在する二細胞期胚を分裂期に停止させる因子として発見された (Masui and Markert, *J. Exp. Zool.*, 1971)。その後、CSF の実態は MOS-MEK-ERK 経路であることがわかり、その種間での高い保存性も明らかとなった。

脊椎動物で共通した受精卵 MII 期停止分子機構を以下に示す。MII 期での停止は MOS-ERK 経路を介し、後期促進複合体 (APC/C) 阻害因子 Emi2/Erp1 が安定化されることで APC/C が抑制され、MPF の活性が高いまま維持されることにより引き起こされる (Nishiyama et al., *Nature*, 2007; Schmidt, et al., *Genes Dev.*, 2005)。マウス卵においても同様の機構が CSF として機能することが知られる (Colledge et al., *Nature*, 1994; Hashimoto et al., *Nature*, 1994; Shoji et al., *EMBO J.*, 2006; Miyagaki et al., *Dev. Biol.*, 2011)。このようにして脊椎動物未受精卵は MII 期で維持され受精を待つ。受精に伴う細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は CaMKII を活性化する。その結果 Emi2 はユビキチン-プロテアソーム系での分解へと導かれ APC/C が活性化する (Lorca et al., *Nature*, 1993; Rauh et al., *Nature*, 2005)。APC/C により Cyclin B1 が分解され MPF 活性は消失し、MII 期停止は解除され、減数第二分裂後期へと進行する。この受精に伴う減数分裂の再開を卵の活性化と呼ぶ。この後、MOS は続く体細胞周期の開始までに分解する (序論図 3)。

脊椎動物において、卵の活性化には MOS の分解及び MOS-ERK 経路の不活性化は必要なく、また実際に MOS-ERK 経路の不活性化は MII 期停止の後に起

こる。ただし受精後のカルシウムイオン濃度の上昇は一過性であるので、MOSが分解されない場合、再び細胞周期が停止してしまう。受精刺激からMOSの分解までの時間はMOS-ERK経路により停止する動物種間でも異なり、アフリカツメガエルにおいては約1時間、マウスにおいては6-8時間、イトマキヒトデ等の棘皮動物、クラゲなどの刺胞動物では受精後直ちに起こる（棘皮動物、刺胞動物は減数分裂の終わったG1期で停止しているが、MOSが分解されないで細胞周期停止が解除されない）(Tachibana et al., EMBO J., 1997)。MOSの分解時期の制御機構及び、脊椎動物におけるMOS経路の活性維持の意義については未だ明らかとされていない。またMOS-ERK経路下流で細胞周期停止を担う因子についても種間の差が見られ、アフリカツメガエル、イトマキヒトデではERKにより活性化されたp90^{RSK} (RSK; 90 kDa ribosomal S6 kinase)がEmi2の安定化（カエル）またはCdc45の抑制（ヒトデ）に必須の働きをもつことが知られているが、マウスにおいてRSKはMII期停止に必要ではないことが明らかとなっている (Dumont et al., J. Cell Biol., 2005)。

このERK経路が雌性前核形成開始制御に関与するという報告が数例存在する。MOS-ERK経路のMAPKKであるMEKの恒常活性型変異体をMII卵（MII期で停止している卵細胞）に発現させた後、受精を行った場合、前核の形成が見られないことが報告されている (Moos et al., Dev. Biol, 1996)。また、MOS-ERK経路の不活性化は受精後6-8時間後に起きることが知られるが、この時期が前核形成の時期と重なるという報告もある (Moos et al., Biol. Reprod, 1995)。このように減数分裂期においてはMOS-ERK経路が活性化している状態では核膜の形成が起きないと考えられてきた。しかしこれらの研究において前核の有無は明視野顕微鏡による観察像で判断されており、当研究室においての蛍光顕微鏡による観察では明視野観察よりも早い時期に前核が形成している様子が見られ、ERK活性との関係をより正確な解析による再考が必要であると考えられた。

本研究では、まず **ERK** 不活性化と前核形成の関係を正確に理解するために、両者を同時に観測した。その結果、**ERK** 脱リン酸化は前核形成の後に起こることがわかった。一方で **ERK-RSK** の阻害により前核形成が早まった。これらの結果より、**ERK-RSK** 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は必要ないことが明らかとなった。次に体細胞において分裂期終了のタイマーとしての働きが知られる **Mastl** 経路について解析を行い、前核形成時の活性の挙動、不活性化あるいは活性化の影響、**RSK** との関係を調べた。その結果、**RSK** により活性の調整を受けた **Mastl** 経路が前核形成時間を制御するという機構が示唆された。また、本研究ではさらに前核形成を早めることで、前核形成時時間をかける意義に迫った。結果として前核形成を早めた場合、正常な雄性前核形成ができないことがわかった。したがっては **Mastl** 経路と **ER-RSK** 経路の働きにより前核形成タイミングが制御され、その結果、雄性前核形成のための時間を確保していることが示された。

<2 章. 結果>

2.1. リン酸化 ERK 抗体による ERK 活性の測定

個々のマウス卵での ERK 活性の測定にリン酸化 ERK 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。ERK1/2 は MEK により T202/ Y204; ERK1, T185/Y187; ERK2 がリン酸化されることで活性型となるが、用いたリン酸化 ERK 抗体はこの T202/ Y204、T185/Y187 がリン酸化された活性型 ERK1/2 を認識する。まずリン酸化 ERK 抗体による MII 卵 5、10、15、20 個での Western Blot を行った。リン酸化 ERK 抗体による Western Blot では 42、44kDa の位置にのみバンドが得られ、その特異性について確認できた (図 1A)。3 回の独立した実験からシグナル強度と定量性のグラフを描き、適当な強度の得られるよう 15 個の卵を次の実験では用いた。次に卵の活性化から 0 時間、1 時間、2.5 時間、3 時間、5 時間、6 時間でサンプリングを行い、リン酸化 ERK 抗体を用いて Western Blot を行った。Western Blot による解析では卵の活性化後、リン酸化 ERK シグナル強度は 3 時間で減弱を始め、5 時間で大きな減弱が見られた (図 1B)。この挙動は先行研究で卵細胞 lysate を用いた ERK の kinase 活性測定から得られた挙動と同様のものであった (Verlhac et al., Development, 1994)。これらの結果からリン酸化 ERK 抗体を用いた Western Blot により ERK 活性が測定できることを確認した。次に、Western Blot に用いたサンプルと同様のタイムスケジュールで活性化卵を固定し、このリン酸化 ERK 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。リン酸化 ERK の局在は、卵細胞質全体に見られ、MII 期ではスピンドル極にも強い局在が見られた。卵の活性化からの時間経過に伴う卵全体のリン酸化 ERK シグナル強度の変遷を蛍光免疫染色により測定した結果は、Western Blot の結果とほぼ合致した (図 1C)。以上より、リン酸化 ERK 抗体を用いた蛍光免疫染色で個々の卵の ERK の活性を測定できることが確認できた。

2.2. 雌性前核膜形成は ERK 不活性化より先に起こる

ERK 活性の指標としてリン酸化 ERK 抗体による染色を、雌性前核形成の指標として mAb414 抗体による染色を用いて ERK の不活性化と雌性前核形成の関係を調べた。この実験は図 1 の実験と同時に行った。mAb414 抗体は FG リピートという配列を持つ NPC の外側（孔側）を構成する種々のタンパク質（FG-Nups）を認識する。FG-Nups の Nup107、Nup153 は核膜形成時の比較的早期に後期染色体上に集合することが知られている（Burke and Ellenberg, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2002）。卵の活性化から 2.5 時間から mAb414 により後期染色体周辺が染色される細胞、すなわち前核形成を開始している細胞が見られ、これらの細胞でもリン酸化 ERK は検出された（図 2A、B）。次に ERK 不活性化と前核形成の関係をみた。図 2C の破線は ERK 不活性化を示すために図 1 で計測したリン酸化 ERK 強度のグラフを上下反転したものである。前核形成率と ERK 不活性化との関係を並べ比較すると、雌性前核の形成時期は ERK 不活性化より前であることが示唆された（図 2C）。さらに個々の卵に注目し、卵の活性化から 2.5 時間でのリン酸化 ERK 強度を雌性前核の有無で比較すると、リン酸化 ERK シグナルは同等に活性化状態であった（図 2D）。ここで重要なこととして、ERK は活性化状態であるが雌性前核が形成している卵が見られたことに注目したい。すなわちこの結果より、雌性前核形成に ERK の不活性化が必要でないことが示された。卵の活性化から 3 時間では前核の有無によりリン酸化 ERK 強度に差が見られたが（図 2D）、前核形成している卵でも ERK 活性が 70~80%維持されており、ERK の不活性化が前核形成に必要なことが示唆された。また卵の活性化から 3 時間で ERK 活性に前核の有無で差がある理由として前核を形成したものからリン酸化 ERK が下がるということが考えられる。

次に先行研究の結果とは異なることが示されたことに関して検証した。明視野観察を行うと、卵の活性化から 2.5 時間や 3 時間での早期の前核は観測でき

ないものが多かったが、明視野で前核が判別できないものでも mAb414 染色は陽性であるものが見られた (図 3AB)。明視野観察での前核形成率を測定し比較すると、mAb414 染色により測定した前核形成率や、ERK 不活性化よりも遅いという結果となった (図 3C 左)。明視野観察ではある程度膨潤した前核や、図 3A の 5 時間のものに見られる様に核小体様構造物のあるものでなくては明確な判別は困難であった。このため先行研究では前核形成時期を遅く判断し、ERK 不活性化との関係も見誤ったと考えられる。

2.3. 阻害剤による ERK 不活性化または RSK 阻害は前核形成を早める

次に ERK を不活性化させ雌性前核形成に与える影響を調べた。MEK の阻害剤である U0126 を用いて ERK の不活性化を行った。U0126 (25 μ M) を含む卵の活性化培地 (U0126/ActM) に MII 卵を移してから (U-Act) 1 時間、1.5 時間、2 時間、2.5 時間で固定し、蛍光免疫染色後観察を行った。まず蛍光免疫染色の結果よりこの条件での U0126 処理により ERK を 1 時間以内に不活性化できることを確認した (図 4A - C)。観察の結果 U-Act から 1 時間、1.5 時間では ERK は不活性化状態であり、染色体分配も終わっているが雌性前核は形成していないという結果が得られた (図 4B)。このことから分裂後期で ERK を不活性化しても前核形成を直ちには誘導できないことがわかった。一方、阻害剤を含まない卵の活性化培地 (ActM) での卵の活性化から 2.5 時間では前核形成率は 1 割強であるのに対し、U0126 存在下での卵の活性化から 2.5 時間ではほぼ全ての卵が前核を形成しており、卵の活性化からの各時間での前核形成率を比較すると ERK 不活性化条件下では前核形成が約 1 時間早まっていた (図 4D)。これらより前核形成は ERK のオン/オフにより直ちに制御されるものではないが、ERK 活性は前核形成に抑制的に働くことが示唆された。

次に前核形成の抑制に対する ERK のターゲット候補として、卵細胞内で ERK により活性化されることが知られている p90^{RSK} (RSK) に注目した。RSK は

カエルやヒトでは CSF を構成する因子としての働きがあるが、マウスにおいて RSK は ERK によって活性化されるという機構は保存されているものの、RSK1、2、3トリプルノックアウトマウスが正常に MII 停止できること、活性化型 RSK を発現しても MOS ノックアウト卵を MII 期停止できないことからマウスでは CSF としての機能はないことが分かっており (Dumont et al., J. Cell Biol., 2005)、マウス卵における RSK の機能は未知であった。RSK の阻害剤である BI-D1870 (15 μ M) を含む卵の活性化培地 (BI-D1870/ActM) に卵を移して (B-Act) から 1 時間、1.5 時間、2 時間、2.5 時間で固定し、蛍光免疫染色後観察を行った。前核形成タイミングは BI-D1870 処理により U0126 処理と同等程度に早まることが観察された (図 4D)。また、ほとんどの卵で前核形成が開始される B-Act から 2 時間後までにリン酸化 ERK に影響が起きていないことを確認した (図 4C)。したがって前核形成制御において ERK は RSK をターゲットにしていることが示唆された。

図 4E にこれらの結果をまとめて示した。黒の線が示す通り、単為発生過程では前核形成が起こり、ERK 不活性化が続いて起こることが示された。一方で赤線の示す通り、ERK を MEK 阻害剤 U0126 で不活性化した場合、前核形成は早期化した。ERK が不活性化し、分裂後期に入っても直には前核形成に至らなかった。また、緑線の示す通り RSK の BI-D1870 による阻害では U0126 処理と同程度に前核形成が早まった。このとき前核形成は ERK 不活性化より早かった。以上より ERK は RSK をターゲットとして前核形成に抑制的に働くが、ERK の不活性化は前核形成に必要でも十分でもないことが示された。

以上 1 節から 3 節までの内容は Soeda et al., 2013, Genes to Cells 18, 850-858 に発表しており、そちらから参照した。The definitive version is available at www.interscience.wiley.com

2.4. リン酸化 Ensa は前核形成の直前に減少する

ERK-RSK 経路が前核形成に抑制的に働くことが示唆されたが、RSK 阻害条件下でも分裂後期開始から前核形成までは1時間程度を要しており、前核形成時間制御に直接的に働く他の経路があることが考えられた。

そこで次に体細胞において分裂期終了の時間制御に働くことが知られている CDK-Mastl-Ensa-PP2A 経路に着目した。まず前核形成時における Mastl、Ensa のリン酸化状態の動態を解析した。Mastl は 98 kD のタンパク質であるが、M II 卵での Western Blot では 150 kD 付近までシフトしたバンドが得られた。CIAP 処理を行うことでダウンシフトすることから、これがリン酸化によるものであることを確認し (図 5A)、以下の実験では Mastl リン酸化状態の検出を Western Blot バンドシフトにより行った。M II 卵を卵の活性化から 30 分おきに 3 時間までと 4 時間のものを回収し、抗 Mastl 抗体で Western Blot した。バンドのダウンシフトは卵の活性化から 30 分後から見られ、間期と同位置までダウンシフトしたものは 1 時間後から見られた (図 5B)。この内最も下の位置 (間期の細胞のバンドと同位置) のバンドを定量しプロットした (図 5C)。Cdk1 活性は卵の活性化から 30 分程度でなくなることが知られており、当研究室先行研究の Cyclin B1 の Western Blot でも 30 分で検出ができなくなっていた。したがってこの結果から卵細胞において Mastl は Cdk1 が不活性化してから 2 時間程度は完全に脱リン酸化されずにいることが示唆された。

次に Ensa リン酸化状態を抗リン酸化 Ensa 抗体を用いた蛍光免疫染色で調べた。用いたリン酸化 Ensa 抗体は Mastl によるリン酸化サイト Ser67 がリン酸化された Ensa あるいは Ser62 がリン酸化された Arpp19 を認識する。このアッセイでは Ensa と Arpp19 を識別できないが、簡単のため以下では両者をまとめて Ensa と表記する。卵の活性化から 0, 1, 2, 2.5, 3, 4, 5 時間後に固定しリン酸化 Ensa 抗体、mAb414 抗体で染色し (図 6A)、リン酸化 Ensa 強度と前核形成率を測定した (図 6B 左)。リン酸化 Ensa は細胞質全体にシグナルが観察され、卵の活性化から細胞質全体でシグナルが減弱し、細胞内の特定の箇所に残ったシグナルが残ることはなかった (図 6A)。リン酸化 Ensa の減少を示すた

めに図 6B 左のリン酸化 Ensa 強度のグラフを逆さまにし、0 時間での値が 0、5 時間での値が 1 となるように拡大したものを図 6B 右に赤線で示した。Mastl と同様にリン酸化 Ensa の減少も卵の活性化から 2 時間半から 3 時間を要することがわかった。Cyclin B1 分解が卵の活性化から 30 分以内であることを考えると、Cdk1 不活性化から Ensa 脱リン酸化まで 2 時間程度かかると考えられる。ここで前核形成との関係を見ると、リン酸化 Ensa の減少は前核形成の直前に起きている様子が見られた (図 6B)。次に個々の卵に着目すると卵の活性化から 2.5 時間、3 時間で前核形成している卵は全てリン酸化 Ensa が低いことがわかった (図 6C)。すなわちリン酸化 Ensa 減少の後に前核形成が起こることが確認できた。この結果は Ensa 脱リン酸化すなわち PP2A B55 活性化により前核形成開始が引き起こされる可能性を示唆している。図 6D に Mastl 脱リン酸化、Ensa 減少、前核形成率をまとめて示した。前核形成時には卵の活性化の 1 時間後から約 2 時間をかけて Mastl、直後に Ensa が脱リン酸化し、Ensa の脱リン酸化に引き続き前核形成が起きる様子が観察された。以上の結果より、Cdk1 不活性化から Mastl および Ensa 脱リン酸化が何らかの機構により遅れることで PP2A B55 活性化が抑えられ前核形成が遅らせられているというモデルが考えられる。

このモデルに関して次に、PP2A、Mastl の前核形成時間制御への必要性をその阻害及び活性化を行い検証した。

2.5. PP2A 活性は前核形成タイミングを制御する

PP2A 活性の前核形成への影響を調べるために PP2A 阻害剤であるオカダ酸存在下での前核形成タイミングを調べた。オカダ酸は、PP2A とともに PP1 の阻害剤であるが PP2A に対してより活性が高い。ライブイメージングでの前核形成開始の判断材料として、Barrier to autointegration factor (BAF) の染色体局在が極大となる時点を指標として用いた。BAF は Lamin A や Emerin など

の核内膜タンパク質と複合体を形成する DNA 結合タンパク質であり、核膜再形成の最初期に染色体上に強い局在を一過的に示すことが知られる (Haraguchi et al., J. Cell Sci., 2008)。前核形成時も BAF の染色体局在が極大を示した直後に H2B シグナルの膨化 (染色体脱凝縮) が観察されるため、前核形成の指標として適当と考えられる。EGFP-BAF、H2B-mRFP を mRNA マイクロインジェクションにより発現させた MII 卵を卵の活性化と同時にライブイメージングを開始し、その 2 時間後に各濃度のオカダ酸を処理した。オカダ酸の処理に関して、MII 卵にオカダ酸処理を行うと紡錘体微小管の異常伸張と染色体の分散が起きること知られており (Chang et al., J. Biol. Chem., 2011)、実際活性化と同時にオカダ酸処理を行った場合や、分裂後期開始前にオカダ酸処理が行われた卵で同様の表現型が見られ、分裂後期移行の阻害や、後期に入ったものでも後期染色体の分散が見られ前核形成への影響を測ることができなかった (図 7A)。そのため、活性化から 2 時間後、すなわち分裂後期移行後にオカダ酸添加を行うことで上記の問題を回避し、前核形成への PP2A 阻害の影響を見た。分裂後期開始から EGFP-BAF シグナルが最大となるまでの時間を計測した。300 nM 以上の濃度では 7 時間の観察中には前核形成に至らないものが多く観察された (図 7A、B)。そこでこのように前核形成が完全には抑制されない条件の、オカダ酸濃度 250 nM 以下で前核形成タイミングへの影響を比較した。結果としてオカダ酸処理濃度に応じて前核形成タイミングが遅くなる様子が観察された (図 7C)。したがって前核形成タイミングは PP2A の抑制の程度に応じて遅くなり、ある程度以上に抑制されると完全に前核形成が起こらなくなることから、PP2A 活性は前核形成タイミングを制御することが示唆された。オカダ酸は PP2A と共に PP1 の阻害剤でもあるが、オカダ酸濃度 500 nM において PP2A を 70%阻害するのに対して PP1 の阻害は 20%であることが知られ、図 7B の通りオカダ酸濃度 300 nM において PP1 活性がある状況でも前核形成が完全に抑えられたことを考えると、オカダ酸処理による前核形成のさらなる遅れは PP2A 阻害による効果が大きいであろうと考えられる。ただし、PP1、PP2A 双方の阻

害による効果という可能性も否定しきれない。また、これらの結果は、オカダ酸処理により活性の変化した何らかの **kinase** の影響である可能性もあり、前核形成タイミングが **PP2A** 活性により決定されると結論づけるには不十分であると考える。

2.6. Mastl 発現量に応じて前核形成タイミングは変化する

次に **Mastl** の前核形成への影響を調べるために **Mastl** のノックダウンと過剰発現を行った。**Mastl** に対する **siRNA** と前核形成過程可視化のための **EGFP-BAF**、**H2B-mRFP mRNA** を **MII** 卵にマイクロインジェクション後 12 時間培養し、卵の活性化と同時にライブイメージングを行った。**Mastl** ノックダウンを行った卵は有意に前核形成タイミングが早まった (図 8A、B)。**Mastl** ノックダウンの前核形成を早める効果が約 10 分と大きくなかったのは、**siRNA** マイクロインジェクションによる **Mastl** タンパク質量の減少量が少なかったためと考えられる (図 8C)。排卵からの時間が長くなると、紡錘体構造に異常が出るため **siRNA** インジェクションからの培養時間を延ばすことは難しい。**Mastl** は減数第一分裂—第二分裂移行に必要であることが分かっており、**MII** 停止以前からの **siRNA** インジェクションを行うことは適当ではないと考えられる。したがってこれ以上 **siRNA** インジェクションにより減少量を上げることは技術的制約により難しい。**Mastl** 阻害剤や中和抗体の開発がなされれば、より明確な解析が可能であろう。

次に **Mastl** 発現量上昇による前核形成タイミングへの影響を調べた。**myc-Mastl**、**H2B-mRFP**、**EGFP-BAF** を **mRNA** マイクロインジェクションにより発現させ、卵の活性化と同時にタイムラプスイメージングを行った。分裂後期開始から **BAF** 蛍光極大までの時間を計り、前核形成タイミングを測定した。**Mastl** 発現量を高めると前核形成タイミングが遅くなった (図 8D、E)。

これらの結果はどちらも **Mastl** が前核形成に抑制的に働くことを強く示唆し

ている。

ここまでの結果から、Mastl-PP2A 経路が前核形成タイミングを直接的に制御することが強く示唆された。そこで次に Mastl-PP2A 経路と RSK との関係について調べた。

2.7. RSK 阻害は Ensa 及び Mastl の脱リン酸化タイミングを早める

BI-D1870 処理による RSK 阻害条件下でのリン酸化 Ensa 減少、Mastl 脱リン酸化のタイミングを調べた。BI-D1870 (15 μ M) 存在下で卵の活性化 (B-Act) を行い、各時間で固定あるいは SDS サンプル化し、抗リン酸化 Ensa 抗体で蛍光免疫染色または抗 Mastl 抗体で Western Blot した。得られた画像に対して 4 節と同様の解析を行い、図 5、6 での BI-D1870 非存在条件下と比較したものが図 9 である。Mastl 脱リン酸化は B-Act 後 1 時間から 2 時間までで起きており、RSK を阻害しない場合に比べて 1 時間程度早くなっていた (図 9A、B)。図 9B のグラフからは B-Act から 2.5 時間、3 時間で脱リン酸化 Mastl が減少している様子が見られるが、上にシフトしたバンドは全く見られないことから (図 9A)、リン酸化 Mastl が再び上昇したのではなく Mastl が分解したものと考えられる。次にリン酸化 Ensa は B-Act でも細胞質全体のシグナルが特異的な場所に局在したシグナルを残すことなく減弱する様子が見られた (図 9C)。B-Act でのリン酸化 Ensa 減少と前核形成率を比較すると、この条件でもリン酸化 Ensa 減少タイミングは前核形成より早く (図 9D)、個々の卵を見ても前核形成している卵は全てリン酸化 Ensa が低かった (図 9E)。この結果は 4 節で示唆された、Ensa 脱リン酸化が前核形成に必要であるという仮説を支持するものである。さらに、B-Act からのリン酸化 Ensa の減少はタイミングの早期化に加えて、減少後の定常状態でのリン酸化 Ensa シグナル量の低下が見られた (図 9F)。以上より、RSK 阻害条件ではリン酸化 Ensa 減少タイミング、Mastl 脱リン酸化タイミングともに前核形成と同様に 30 分から 1 時間程度早まることがわかった (図 9G)。

したがって、RSKはMastl、Ensaの脱リン酸化を遅らせる方向に働き前核形成を遅らせている、すなわちRSKがMastl経路と交流していることが示唆された。

2.8. 実験結果より予想されたシグナル経路の挙動の数理モデリング

ここでRSKのMastl-Ensa経路との交流の様式について考えたい。RSK阻害によりMastl、Ensaの脱リン酸化タイミングが早まったことから、RSKはMastlリン酸化を高める方向に働くように考えられる。ここで、RSKによるMastl活性化によってPP2A活性化タイミングを遅らせるのか、既知の制御ネットワーク経路にRSKを作用させた反応モデルを作成し、これを検証した。以下の2種類のモデルについて検証した。

モデル1；RSKがMastlを活性化（リン酸化）する

モデル2；RSKはEnsaを活性化（リン酸化）する

これらのモデルでは、Cdk1-Cyclin B-Mastl-Ensaのリン酸化リレーによりPP2A-pEnsa複合体形成が促進されてPP2Aが抑制され、またPP2AはMastl、Ensaを脱リン酸化するフィードバックループを形成している。RSKはモデル1ではMastlを、モデル2ではEnsaをリン酸化し活性化すること、RSKによりリン酸化された状態は、MastlはCdk1、EnsaはMastlによりリン酸化された状態と同程度に活性化すること、PP2Aによる脱リン酸化は一度に全てのリン酸基を外すことを仮定した。さらに2節の結果より前核形成後にERK活性が下がることから、前核形成までにRSK活性の減少の影響はないものと仮定し、RSK濃度は反応を通じて一定とした。これらのモデルについてCyclin B分解；Cdk1不活性化からの挙動をシミュレートした(<材料、手法>の数リモデリング参照)。まずモデル1は、RSKを加えないモデルと比較すると、Mastl、Ensaの脱リン酸化に時間を要し、PP2A活性化タイミングが遅れる結果となった(図10A、B)。一方でモデル2では、定常状態でEnsaリン酸化が残り、このためPP2A活性強度が下げられ、さらにPP2A活性化タイミングも遅れる結果となった。(図

10A、C)。モデル1とモデル2を比較すると、モデル2では Mastl 脱リン酸化から Ensa 脱リン酸化までのラグが大きくなっていた。また、モデル2では反応後の定常状態での Ensa リン酸化が残る結果となったが、これは RSK を一定と仮定したためと考えられ、RSK が PP2A 活性化後に活性が下がるモデルの場合では定常状態での Ensa リン酸化は残らないと考えられる。

上記のように Mastl の活性制御により PP2A 活性化タイミングを変化させることができることがわかった。ここで、モデル1では RSK による Mastl の (リン酸化による)活性化を想定したのに対して、次にモデル3として RSK が PP2A による Mastl 不活性化を阻害するモデルを検証した。PP2A の Mastl に対する反応速度定数の値を下げて計算することで、モデル3をシミュレートした。結果としてモデル3でもモデル1と同様に PP2A 活性化タイミングを遅らせることができた (図 10A、B、D)。

次に実験結果とこれらのモデルを比較した。各因子の挙動についてこれらのモデルの結果と Mastl、Ensa または前核形成タイミングを測定した実験結果とを比較した。まず、Mastl 脱リン酸化について、実験結果は RSK 阻害により Mastl 脱リン酸化が早まる結果であったが、モデル1、2ともにこれを再現していた (図 11A)。次に Ensa 脱リン酸化については、実験結果ではタイミングの遅れに加えて反応後の定常状態でのリン酸化量に差があったが、タイミングに関してはモデル1、2が、反応後のリン酸化量としてはモデル2がこれを再現していた (図 11B)。ただしこの反応後のリン酸化量の結果は RSK を一定とした仮定のためであり、実験結果と比較できる差ではないものとする。最後に前核形成タイミングについては前述の通り PP2A 活性化を指標とするとモデル1、2ともにこれを再現できた (図 11C)。以上より、モデル1、2ともに RSK 阻害あり、なしの条件での Mastl-Ensa 経路の挙動をある程度再現できたが、これらの結果からはどちらのモデルがふさわしいか結論づけることはできなかった。

2.9. RSK は Mastl Thr297 を in vitro でリン酸化する

モデル1でのシミュレーションではRSKによるMastlの活性化を想定したが、これを実験的に検証した。哺乳類 Mastl にはカエル、ヒトデ、ハエとは異なり RSK ターゲットコンセンサスモチーフ (R/K X R/K X X pS/T) に合致するリン酸化サイトがある (マウス Mastl; Thr297、ヒト Mastl; Thr299) (図 12A)。Mastl Thr297 は Mastl の N 末端と C 末端に分割された kinase ドメインをつなぐリンカー領域にあり、Cdk1 による活性制御リン酸化サイト (Thr193、Thr206) もこの領域内にあり Thr297 リン酸化により活性化が起こる可能性は十分考えられる。そこで RSK により Mastl Thr297 がリン酸化されるか in vitro リン酸化アッセイを用いて検証した。Mastl の WT あるいは Thr297 のアラニン置換変異体のグルタチオン S トラंसフェレーズ (GST) に融合した Mastl の N 末端領域 (GST-Mastl-WT-N または GST-Mastl-TA-N) を大腸菌より精製し、これを基質として活性化型 RSK によるリン酸化アッセイを行った。リン酸化の検出にはリン酸化 RSK コンセンサスモチーフを認識するリン酸化 Akt 基質抗体による Western Blot を行った。GST-Mastl-WT-N は RSK によるリン酸化が検出されたが GST-Mastl-TA-N はされなかったことから、RSK は in vitro で Mastl Thr297 をリン酸化することが示唆された (図 12B)。

2.10. 前核の早期形成は雄性前核の矮小化、第一卵割での染色体不分離を引き起こす

前核形成に長時間を要することの生理的意義に関して、前核形成を早めた場合にどのようなことが起こるか調べた。まず前核形成を早める方法について検討した。これまでに RSK 阻害、Mastl ノックダウンによって前核形成が早まることを確認していたが、いずれもその効果が弱かったため、より強い効果を示すものを探った。最近 Mastl 脱リン酸化制御に PP1 が働くことが報告されてお

り (Heim et al., EMBO Rep., 2015)、PP1 の活性化により前核形成が早まることが期待された (図 13A)。そこで PP1 の過剰発現を行いその効果を見た。PP1 には 3 つのアイソフォーム (α 、 β 、 γ) が知られ、いずれもマウス卵内で発現していることが知られるが (トランスクリプトーム (Park et al., Genes Dev, 2013)、プロテオーム (本研究室未発表データ))、いずれの過剰発現でも前核形成を早める効果が確認された (図 13B)。効果の高かった PP1 γ について、マイクロインジェクションに用いる mRNA 濃度を変え、前核形成時間を調べ、適当なインジェクション濃度を検討した (図 13C)。この後の解析には前核形成開始が染色体分配運動終了と同時程度になるように (分裂後期開始から前核形成まで約 30 分となるように) 100 ng/ μ l の mRNA を用いた。MII 卵に PP1 γ を過剰発現させた後、体外受精により受精卵を作成し、前核形成過程をライブイメージングした。PP1 の過剰発現により前核形成タイミングが雌性前核だけでなく雄性前核でも早まることが確認できた。この PP1 γ 過剰発現受精卵では特徴的な表現型として雄性前核の矮小化が観察された (図 14A)。全てのコントロール受精卵では雄性前核は雌性前核より大きかったが、前核形成早期化受精卵ではこれが逆となるものが高頻度に観察された (図 14B)。またこのような雄性前核の矮小化は前核形成までの時間が短いほど引き起こされる傾向が見られ、分裂後期開始から前核形成まで 30 分以内であった受精卵は全て雄性前核の矮小化が引き起こされたが、45 分かかった受精卵では雄性前核の矮小化は見られなかった (図 14C)。図 14C において PP1 γ シグナル相対強度が 0.8-1.2 の範囲にある、PP1 γ 過剰発現量が概ね同じ受精卵では前核形成が遅かった細胞のみ雄性前核矮小化が引き起こされなかったことは、雄性前核の矮小化は PP1 γ 過剰発現による副次的な作用ではなく、前核形成早期化によるものであることを示唆していると考えられる。

次に前核形成の早期化が発生に与える影響を調べるために、PP1 γ 過剰発現卵を体外受精させ発生を進めた第一卵割の直前からライブイメージングを行った。前核形成早期化受精卵での第一卵割では姉妹細胞にまたがって染色体が伸びる

chromosome bridge と呼ばれる染色体不分離が高頻度に観察された (図 14D)。雄性前核矮小化と染色体不分離の関係については、今回の解析では受精卵中の前核のどちらが雄性であるか見分けられないため、また技術的な困難さにより受精から第一卵割までの長期観察を行っていないため明確な解答はないが、二つの前核でサイズがほぼ同じ受精卵でも染色体不分離を起こすものが見られたことから、雄性前核サイズにあまり影響がない場合でも染色体不分離が起こされることが考えられる。次にこの染色体不分離が雄性前核形成の異常によるものか調べるために、PP1 γ 過剰発現により前核形成早期化を行った単為発生卵での第一卵割を観察すると、前核形成早期化受精卵で見られた染色体不分離の発生率は顕著に低かった (図 14E)。すなわち前核形成の早期化は雄性前核形成特異的に発生に重篤な影響を与えることを示している。

これらの結果より、前核形成までの時間は精子核から雄性染色体への変化の何らかの過程に必要であり、前核形成の早期化によりこれが阻害されると雄性前核の形態及び発生能に異常が起きることが示された。

<3 章. 考察>

本研究ではマウス卵における前核形成時間制御の分子機構として Mastl-PP2A 経路に MOS-ERK-RSK 経路が作用することを明らかにした (図 15A)。

本研究では Mastl が RSK のターゲットであることが示唆された。RSK による Mastl リン酸化候補サイト Thr297 はヒトでも RSK コンセンサスモチーフ (R/K X R/K X X pS/T) が保存されていたが、カエル、ヒトデ、ハエには存在しなかった (図 12A)。したがってこの機構はカエル、ヒトデには存在しない哺乳類に特異的な機構であることが考えられる。実際カエル、ヒトデでは前核形成までの時間はヒトやマウスほどの長時間を要しないこともこの考えと一致している。

卵細胞の細胞周期制御における RSK のターゲットが生物種によって大きく異なるという点も興味深い。カエル卵では受精のために RSK は Emi2 をターゲットとし、MII 期停止を行う。一方でヒトデ卵では受精のための細胞周期停止は G1 期で行われるため、RSK は Cdc25 をターゲットとしてこれを担う。そしてマウス卵では RSK は受精のための細胞周期停止に関与しないものの、本研究より RSK は Mastl をターゲットとし、分裂期終了を制御することが提唱された。このように生物は卵細胞の細胞周期において停止や遅延などの制御を受けるべき時期を RSK のターゲットを変えることで対応してきた様子がうかがえる。

本研究では RSK が Mastl を *in vitro* においてリン酸化すること、Mastl の活性制御によって PP2A 活性化タイミングを変化させることができることを示した。数理モデリングによる解析から、Mastl の活性制御方法としてリン酸化による活性化と、PP2A による不活性化を阻害することのどちらでも PP2A 活性化を遅らせることができることが示された。これらの結果を合わせて考えると、RSK による Mastl-PP2A 経路の制御には以下のようないくつかの様式が考えら

れる。一つ目はモデル 1 で想定した RSK が Mastl を活性化するという様式である。RSK により Thr297 がリン酸化された Mastl の活性の測定を行うことでこれが検証できるだろう。二つ目は RSK による Mastl のリン酸化により PP2A による Mastl の脱リン酸化が抑制されるという様式である。Mastl 脱リン酸化制御において Cdk1 リン酸化サイトの PP2A により脱リン酸化は Mastl 自己リン酸化サイトの PP1 による脱リン酸化の後に起こることが知られており (Heim et al., EMBO rep., 2015)、RSK によるリン酸化もこの自己リン酸化と同様な作用がある可能性が考えられる。モデル 3 のシミュレーションは単純に PP2A による Mastl の脱リン酸化反応の速度定数を低い値で計算することで行ったが、この二つめの様式をより正確に反映させたモデル (RSK によりリン酸化された Mastl は PP2A による脱リン酸化を受けにくい) でのシミュレーションもモデル 3 と同様の挙動となるか確認を行いたい。三つ目に、RSK による Mastl のリン酸化が機能的であるかの実験的解析がまだなされていないため、RSK が Mastl リン酸化以外を介して Mastl 活性を制御する可能性も考えられる。

一方で RSK 阻害では体細胞分裂時ほどまで前核形成までの時間を短縮することとはできなかったことから、今回明らかにした機構は前核形成の時間制御機構を全て説明できるものではない。また、前核形成時間短縮受精卵で分裂後期開始 (精子侵入) から前核形成まで 45 分以上かかったものでは雄性前核の矮小化が見られなかった。RSK 阻害による前核形成時間短縮の効果は約 30 分から 1 時間であるので、RSK の Mastl 経路活性化による前核形成時間の延長効果は雄性前核形成時間を保証する機構の補助的なものであると考えられる。このように RSK による前核形成遅延またはそれによる雄性前核形成時間確保の役割が補助的であるという結果は、RSK 1、2、3 トリプルノックアウトマウスが生殖可能であること (Dumont et al., J. Cell Biol., 2005) にも反しない。

また、RSK の発現により体細胞分裂での核膜形成も前核形成時のように遅らせることができるかという点、予備的な実験結果ではあるが RSK の恒常活性型を第一卵割時に発現させても前核形成時ほどの核膜形成時間の遅延を引き起こ

することができなかった。したがって RSK は卵細胞での前核形成と、体細胞での核膜再形成との時間的な違いを決定する絶対的な因子ではないと考えられる。卵細胞では、他の Mastl 経路の活性を調整する機構と協同しているため、あるいは体細胞期には働く核膜形成を促進する機構が前核形成時には欠けているために、RSK の効果が顕著になるものと予想する。

一方で重要なこととして Mastl、Ensa を介した PP2A の活性の制御が前核形成タイミングを決定していることは本研究により強く示唆されており、この経路のさらなる活性調整機構を調べることで前核形成開始分子機構の全容が明らかになると期待できる。ここで、Mos は MII 期停止のために MEK-ERK 以外の未知の因子を介して PP1 または PP2A の抑制に働くことが報告されており (Verlhac et al., EMBO J., 2000)、前核形成タイミング制御にも役割を持つ可能性がある。したがって、この未知の因子あるいは Mos 自身と Mastl 経路の関わりについて解析すべきであると考えられる。

また、本研究では前核形成制御に関する因子の一部についてはその細胞内局在を観察しているが、これらの中で染色体上やスピンドル微小管上など特定の箇所にも局在するものは見られなかった。ただし、局在を観察していない因子も一部ある。これらの因子が染色体上などで活性が続く、あるいは細胞全体より早く活性化するなどにより、シグナル経路を局所的に動かしている可能性も考えられるため、他の因子についてもその局在を解析することが必要であると考えられる。

本研究では、前核形成タイミング制御に PP2A 活性制御が強く関与することを示したが、一方で PP1 も前核形成制御に働く可能性があることを示した。ただし、本研究での解析では PP1 過剰発現による前核形成を早める効果が Mastl 経路を介しているのか明確に答えることはできず、また過剰発現した PP1 が生理的条件下では働かないターゲットに作用していることも十分考えられるため、PP1 の前核形成タイミング制御への寄与については慎重な解析が必要であると考えられる。PP1 は前述のように Mastl 経路に働き PP2A 活性化を制御するこ

とが知られているが、PP1 は他の因子を介して分裂期終了に関与することも知られている。PP1 は Repo-Man を脱リン酸化し後期染色体への局在を誘導することで、さらに Importin β や Nup153 などの核膜再形成に働く因子を後期染色体に誘導し、分裂期終了を担うことが報告されている (Vagnarelli et al., Dev. Cell, 2011)。このように、PP1 過剰発現による前核形成の早期化が Mastl-PP2A 経路を介したものであるかはさらなる解析が必要であり、ここに前核形成タイミングを特徴付ける因子が存在している可能性も考慮される。

分裂期終了に働く脱リン酸化酵素とその制御機構に関して、体細胞や、カエル卵抽出液などを用いて主に PP1、PP2A を対象として積極的に解析がなされているが、出芽酵母の Cdc14 とその制御経路のような決定的な理解はなされていない。本研究でも Mastl-PP2A 経路が前核形成制御の重要な因子であると強く示唆されたものの、PP1 の過剰発現も前核形成早期化に強い効果が示された。これは前核形成時には特殊な制御があるものの、体細胞とも共通した制御が働き得ることを示唆しており、マウス卵細胞の分裂期終了の研究に対しての有用性がうかがえる。まずカエル卵抽出液実験系などにも共通する利点として、分裂中期に生理的条件で長く停止するため、分裂中期までのプロセスに関与する因子についても解析が可能であることや、分裂後期に同調性よく、人為的に、さらにほぼ生理的条件下で誘導できる点が挙げられる。これに加えてマウス卵に特徴的な利点としては、分裂後期が長いことでこの時間に様々な実験処理を行うことができる点がある。本研究ではオカダ酸を後期に入った後に加えることで分裂期終了時特異的にその効果を確かめられた。また分裂後期が長いことから、時間制御に与える効果を顕著に見ることができる。このような利点から、分裂期終了の研究にモデル生物としてマウス卵細胞を利用することの有用性を訴えたい。

これまで事実として哺乳類の前核形成には時間を要するという事は知られていたが、それがどのような意義を持つのかについては全く問題とされてこなかった。本研究の着想段階では、染色体の分配運動が遅いのか、核膜の形成が

されても核の膨潤が遅いのか、分配された染色体が核膜に覆われずにいるのか、といった基本的な前核形成時の状況すら理解されていなかった。こうして分配を終えた染色体が核膜再形成することなく、1時間以上も凝縮したままでいるという、体細胞では全く見られない極めて特殊な状況が見過ごされてきた。本研究はこの点に初めて焦点を当てた研究であり、その意義として前核形成を遅らせることが精子核から雄性前核への変化のための時間の確保に必要であることを明らかにした (図 15B)。

単為発生卵でも前核形成タイミングが受精卵と変わらないことや、当研究室の他の実験において活性化卵に精子頭部をインジェクションした場合でも精子核変化を待たずに前核が形成される様子が見られたことから、前核形成時間制御は卵細胞内シグナル経路によって行われており、精子核からのチェックポイントのような制御はないのではないかと考えられる。

本研究では前核膜が早期に形成される場合、雄性前核形成が矮小となり、さらに染色体分配やその後の発生に重篤な影響が起こされることを示したが、この前核形成の早期化により雄性前核形成の不全がどのように引き起こされるのかは現在のところ不明である。ひとつの重要な手掛かりとして、前核形成時間を短くした受精卵で見られた矮小な雄性前核の形成という表現型は、ヒストン H3.3 シャペロンである HIRA をノックダウンした受精卵でも類似したものが見られること (Inoue and Zhang, Nat. Struct. Mol. Biol., 2014) を挙げたい。HIRA のノックダウン受精卵では精子由来 DNA へのヒストン取り込みが阻害され、さらにヒストンに結合する核膜孔複合体集合開始因子 ELYS の局在が抑制され、核膜孔を欠いた核膜が形成されたため矮小となった雄性前核が形成される。前核形成時間を短くした受精卵で矮小な雄性前核ができる原理はこれと同様であることが予想される。本研究での観察では前核形成を早期化した場合でも精子核へのヒストン取り込みは観察されていたがその量については未検証である。そこで雄性前核形成までの時間が十分ではない場合、ヒストン取り込み、核膜孔複合体の形成が不十分となり、前核が矮小となるのではないかとすることを

予想し、まずは前核形成時間短縮受精卵の雄性前核でヒストン取り込みが減少しているか、核膜孔形成量が減少しているかを調べたい。また、HIRA ノックダウンの場合 ELYS を核内膜タンパク質である emerin と融合した ELYS-emerin を発現させることで雄性前核サイズが回復される。同じように前核形成時間を短くした受精卵で ELYS-emerin を発現させ、前核サイズおよび第一卵割での染色体不分離が回復するならば、同様の機構が働いていることがわかるだろう。精子核から雄性染色体の変化は生体内で唯一 DNA から染色体を構成する過程であり、上記のような解析を行うことは発生分野に対してのみならず核・染色体の基本的な性質に対する重要な知見を与えうる。

雄性前核の矮小化の原因に関して、核膜の形成が問題なのか、細胞周期が分裂期から間期に移行してしまうことが問題なのかといった観点からの解析も興味深い。これらに関しては雄性前核矮小化の直接の原因がわかった後にアプローチできるものであると考えられる。

以上、本研究はマウス前核形成の時間的制御機構として Mastl-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。一方で上記のように RSK による効果だけでは説明しきれないこともあり、RSK による Mastl 経路の調整以外にも Mastl 経路を調整する機構があることが伺える。今後、Mastl 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。本研究は受精卵での細胞周期の時間的制御が雄性ゲノムリモデリングに重要な意義を持つという新しい概念を提唱した研究である。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・リプログラミング、核・染色体制御などの様々な分野において重要な意義があるものと

考える。

<4 章. 材料、手法>

採卵、培養

BalbC/A x C57BL6/J F1 雌マウス(6-14 週齢)に 5 IU の妊馬血清性腺刺激ホルモン、5 IU のヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) の順に 48 時間から 50 時間の間隔で投与し過排卵を誘導した。未受精卵をこの hCG 投与から 13 時間から 17 時間後のマウスから回収した。卵丘細胞を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のヒアルロニダーゼ入り M2 培地 (Sigma) 中でピペッティングすることにより取り外した後、M16 培地 (Sigma) 中で 37°C 5% CO₂ 下で培養した。本研究におけるマウスの飼育・取り扱い、卵を用いた実験に関しては「東京大学組み換え DNA 実験安全管理規則」「東京大学動物実験規則」および「東京大学動物実験実施マニュアル」に基づき、また委員会の承認を得て適正に行った。

卵の活性化

卵の活性化 (賦活化: 単為発生誘導) は活性化培地 (5 mM SrCl₂, 5 mM EGTA 入り M16 培地) により行った。ドナーマウスに hCG を投与してから、mRNA マイクロインジェクションを行った MII 卵は 22 時間後に、siRNA マイクロインジェクションを行った卵は 26 時間後に、未処理 MII 卵は 18 時間後に活性化培地へと移した。活性化培地に移した後は直ちにライブイメージング、または SDS サンプル化もしくは固定するまで 37°C、5% CO₂ 下で培養した。単為発生卵での第一卵割の観察は、mRNA マイクロインジェクション後 4 から 5 時間の MII 卵を Cytochalasin B (25 ng/ml) を加えた活性化培地に移し、さらに 7 時間 37°C、5% CO₂ 下で培養した後に開始し、その時点から 13 時間ライブイメージングを行った。

採精と体外受精

BalbC/A x C57BL6/J F1 雄マウスから精子を取り、HTF 培地中 37°C、5% CO₂ 下で前培養を行った。1 から 3 時間の前培養の後、体外受精に使用した。mRNA マイクロインジェクション後 4 から 5 時間の MII 卵の透明体を酸性タイロード液中で溶解し、再び M16 培地に戻し、そこに精子を加えることで体外受精を行った。受精卵前核形成過程の観察は精子を加えた後、直ちにライブイメージングを開始し、その時点から 7 時間観察を行った。受精卵第一卵割の観察は、精子を加え 7 時間 37°C、5% CO₂ 下で培養した後に開始し、その時点から 13 時間ライブイメージングを行った。

ウェスタンブロッティング

卵を 0.5% ポリビニルピロリドン (PVP) /PBS で洗浄後、SDS サンプルバッファで溶解、5 分間煮沸し SDS サンプル化した。SDS サンプルを SDS-PAGE により展開し Immobilon PVDF メンブレン (Millipore) へ転写した。メンブレンを Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO) で一次抗体を希釈した液に浸けプラスチックフィルムバック中で 4°C 10 時間以上振とうした後に、TBST で洗浄し、Can Get Signal Solution 2 (TOYOBO) で二次抗体を希釈した液上に室温で 1 時間静置した。TBST 洗浄後、検出液 (Immobilon Western HRP substrate (Millipore)) と反応させ、Image Quant Las 4000 mini (GE-Healthcare) で蛍光を検出した。バンドシグナル定量は ImageJ ソフトウェアを使用した。ERK1/2、リン酸化 ERK1/2 検出には 15 個、Mastl 検出には 30 個の卵を一つのレーンに使用した。

蛍光免疫染色と蛍光撮影、シグナル定量

卵の透明体を酸性タイロード液中で溶解した後、0.5% PVP /PBS で洗浄し 4% パラホルムアルデヒド、0.005% Triton X-100 液に 37°C、30 分置き固定した。サンプルは固定後 0.2% Triton X-100 /PBS で室温 30 分透過処理、3% ウシ血清アルブミン (BSA)、0.02% Triton X-100 /PBS で室温または 4°C で 1 時間以

上ブロッキングの後、一次抗体液に 4°C 10 時間以上、続けて二次抗体液に室温 1 時間静置した。一次、二次抗体は 0.1% BSA、0.02% Triton X-100 /PBS で希釈した。抗体染色後のサンプルの観察は DeltaVision SoftWorx (Applied Precision) を用いた蛍光顕微鏡で行った。サンプルの底から頂点まで 1 μm きざみに 75 枚の画像を取得した。画像にデコンボリューション処理を行い、プロジェクションをかけた。リン酸化 ERK、リン酸化 Ensa 定量は以下のように行った。プロジェクション画像から細胞全体の蛍光シグナル強度を計測し、細胞が無い領域をバックグラウンドとして差し引いたもの (絶対値) を、同日程で取得した MII 卵の絶対値の平均値で割り、相対値を求めた。シグナル強度計測には ImageJ ソフトウェアを使用した。

ライブイメージング

ガラスボトムディッシュ上でミネラルオイルに覆われた M16 培地 (体外受精卵観察用) または活性化培地 (活性化卵観察用) の液滴に卵を移し、CO₂ 顕微鏡ステージインキュベーター内で 37°C、5% CO₂ 条件でライブイメージングを行った。撮影は、スピニングディスク共焦点顕微鏡システムを用いた Yokogawa CSU22 を Metamorph ソフトウェア (Universal Imaging) で操作し行った。受精卵第一卵割の観察は 10 分間隔、それ以外は 5 分間隔で、各タイムポイントでサンプルの底から頂点まで 4 μm きざみに 21 枚の画像を取得した。得られた画像に Z-プロジェクションをかけた。

mRNA 合成

mRNA 合成のテンプレートとして pcDNA3.1 をベクターとし発現させるタンパク質の ORF の 3' にポリ A 配列が付加した配列が挿入されたプラスミド (Yamagata et al., Genesis, 2005) をポリ A 配列より 3' 側を制限酵素で切断し直鎖化したものを用いた。mRNA 合成は RiboMax™ RNA 合成キット (Promega)、ATP analog (Millipore) を用いて行った。PP1 α 、 β および γ

の cDNA はマウス精巣 cDNA ライブラリーからクローニングし、配列をデータベースと照合し確認したものを使用した。その他の cDNA は譲渡または購入 (Origene) により入手したものを使用した。

mRNA マイクロインジェクション

mRNA マイクロインジェクションは M2 培地中でピエゾマニピュレーターを用いて行った。

RNAi

siRNA、EGFP-BAF mRNA、H2B-mRFP の混合液を MII 卵にマイクロインジェクション後、M16 培地中で 37°C、5% CO₂ 下で 12 から 12.5 時間培養し、SDS サンプル化あるいは活性化培地に移しライブイメージングを行った。Mastl siRNA は 3 種類の二本鎖 RNA を混合したものを使用した。siRNA は二本鎖 RNA がアニールされたものを日本バイオサービスより購入して使用した。Mastl RNAi、コントロール RNAi (Lamin) に用いた siRNA 配列 (センス鎖) は以下のとおり。

Mastl #1: CACCATCAATGTCTAAACCTA

Mastl #2: TCCAATGAGGGTCATATTTAAA

Mastl #3: CAGGAAATTATGCAAAGTAAA

Lamin: GGAGGAGCTTGACTTCCAA

CIAP 処理

MI I 卵 30 個を TNE バッファーに溶解し、15 U CIAP または等量の TNE バッファーを加え 37°C、30 分反応させた後に 2×SDS サンプルバッファーを加え反応停止、SDS サンプル化した。

リコンビナントタンパク質精製と in vitro リン酸化アッセイ

pGEX6P1 ベクターに Mast1 WT full length、 T297A full length、 WT 1-495 (N-term) または T297A 1-495 (N-term) を挿入したプラスミドで大腸菌 BL21 株を形質転換したものからリコンビナントタンパク質を精製した。前培養液をアンピシリン含有 (0.1 mg/ml) 2×YT 培地で 100 倍希釈し 37°C で 1 時間振とう培養後、IPTG 終濃度 0.1 mM 加え発現を誘導し、30°C で 8 時間振とう培養した。細胞を回収し、細胞破碎バッファーに懸濁し、250 mM アルギニンを添加し Bioruptor を用いて 200 W、30 秒、3 回で超音波破碎した。1% Triton X-100 を加え 4°C 30 分間転倒混和した後、遠心により可溶性画分を回収した。可溶性画分からグルタチオンセファロース 4B (GE Healthcare) ビーズに目的タンパク質を結合させ回収し、細胞破碎バッファー、リン酸化アッセイバッファーで洗浄した。20 μl の反応系でリン酸化アッセイバッファー、0.1 mM ATP、目的タンパク質結合ビーズ、74 ng RSK1/MAPKAP Kinase 1a active (14-479 Millipore) を混合し、30°C、30 分間反応させた。反応後 20 μl の 2×SDS サンプルバッファーを加え反応を停止させ、5 分煮沸し SDS サンプル化した。

数理モデリング

以下のように微分方程式をたて、これらを Euler 法を用いて Excel で解いた。

全モデル共通

$$\frac{d[CDK]}{dt} = -k_{dg,CCNB}^{APC} * [CDK]$$

$$\begin{aligned} \frac{d[PEcomp]}{dt} = & k_{as,PE} * ([pEnsa] - [PEcomp]) * [PP2A] - k_{ds,PE} * [PEcomp] \\ & - k_{dp,En} * [PEcomp] - k_{dp,En}^{PP} * [PEcomp] \end{aligned}$$

$$[PP2A] = [tPP2A] - [PEcomp]$$

モデル 1

$$\begin{aligned}\frac{d[pMastl]}{dt} &= k_{p,M}^{CDK} * [CDK] * ([tMastl] - [pMastl]) - k_{dp,M} * [pMastl] \\ &\quad - k_{dp,M}^{PP} * [PP2A] * [pMastl] + k_{p,M}^{RSK} * [RSK] * ([tMastl] - [pMastl])\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\frac{d[pEnsa]}{dt} &= k_{p,En}^M * [pMastl] * ([tEnsa] - [pEnsa]) - k_{dp,En} * [pEnsa] \\ &\quad - k_{dp,En}^{PP} * [PEcomp]\end{aligned}$$

モデル 2

$$\begin{aligned}\frac{d[pMastl]}{dt} &= k_{p,M}^{CDK} * [CDK] * ([tMastl] - [pMastl]) - k_{dp,M} * [pMastl] \\ &\quad - k_{dp,M}^{PP} * [PP2A] * [pMastl]\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\frac{d[pEnsa]}{dt} &= k_{p,En}^M * [pMastl] * ([tEnsa] - [pEnsa]) - k_{dp,En} * [pEnsa] \\ &\quad - k_{dp,En}^{PP} * [PEcomp] + k_{p,En}^{RSK} * [RSK] * ([tEnsa] - [pEnsa])\end{aligned}$$

初期値、パラメータ

体細胞での知見より Ensa は PP2A の 5 倍程度であることが知られ (Cundel et al., Mol., Cell, 2013)、マウス卵でも同様と考え Ensa、PP2A の濃度を設定した。RSK、Mastl、CDK の濃度はこれらと大きく掛け離れる濃度としないように設定した。その他のパラメータに関しては初期定常状態で細胞内の条件 (Ensa、Mastl は大部分がリン酸化されている) を満たすように設定した。

$$[intCDK] = 3.3, [intpMastl] = 0.745, [intpEnsa] = 5, [intPP2A] = 0.01$$

$$[tMastl] = 0.75, [tEnsa] = 6, [tPP2A] = 1, [RSK] = 0.7 \text{ or } 0 \quad (\text{nM})$$

$$k_{p,M}^{CDK} = 10, \quad k_{dp,M} = 0.1, \quad k_{dp,M}^{PP} = 100, \quad k_{p,M}^{RSK} = 2.5$$

$$k_{p,En}^M = 8, \quad k_{dp,En} = 0.1, \quad k_{dp,En}^{PP} = 10, \quad k_{p,En}^{RSK} = 2.5$$

$$k_{as,PE} = 200, \quad k_{ds,PE} = 0.1, \quad k_{dg,CCNB}^{APC} = 1.5$$

(/min または/min/nM)

モデル 3 では $k_{dp,M}^{PP} = 20$ として計算した。

以上の数理解析は Cundel et al., Mol. Cell, 2014 で用いられたものを参考にし、これに修正を加えて作成した。

阻害剤

U0126	MEK 阻害剤	(Wako)	(25 μ M)
BI-D1870	RSK 阻害剤	(Funakoshi)	(15 μ M)
Cytochalacin B	アクチン重合阻害剤	(SIGMA)	(25 ng/ml)

抗体、染色液

一次抗体 (希釈濃度、1: 1000 (IB)、1: 500 (IF))

抗 ERK1/2 抗体	(Cell Signaling Technology)
抗リン酸化 ERK1/2(T202/Y204)抗体	(Cell Signaling Technology)
mAb414 (抗 FG-Nup 抗体)	(Covance)
抗 Lamin A/C 抗体	(Cell Signaling Technology)
抗 α -tubulin 抗体(DM1A)	(Sigma)
抗リン酸化 Ensa(Ser67)抗体	(Cell Signaling Technology)
抗 Mastl 抗体	(Cell Signaling Technology)
抗リン酸化 Akt 基質抗体	(Cell Signaling Technology)

二次抗体 (希釈濃度、1: 2000 (IB)、1: 800 (IF))

horseradish peroxidase 標識抗マウス IgG	(GE)
horseradish peroxidase 標識抗ウサギ IgG	(GE)
抗マウス IgG Alexa Fluor 647	(Invitrogen)

抗ウサギ IgG Alexa Fluor 555 (Invitrogen)

抗ラット IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen)

蛍光試薬

Hoechst33342 1 μ g/ml (Invitrogen)

試薬類

SDS サンプルバッファー: 2% SDS、125 mM Tris-HCl (pH= 6.8)、0.1 M DTT、10% glycerol、0.001% BPB

2×SDS サンプルバッファー: 4% SDS、250 mM Tris-HCl (pH= 6.8)、0.2 M DTT、5% glycerol、0.002% BPB

TBST: 0.2 M Tris-HCl (pH= 7.5)、0.5 M NaCl、0.1% Triton X-100

PBS: 140 mM NaCl、2.7 mM KCl、8.1 mM Na₂HPO₄、1.5 mM KH₂PO₄

2×YT 培地:

TNE バッファー: 10 mM Tris-HCl (pH= 7.5)、100 mM NaCl、1mM EDTA、1% NP-40

細胞破碎バッファー: 20 mM PIPES (pH= 7.0)、150 mM KOAc、1 mM EGTA、1 mM DTT

リン酸化アッセイバッファー: 25 mM Tris-HCl (pH= 7.5)、10 mM MgCl₂、

<5 章. 参考文献>

Adhikari D, et al. 2014. Mastl is required for timely activation of APC/C in meiosis I and Cdk1 reactivation in meiosis II. *Journal of Cell Biology* 206: 843-853.

Afonso O, Matos I, Pereira AJ, Aguiar P, Lampson MA, Maiato H. 2014. Feedback control of chromosome separation by a midzone Aurora B gradient. *Science* 345: 332-336.

Anderson DJ, Hetzer MW. 2007. Nuclear envelope formation by chromatin-mediated reorganization of the endoplasmic reticulum. *Nature Cell Biology* 9: 1160-1166.

Anderson DJ, Hetzer MW. 2008. Reshaping of the endoplasmic reticulum limits the rate for nuclear envelope formation. *Journal of Cell Biology* 182: 911-924.

Beaudouin J, Gerlich D, Daigle N, Eils R, Ellenberg J. 2002. Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina. *Cell* 108: 83-96.

Berdougo E, Nachury MV, Jackson PK, Jallepalli PV. 2008. The nucleolar phosphatase Cdc14B is dispensable for chromosome segregation and mitotic exit in human cells. *Cell Cycle* 7: 1184-1190.

Burke B, Ellenberg J. 2002. Remodelling the walls of the nucleus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3: 487-497.

Chang HY, Jennings PC, Stewart J, Verrills NM, Jones KT. 2011. Essential Role of Protein Phosphatase 2A in Metaphase II Arrest and Activation of Mouse Eggs Shown by Okadaic Acid, Dominant Negative Protein Phosphatase 2A, and FTY720. *Journal of Biological Chemistry* 286: 14705-14712.

Che SL, Wu WG, Nelman-Gonzalez M, Stukenberg T, Clark R, Kuang J. 1998. A phosphatase activity in *Xenopus* oocyte extracts preferentially dephosphorylates the MPM-2 epitope. *Febs Letters* 424: 225-233.

Clarke PR, Zhang CM. 2008. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 464-477.

Colledge WH, Carlton MBL, Udy GB, Evans MJ. 1994. Disruption of C-Mos Causes Parthenogenetic Development of Unfertilized Mouse Eggs. *Nature* 370: 65-68.

Cundell MJ, Bastos RN, Zhang TL, Holder J, Gruneberg U, Novak B, Barr FA. 2013. The BEG (PP2A-B55/ENSA/Greatwall) Pathway Ensures Cytokinesis follows Chromosome Separation. *Molecular Cell* 52: 393-405.

Dultz E, Zanin E, Wurzenberger C, Braun M, Rabut G, Sironi L, Ellenberg J. 2008. Systematic kinetic analysis of mitotic dis- and reassembly of the nuclear pore in living cells. *Journal of Cell Biology* 180: 857-865.

Dumont J, Umbhauer M, Rassinier P, Hanauer A, Verlhac MH. 2005. p90Rsk is not involved in cytostatic factor arrest in mouse oocytes. *Journal of Cell Biology* 169: 227-231.

Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. 1983. Cyclin - a Protein Specified by Maternal Messenger-Rna in Sea-Urchin Eggs That Is Destroyed at Each Cleavage Division. *Cell* 33: 389-396.

Ferrigno P, Langan TA, Cohen P. 1993. Protein Phosphatase 2a1 Is the Major Enzyme in Vertebrate Cell-Extracts That Dephosphorylates Several Physiological Substrates for Cyclin-Dependent Protein-Kinases. *Molecular Biology of the Cell* 4: 669-677.

Gautier J, Norbury C, Lohka M, Nurse P, Maller J. 1988. Purified Maturation-Promoting Factor Contains the Product of a Xenopus Homolog of the Fission Yeast-Cell Cycle Control Gene Cdc2+. *Cell* 54: 433-439.

Gerace L, Blobel G. 1980. Nuclear-Envelope Lamina Is Reversibly Depolymerized during Mitosis. *Cell* 19: 277-287.

Gharbi-Ayachi A, Labbe JC, Burgess A, Vigneron S, Strub JM, Brioude E, Van-Dorsselaer A, Castro A, Lorca T. 2010. The Substrate of Greatwall Kinase, Arpp19, Controls Mitosis by Inhibiting Protein Phosphatase 2A. *Science* 330: 1673-1677.

Guttinger S, Laurell E, Kutay U. 2009. Orchestrating nuclear envelope

disassembly and reassembly during mitosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10: 178-191.

Haccard O, Sarcevic B, Lewellyn A, Hartley R, Roy L, Izumi T, Erikson E, Maller JL. 1993. Induction of Metaphase Arrest in Cleaving *Xenopus*-Embryos by Map Kinase. *Science* 262: 1262-1265.

Haraguchi T, Kojidani T, Koujin T, Shimi T, Osakada H, Mori C, Yamamoto A, Hiraoka Y. 2008. Live cell imaging and electron microscopy reveal dynamic processes of BAF-directed nuclear envelope assembly. *Journal of Cell Science* 121: 2540-2554.

Harel A, Orjalo AV, Vincent T, Lachish-Zalait A, Vasu S, Shah S, Zimmerman E, Elbaum M, Forbes DJ. 2003. Removal of a single pore subcomplex results in vertebrate nuclei devoid of nuclear pores. *Molecular Cell* 11: 853-864.

Hartwell LH, Culotti J, Reid B. 1970. Genetic Control of Cell-Division Cycle in Yeast .1. Detection of Mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 66: 352-&.

Hashimoto N, et al. 1994. Parthenogenetic Activation of Oocytes in C-Mos-Deficient Mice. *Nature* 370: 68-71.

Heim A, Konietzny A, Mayer TU. 2015. Protein phosphatase 1 is essential for Greatwall inactivation at mitotic exit. *Embo Reports* 16: 1501-1510.

Hetzer MW, Walther TC, Mattaj IW. 2005. Pushing the envelope: Structure,

function, and dynamics of the nuclear periphery. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21: 347-380.

Inoue A, Zhang Y. 2014. Nucleosome assembly is required for nuclear pore complex assembly in mouse zygotes. *Nature Structural & Molecular Biology* 21: 609-616.

Labbe JC, Capony JP, Caput D, Cavadore JC, Derancourt J, Kaghad M, Lelias JM, Picard A, Doree M. 1989. Mpf from Starfish Oocytes at 1st Meiotic Metaphase Is a Heterodimer Containing 1 Molecule of Cdc2 and 1 Molecule of Cyclin-B. *Embo Journal* 8: 3053-3058.

Lohka MJ, Hayes MK, Maller JL. 1988. Purification of Maturation-Promoting Factor, an Intracellular Regulator of Early Mitotic Events. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 3009-3013.

Lorca T, Cruzalegui FH, Fesquet D, Cavadore JC, Mery J, Means A, Doree M. 1993. Calmodulin-Dependent Protein Kinase-Ii Mediates Inactivation of Mpf and Csf Upon Fertilization of *Xenopus* Eggs. *Nature* 366: 270-273.

Masui Y, Markert CL. 1971. Cytoplasmic Control of Nuclear Behavior during Meiotic Maturation of Frog Oocytes. *Journal of Experimental Zoology* 177: 129-&.

Miyagaki Y, Kanemori Y, Baba T. 2011. Possible involvement of mitogen- and stress-activated protein kinase 1, MSK1, in metaphase-II arrest through

phosphorylation of EMI2 in mouse oocytes. *Developmental Biology* 359: 73-81.

Mocciaro A, Schiebel E. 2010. Cdc14: a highly conserved family of phosphatases with non-conserved functions? *Journal of Cell Science* 123: 2867-2876.

Mochida S, Maslen SL, Skehel M, Hunt T. 2010. Greatwall Phosphorylates an Inhibitor of Protein Phosphatase 2A That Is Essential for Mitosis. *Science* 330: 1670-1673.

Moos J, Visconti PE, Moore GD, Schultz RM, Kopf GS. 1995. Potential Role of Mitogen-Activated Protein-Kinase in Pronuclear Envelope Assembly and Disassembly Following Fertilization of Mouse Eggs. *Biology of Reproduction* 53: 692-699.

Moos J, Xu Z, Schultz RM, Kopf GS. 1996. Regulation of nuclear envelope assembly disassembly by MAP kinase. *Developmental Biology* 175: 358-361.

Nishiyama T, Ohsumi K, Kishimoto T. 2007. Phosphorylation of Erp1 by p90rsk is required for cytostatic factor arrest in *Xenopus laevis* eggs. *Nature* 446: 1096-1099.

Park SJ, Komata M, Inoue F, Yamada K, Nakai K, Ohsugi M, Shirahige K. 2013. Inferring the choreography of parental genomes during fertilization from ultralarge-scale whole-transcriptome analysis. *Genes & Development* 27: 2736-2748.

Rauh NR, Schmidt A, Bormann J, Nigg EA, Mayer TU. 2005. Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation. *Nature* 437: 1048-1052.

Sagata N, Watanabe N, Vandewoude GF, Ikawa Y. 1989. The C-Mos Proto-Oncogene Product Is a Cytostatic Factor Responsible for Meiotic Arrest in Vertebrate Eggs. *Nature* 342: 512-518.

Schmidt A, Duncan PI, Rauh NR, Sauer G, Fry AM, Nigg EA, Mayer TU. 2005. *Xenopus* polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity. *Genes & Development* 19: 502-513.

Schmitz MHA, et al. 2010. Live-cell imaging RNAi screen identifies PP2A-B55 alpha and importin-beta 1 as key mitotic exit regulators in human cells. *Nature Cell Biology* 12: 886-893.

Shoji S, Yoshida N, Amanai M, Ohgishi M, Fukui T, Fujimoto S, Nakano Y, Kajikawa E, Perry ACF. 2006. Mammalian Emi2 mediates cytostatic arrest and transduces the signal for meiotic exit via Cdc20. *Embo Journal* 25: 834-845.

Simanis V, Nurse P. 1986. The Cell-Cycle Control Gene Cdc2+ of Fission Yeast Encodes a Protein-Kinase Potentially Regulated by Phosphorylation. *Cell* 45: 261-268.

Soeda S, Yamada K, Ohsugi M. 2013. Inactivation of mitogen-activated

protein kinase is neither necessary nor sufficient for the onset of pronuclear formation in mouse oocytes. *Genes to Cells* 18: 850-858.

Tachibana K, Machida T, Nomura Y, Kishimoto T. 1997. MAP kinase links the fertilization signal transduction pathway to the G(1)/S-phase transition in starfish eggs. *Embo Journal* 16: 4333-4339.

Vagnarelli P, Ribeiro S, Sennels L, Sanchez-Pulido L, Alves FD, Verheyen T, Kelly DA, Ponting CP, Rappsilber J, Earnshaw WC. 2011. Repo-Man Coordinates Chromosomal Reorganization with Nuclear Envelope Reassembly during Mitotic Exit. *Developmental Cell* 21: 328-342.

Verlhac MH, Kubiak JZ, Clarke HJ, Maro B. 1994. Microtubule and Chromatin Behavior Follow Map Kinase-Activity but Not Mpf Activity during Meiosis in Mouse Oocytes. *Development* 120: 1017-1025.

Verlhac MH, Lefebvre C, Kubiak JZ, Umbhauer M, Rassinier P, Colledge W, Maro B. 2000. Mos activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways. *Embo Journal* 19: 6065-6074.

Walther TC, et al. 2003. The conserved Nup107-160 complex is critical for nuclear pore complex assembly. *Cell* 113: 195-206.

Wu JQ, Guo JY, Tang W, Yang CS, Freel CD, Chen C, Nairn AC, Kornbluth S. 2009. PP1-mediated dephosphorylation of phosphoproteins at mitotic exit is controlled by inhibitor-1 and PP1 phosphorylation. *Nature Cell Biology* 11: 644-U451.

Yamagata K, Yamazaki T, Yamashita M, Hara Y, Ogonuki N, Ogura A. 2005. Noninvasive visualization of molecular events in the mammalian zygote. *Genesis* 43: 71-79.

Yu JT, Fleming SL, Williams B, Williams EV, Li ZX, Somma P, Rieder CL, Goldberg ML. 2004. Greatwall kinase: a nuclear protein required for proper chromosome condensation and mitotic progression in *Drosophila*. *Journal of Cell Biology* 164: 487-492.

<謝辞>

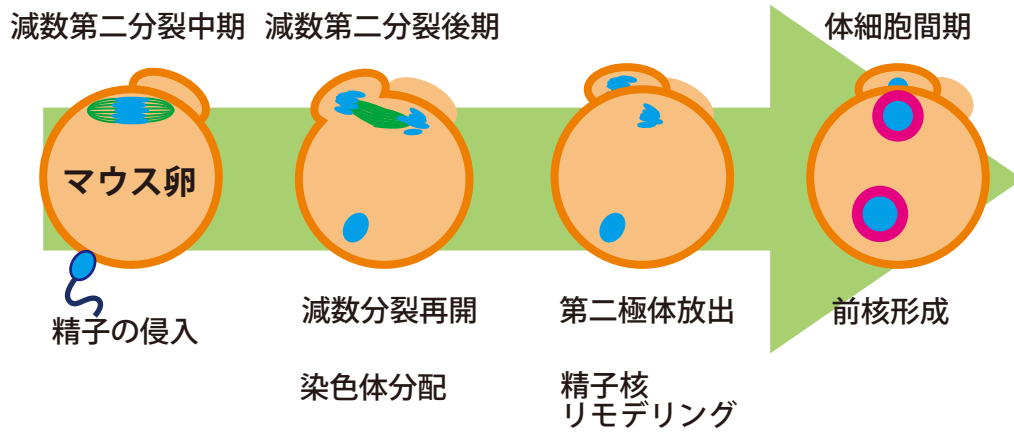
本研究は東京大学医科学研究所 旧癌細胞シグナル分野、東京大学総合文化研究科広域科学専攻大杉研究室にて行われました。修士課程から 5 年間丁寧にご指導頂きました大杉美穂准教授に感謝いたします。研究の着想となる実験を行った山田かおりさんをはじめ、日々の議論、助言、実験手技の教授などでお世話になりました大杉研究室、旧癌細胞シグナル分野の皆様感謝いたします。

医科学研究所癌細胞シグナル分野にてご指導頂きました山本雅教授に感謝いたします。

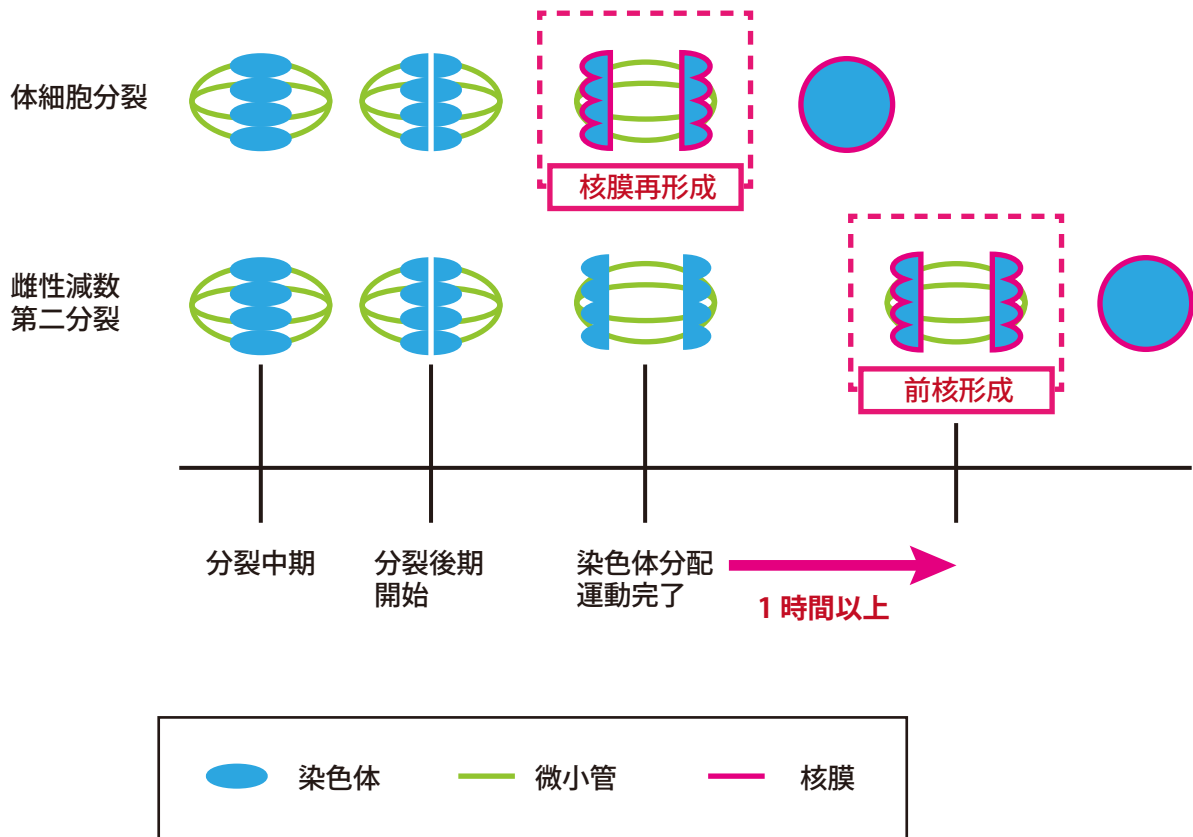
mRNA 合成用 plasmid をいただきました山縣一夫准教授に感謝いたします。

H2B の cDNA をいただきました木村宏教授に感謝します。

(A)



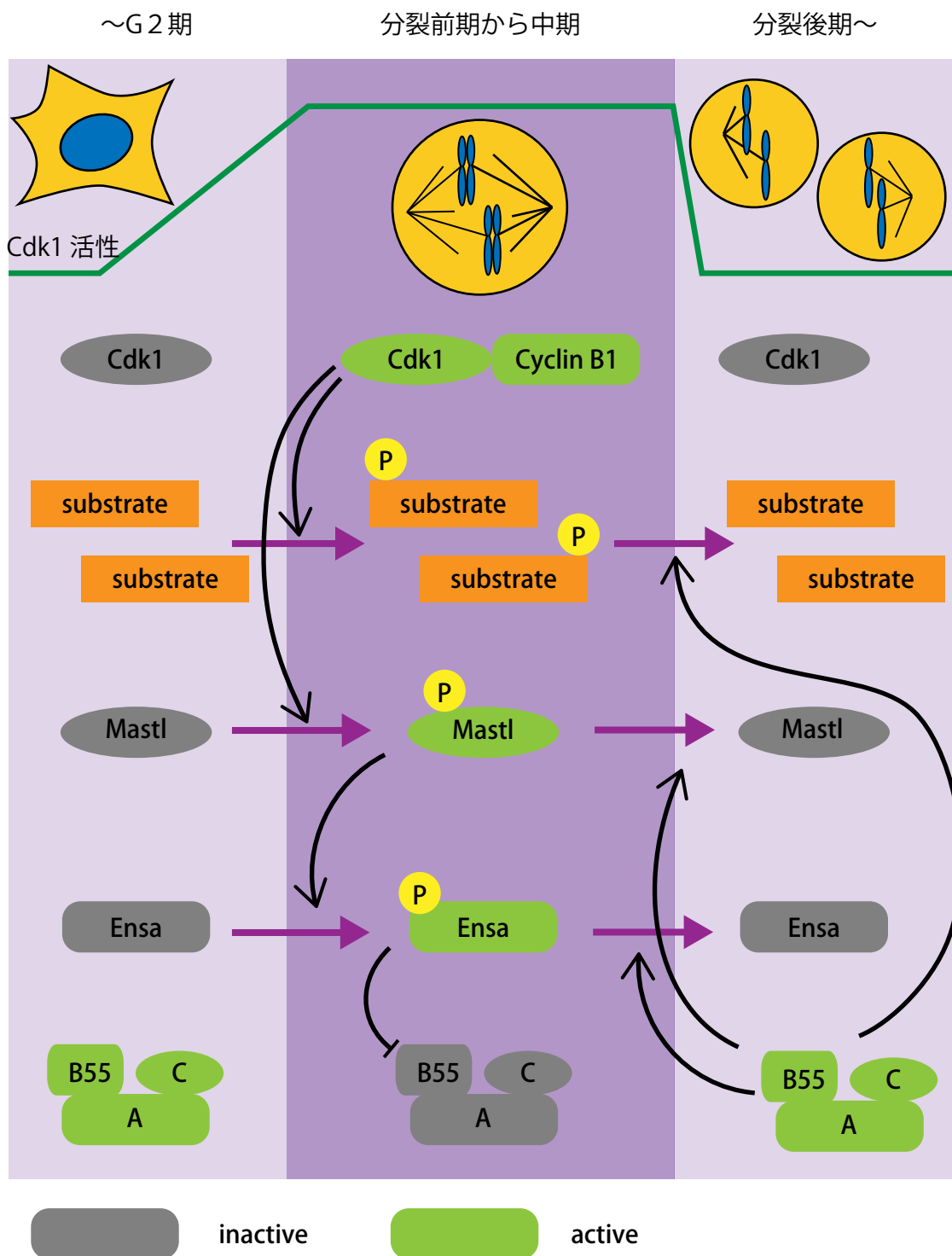
(B)



序論図 1. 受精卵の前核形成までの過程と、体細胞分裂とを比較した特徴

(A) マウス卵における受精過程での前核形成までのイベントの模式図。減数分裂中期 (MII期) に停止したマウス卵に精子が侵入すると、雌性染色体は減数分裂を再開し、分裂後期へと入る。染色体分配の後、片方の娘染色体は第二極体として卵細胞から放出される。残りの娘染色体は一倍体のゲノムを持った前核 (雌性前核) を形成する。一方で精子核は卵内に侵入後、卵細胞内のヒストンを取り込むなどクロマチンの再編を行い、雌性染色体とほぼ同じタイミングで前核 (雄性前核) を形成する。

(B) 体細胞分裂と雌性減数第二分裂の核膜再形成タイミングの比較。体細胞分裂では染色体分配運動の終了とほぼ同時に核膜が後期染色体周辺に形成を開始する。培養細胞では分裂後期開始から核膜再形成はせいぜい数十分である。一方で雌性減数第二分裂では染色体分配運動終了後も 1 時間から 2 時間もの間、染色体周辺に核膜が形成されることなく、また染色体の脱凝集も起こらずにいる。MII卵とほぼ同じサイズである受精卵の第一卵割では紡錘体が大きく染色体分配運動に時間がかかるため培養細胞よりは長い、それでも染色体分配運動終了 - 核膜再形成は同時であり分裂後期開始からの時間は 30 分以内である。

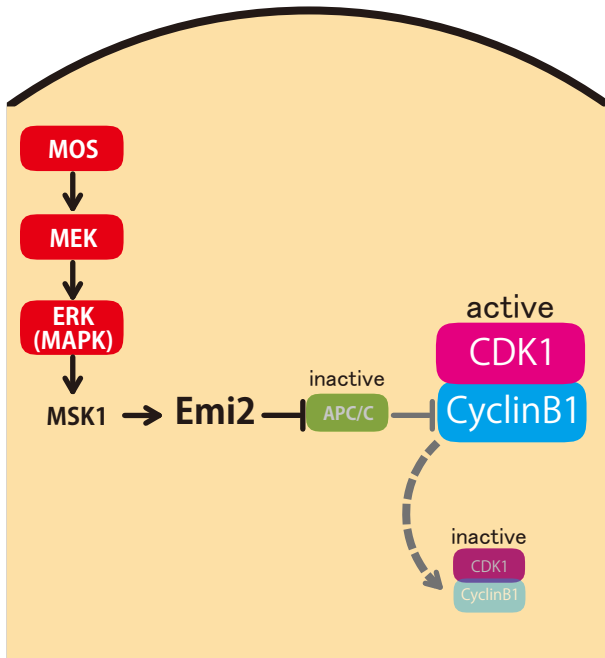


序論図 2. Cdk1 基質のリン酸化—脱リン酸化による分裂期開始—終了制御

分裂期の開始には Cdk1-Cyclin B1 による基質のリン酸化が染色体の凝縮、核膜の崩壊などに重要な働きを持つ。分裂期に基質のリン酸化状態を確立するために、これを阻害する脱リン酸化酵素の PP2A B55 の活性を抑制する機構：Cdk1-Mastl-Ensa 経路が存在する。Cdk1 は Mastl/Greatwall をリン酸化することにより Mastl のリン酸化活性を高める。次に活性化された Mastl は Ensa/Arpp19 をリン酸化する。リン酸化 Ensa は PP2A の活性制御サブユニットである PP2A B55 と結合し PP2A B55 の活性が抑制される。この機構により分裂期開始が保証されている。分裂期終了の際には、まず Cyclin B1 の分解に伴い Cdk1 の活性が下がる。ついで Mastl、Ensa のリン酸化が下がり、PP2A B55 が活性化されると Cdk1 基質を脱リン酸化し、分裂期の終了が促進される。Mastl、Ensa の脱リン酸化についてはどのような制御が働くか完全な理解はされていないが、制御の一つとして PP2A によるフィードバックにより脱リン酸化がなされることが知られている。

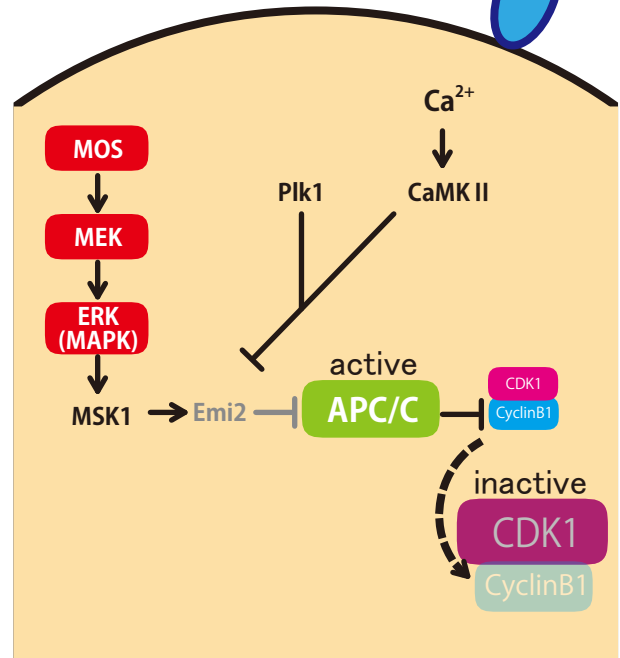
(A)

unfertilized M II oocyte



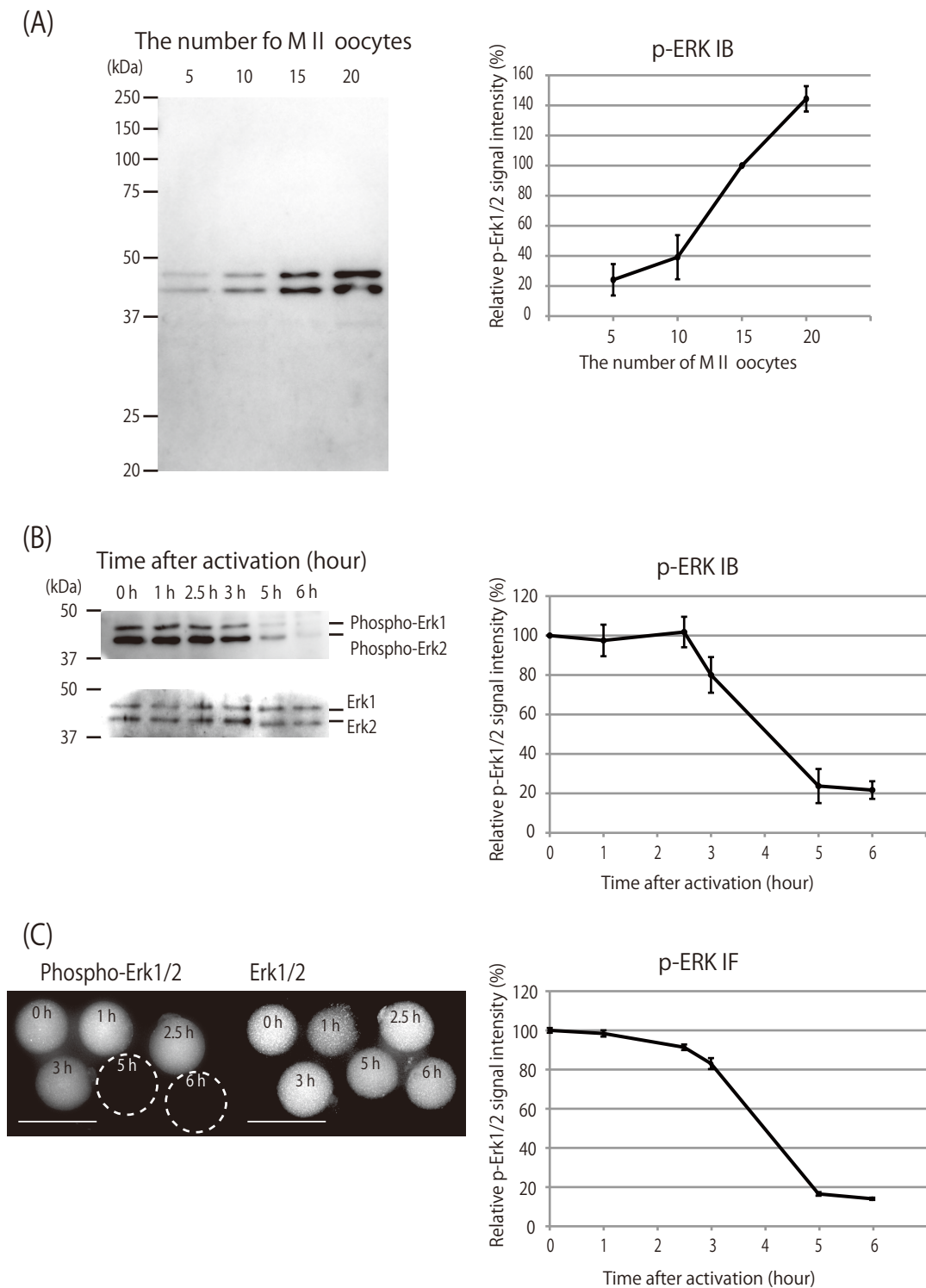
(B)

after fertilization



序論図 3. マウス卵における MOS-ERK 経路による M II 期停止機構とその解除

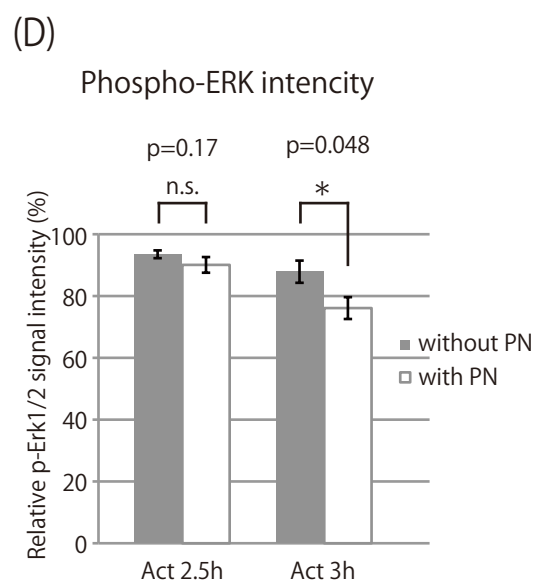
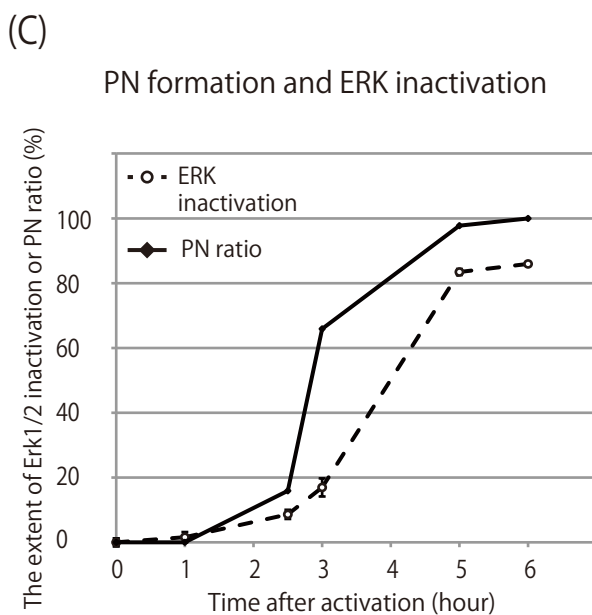
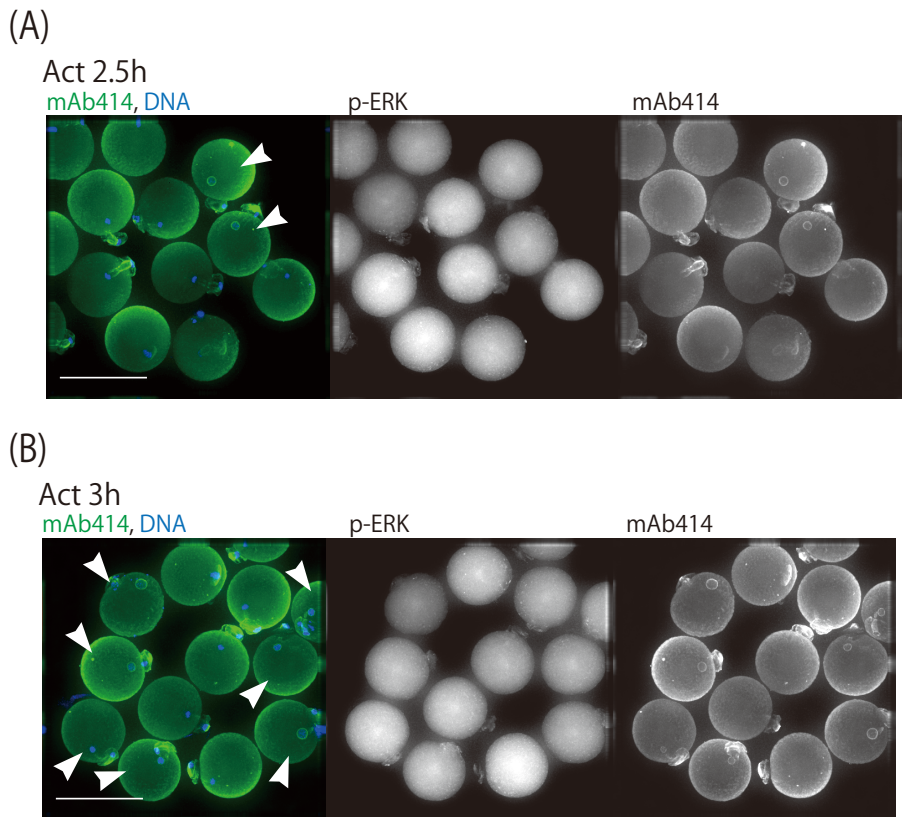
(A) マウス卵での M II 期停止分子機構の模式図。受精のためのマウス卵細胞周期停止はカエルやヒトデを含む多くの種と同様に MOS-MEK-ERK から成る kinase cascade が重要な働きを行う。脊椎動物では ERK 活性は最終的には Emi2 という分裂後期促進複合体 APC/C の抑制因子の安定化をもたらすという機構により M II 期停止を実行することは共通しているが、ERK 活性と Emi2 安定化を結ぶ因子には違いが見られ、カエルでは p90RSK がこれを担うが、マウスでは RSK ではなく MSK1 が担うと見られている。一方でヒトデなどでは ERK-RSK を介して受精のための細胞周期停止 (G1 期停止) が行われ、ERK 下流因子に関しては種の多様性が見られる。(B) マウス卵での M II 期停止解除機構の模式図。M II 期停止解除の際には精子侵入により卵細胞内にカルシウムパルスが走り、CaMK II が活性化され Plk1 と協同して働き Emi2 が分解へと導かれる。これにより APC/C が活性化し、分裂後期へと進行する。この際、脊椎動物において ERK 経路の不活性化は分裂後期進行に必要なく、受精後もしばらく活性が維持されることが知られている。



Soeda et al., 2013, *Genes to Cells* 18, 850-858 より引用
The definitive version is available at www3.interscience.wiley.com

図 1. リン酸化 ERK 免疫染色による ERK 活性の測定

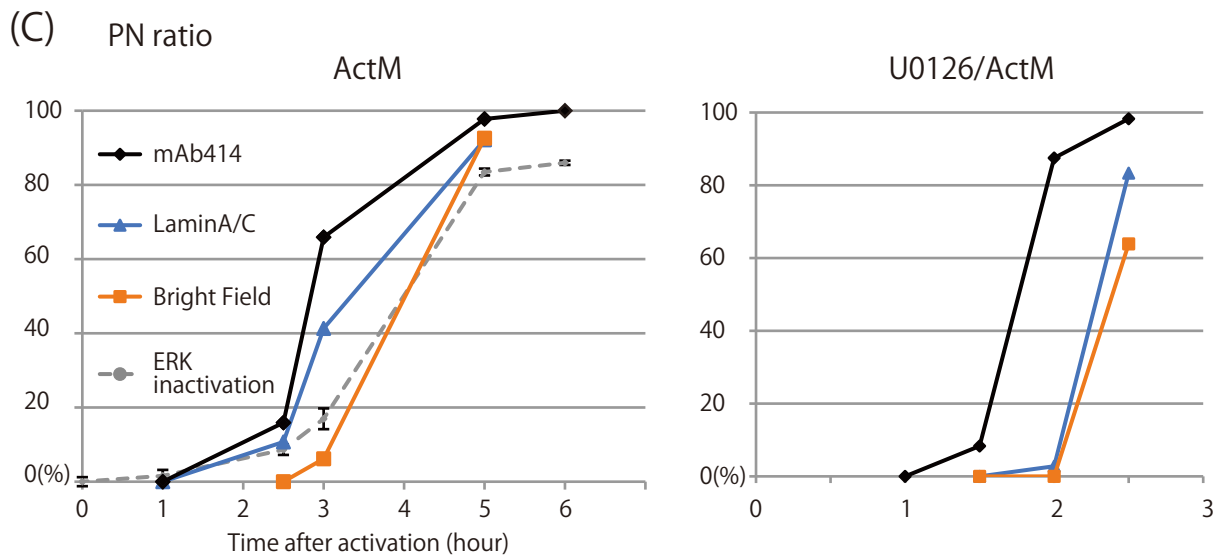
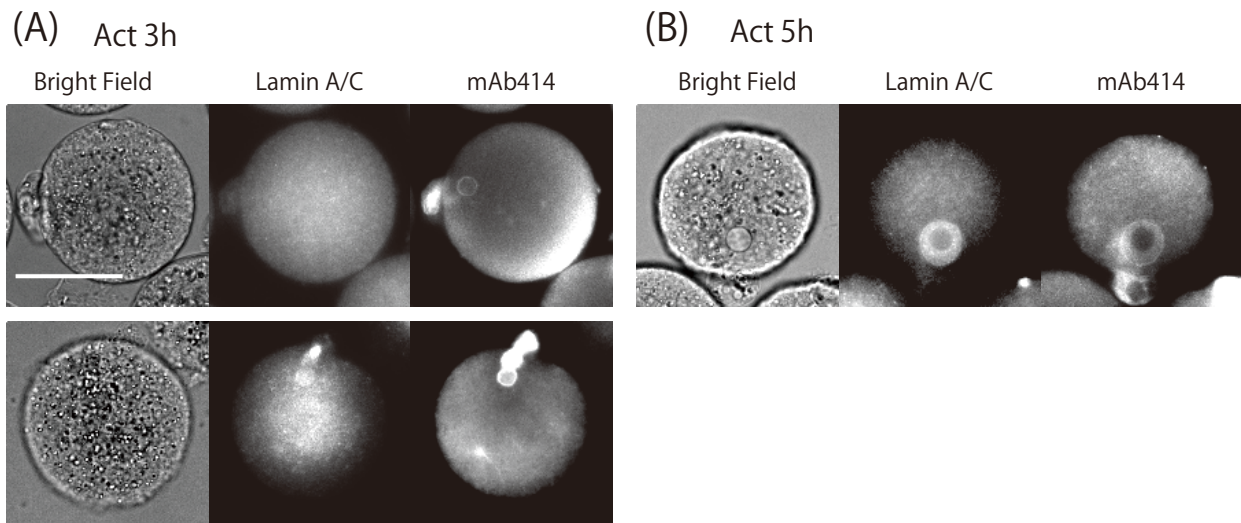
(A) 抗リン酸化 ERK1/2 抗体の特異性と Western Blot 定量性の確認。独立した 3 回の実験を行い、M II 卵 15 個のレーンのバンドシグナルに対する各レーンのバンドシグナル相対強度を測った平均値をグラフに示した。エラーバーは標準誤差を示す。(B) 卵の活性化からの各時間でのリン酸化 ERK の Western Blot による測定。独立した 3 回の実験を行い、0 時間のレーンのバンドシグナルに対する各レーンのバンドシグナル相対強度を測った平均値をグラフに示した。エラーバーは標準誤差を示す。(C) 卵の活性化からの各時間でのリン酸化 ERK の免疫染色による測定。スケールバーは 100 μm 。独立した 3 回以上の実験を行い合計 30 個以上の卵を測定した。各実験回で 0 時間の卵の蛍光の平均値に対する各卵の蛍光シグナル相対強度を測り全体の平均値をグラフに示した。エラーバーは標準誤差を示す。



Soeda et al., 2013, Genes to Cells 18, 850-858 より引用
The definitive version is available at www3.interscience.wiley.com

図2. 前核形成開始は ERK 不活性化より先に起こる

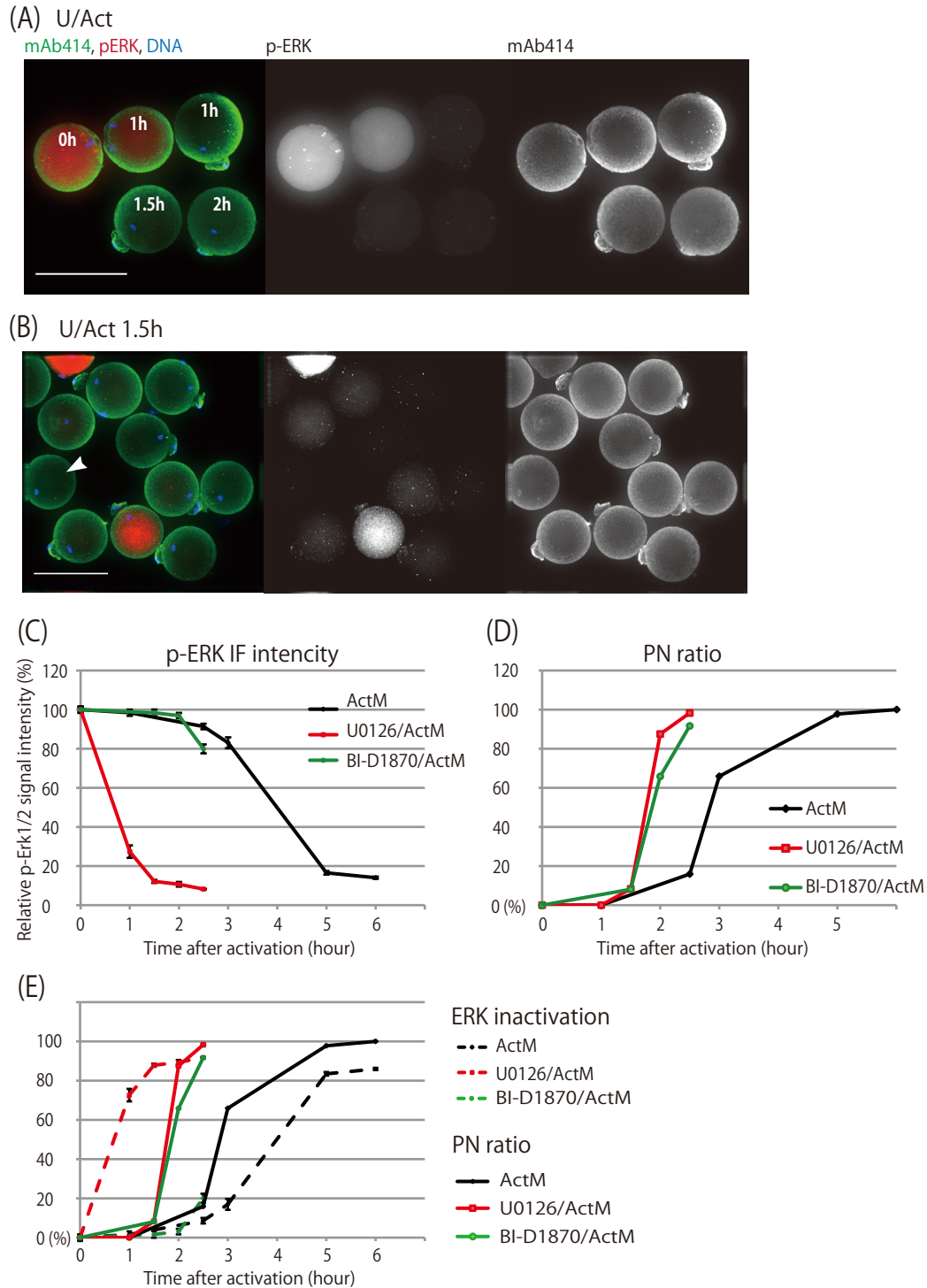
(A, B) 卵の活性化から 2.5 時間 (A)、3 時間 (B) で固定し抗リン酸化 ERK1/2 抗体、mAb414 抗体、Hoechst33342 で蛍光免疫染色した像。スケールバーは 100 μ m。白の矢頭は前核形成している卵を指している。(C) 前核形成をしている卵の割合 (◆) と ERK 不活性化 (○) の関係。ERK 不活性化のグラフの各時間の値は (100- 各時間のリン酸化 ERK 相対値 (図 1C))。独立した 3 回以上の実験を行い合計 30 以上の卵を数えた全体から前核形成率を算出した。(D) 前核形成している卵としていない卵の ERK 活性の比較。独立した 3 回以上の実験を行い、各回での MII 卵のリン酸化 ERK 蛍光平均値からそれぞれの卵のリン酸化 ERK 蛍光相対値を算出し、卵の活性化からの時間 (2.5 時間または 3 時間) と前核が観察できたか否かで分け、その平均値をグラフに示した。エラーバーは標準誤差を示す。p は t 検定の P 値を示す。n.s. は not significant の略。* は $P < 0.05$ であることを示す。



Soeda et al., 2013, Genes to Cells 18, 850-858 より引用
 The definitive version is available at www3.interscience.wiley.com

図 3. 蛍光免疫染色により早期の前核形成観察が可能

(A、B) 前核形成卵の明視野像と蛍光免疫染色像の比較。卵の活性化から 3 時間 (A) または 5 時間 (B) で固定し、抗 Lamin A/C 抗体、mAb414 抗体で染色した。代表的な一つの焦点 (明視野、Lamin A/C、mAb414 は全て同一焦点の画像) を示している。スケールバーは 50 μm 。(C) 各染色法または観察法で前核が観察できた卵の割合と ERK 不活性化の比較。mAb414 による前核形成率 (◆) と、ERK 不活性化 (グレーの○) は図 2C と同一のもの。Lamin A/C 染色できる前核 (青い△)、明視野観察で判別できる前核 (オレンジの□) をもった卵の割合を同一グラフ内に示した。左; 阻害剤なしでの卵の活性化からのそれぞれの値。右; U0126 (MEK 阻害剤) 存在化での卵の活性化からのそれぞれの値。



Soeda et al., 2013. *Genes to Cells* 18, 850-858 より引用
The definitive version is available at www3.interscience.wiley.com

図 4. MEK 阻害剤 U0126 による ERK の不活性化、または RSK 阻害剤 BI-D1870 による前核形成への影響
U0126 または BI-D1870 含有活性化培地 (U0126/ActM または BI-D1870/ActM) に MII 卵を移してから各時間で固定し、抗リン酸化 ERK 抗体、mAb414、Hoechst33342 を用いて蛍光免疫染色した。(A、B) 各時間での代表的な卵を並べた染色像 (A) と U-Act から 1.5 時間で固定した卵の代表的免疫染色像 (B)。スケールバーは 100 μ m。白い矢頭は前核が観察できる卵を指している。(C) U-Act または B-Act でのリン酸化 ERK 蛍光を定量したグラフ。独立した 3 回以上の実験を行い合計 30 個以上の卵を計測した平均をグラフ化し、図 1 C の通常の活性化でのリン酸化 ERK 蛍光を定量したもの (黒線) と比較している。エラーバーは標準誤差を示す。(D) U-Act または B-Act からの各時間での前核形成率 (赤線、緑線)、通常の卵の活性化からの各時間での前核形成率 (黒線：図 2 C と同じもの)。独立した 3 回以上の実験を行い合計 30 個以上の卵の観察から算出した。(E) 前核形成率 (図 4D) と ERK 不活性化 (黒、赤および緑破線：図 4 C をそれぞれ上下反転したもの) の比較。

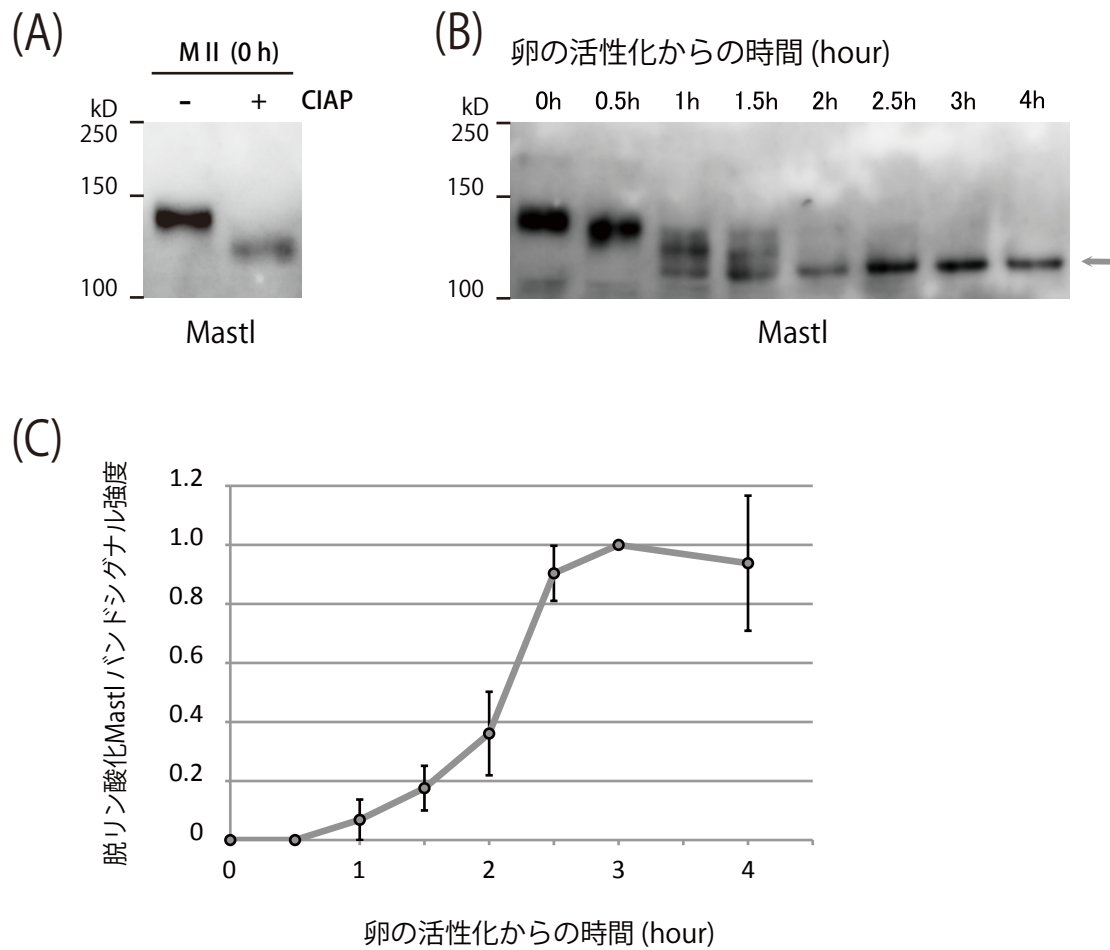
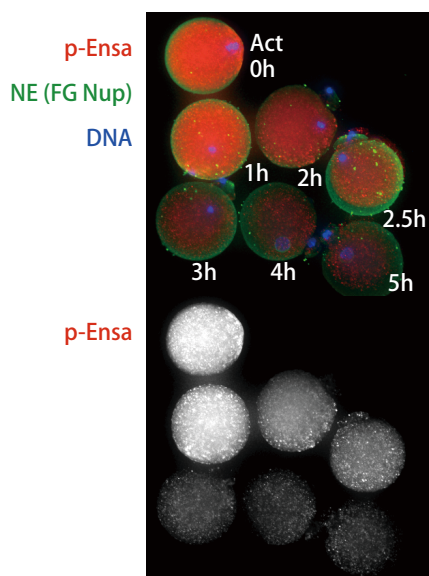


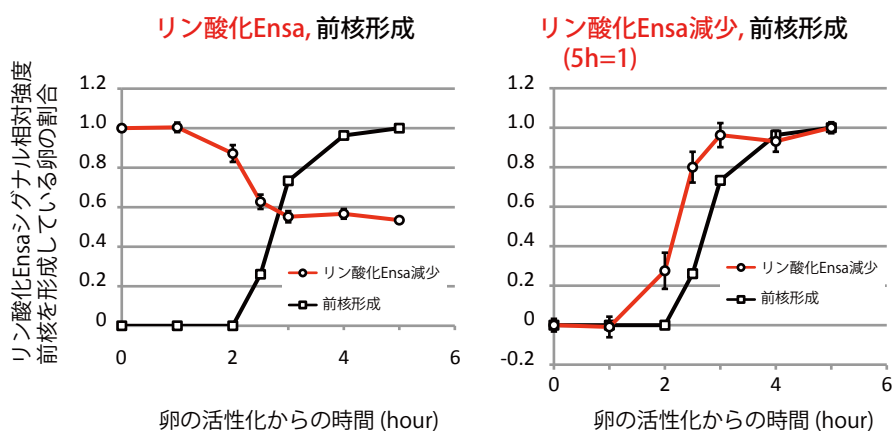
図 5. Mastl 脱リン酸化タイミング

(A) MII 卵 30 個を溶解し、15U CIAP を反応させた後 SDS サンプル化したものを抗 Mastl 抗体で Western Blot した。(B、C) MII 卵を卵の活性化から各時間 30 個ずつ SDS サンプル化し抗 Mastl 抗体で Western Blot した。代表的な例 (B) と (B) で矢印で示したバンドを定量し、3 時間のシグナルを基準に相対化したグラフ (C) を示した。独立した実験 3 回の平均を示した。エラーバーは標準誤差を示す。

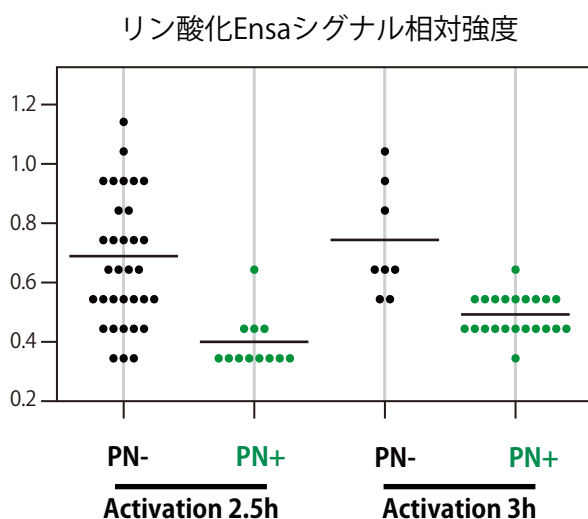
(A)



(B)



(C)



(D)

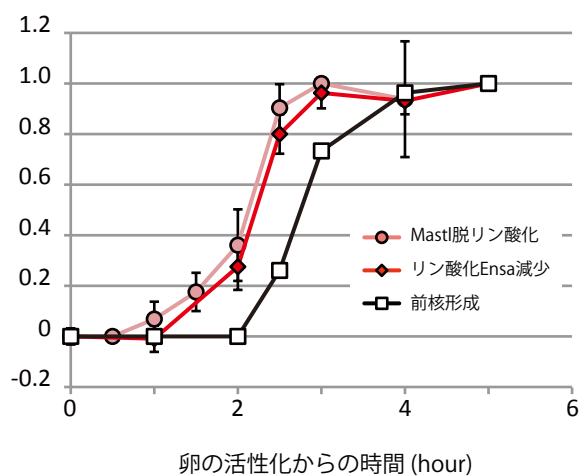


図 6. Ensa 脱リン酸化と前核形成の比較

卵の活性化から各時間で卵を固定し、抗リン酸化 Ensa 抗体、mAb414 抗体、Hoechst33342 を用いて蛍光免疫染色を行った。独立した3回以上の実験を行いそれぞれの時間で合計30個以上の卵を観察した。リン酸化 Ensa シグナルを測定し、各実験回ごとにMII卵の平均値を基準として個々の卵の相対値を求めた。(A)各時間での代表的な卵を並べて示した。(B)左のグラフでは前核形成率(黒線)とリン酸化 Ensa 相対値(赤線)を示した。右のグラフの赤線は左のグラフのリン酸化 Ensa のグラフを上下反転し5時間の値を1として拡大したもの。エラーバーは標準誤差を示す。(C)卵の活性化から2.5時間または3時間の卵をそれぞれ前核が観察されたもの(緑点)とされなかったもの(黒点)に分け、そのリン酸化 Ensa 相対値を比較した。一つの点是一个の卵の値を示す。(D)脱リン酸化 Mastl(桃色線:図5Cと同一)、リン酸化 Ensa 減少と前核形成率(図6B右)を比較したグラフ。

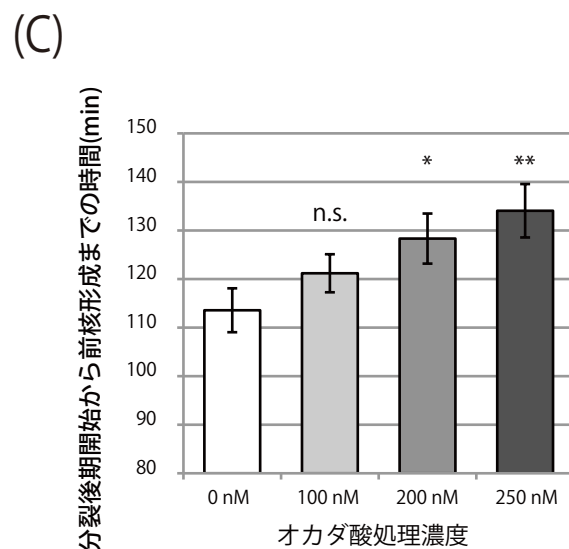
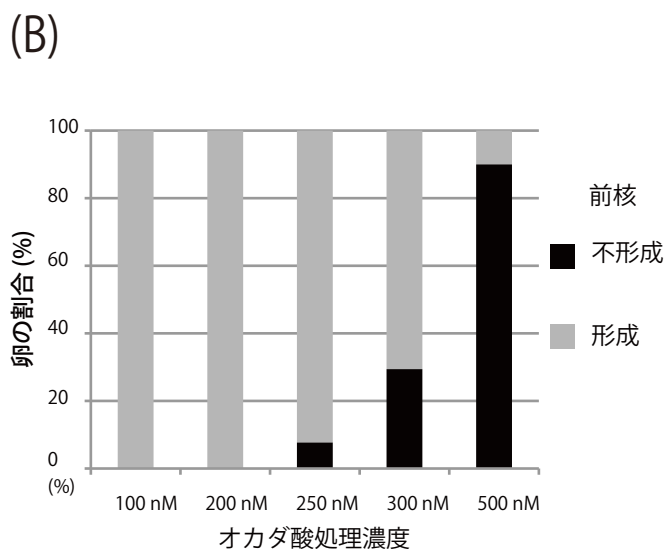
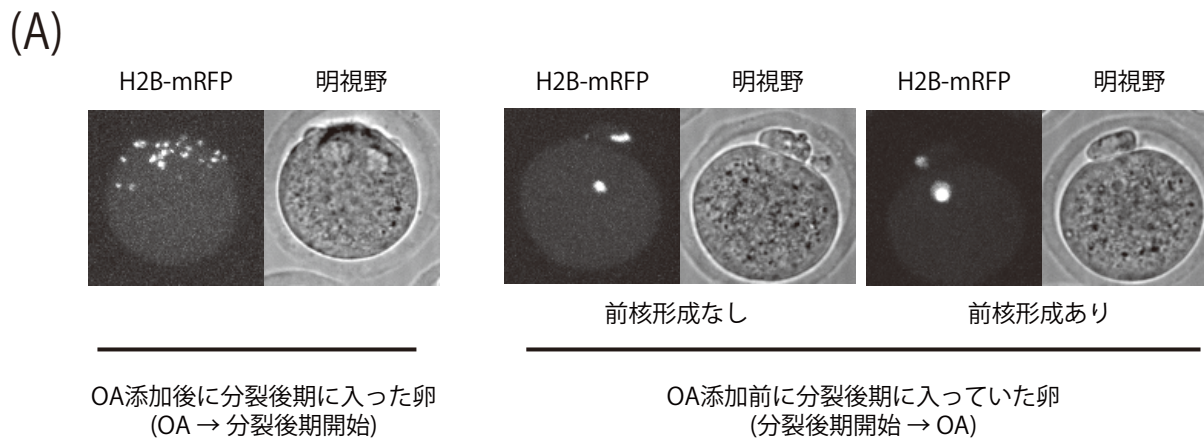


図 7. オカダ酸処理の前核形成への影響

EGFP-BAF と H2B-mRFP を mRNA マイクロインジェクションにより発現させた卵を活性化と同時にライブイメージングを開始し、観察中に卵の活性化から 2 時間で各最終濃度となるようにオカダ酸 (OA) を添加し、その後 5 時間観察を続けた。各時間独立した 2 回以上の実験を行い合計 15 以上の卵を観察した。(A) オカダ酸添加後 (300 nM) に分裂後期に入った卵とオカダ酸添加前に分裂後期に入っていた卵の代表的な像。(B) 各オカダ酸処理濃度ごとの、ライブイメージング中に前核形成 (H2B シグナルの膨化で判断) が観察されなかった卵 (黒) とされた卵 (グレー) の割合。分裂後期に入らなかった卵と、オカダ酸処理後に分裂後期に入った卵を除き、算出した。(C) 分裂後期開始から前核形成開始 (H2B 膨化前に BAF が極大となるタイムポイント) までの時間の平均値。前核形成に至らなかった卵と、オカダ酸処理後に分裂後期に入った卵を除き、算出した。エラーバーは標準誤差を示す。前核形成タイミングについて、オカダ酸処理なし (0 nM) 条件とそれぞれのオカダ酸処理条件の間で T 検定を行った。n.s. は not significant の略。*、** は $P < 0.05$ 、 0.001 であることを示す。

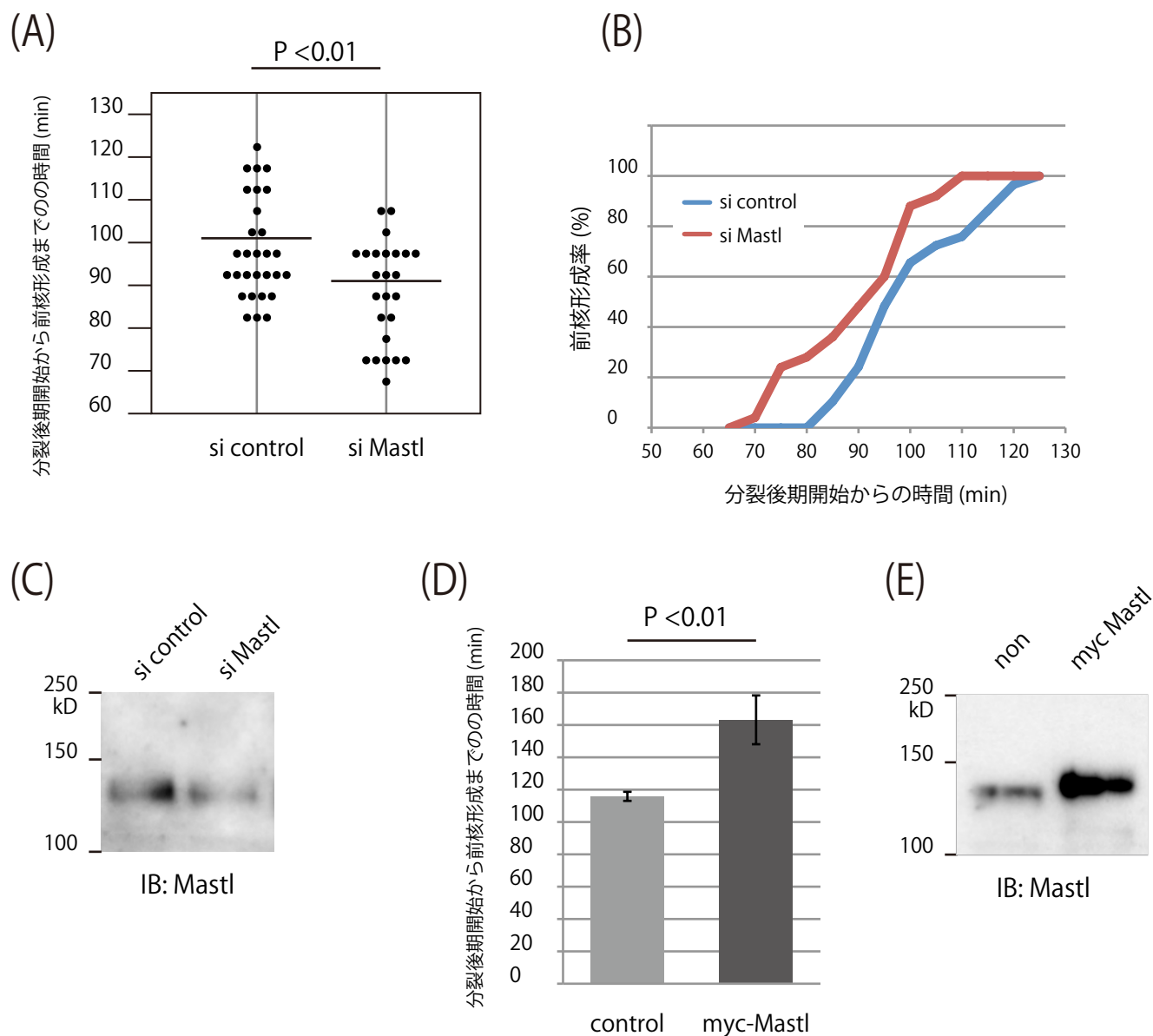


図 8. Mastl 発現量と前核形成タイミング

(A–C) EGFP-BAF と H2B-mRFP の mRNA と同時に Mastl siRNA または control siRNA を MII 卵にマイクロインジェクションし、12 時間培養した後、卵の活性化培地に移しライブイメージングを行った。独立した 2 回の実験から合計 25 個以上の卵を観察した (A) 分裂後期開始から前核形成開始 (H2B 膨化前に BAF が極大となるタイムポイント) までの時間を計測し、これを示した。一つ点の一つの卵の値を示す。P は t 検定の P 値。(B) (A) のデータから作成した分裂後期開始からの時間と前核形成率の関係を示したグラフ。(C) siRNA をインジェクションした卵の Mastl タンパク質を Western Blot で検出した。各レーン 30 個の MII 卵を用いた。(D) myc-Mastl、EGFP-BAF と H2B-mRFP を MII 卵に mRNA マイクロインジェクションにより発現させ、卵の活性化の後ライブイメージングを行った。独立した 3 回の実験を行い合計 10 個以上の卵を観察した。エラーバーは標準誤差を示す。(E) myc-Mastl を発現させた卵の Mastl タンパク質を Western Blot で検出した。ピークを強調している。

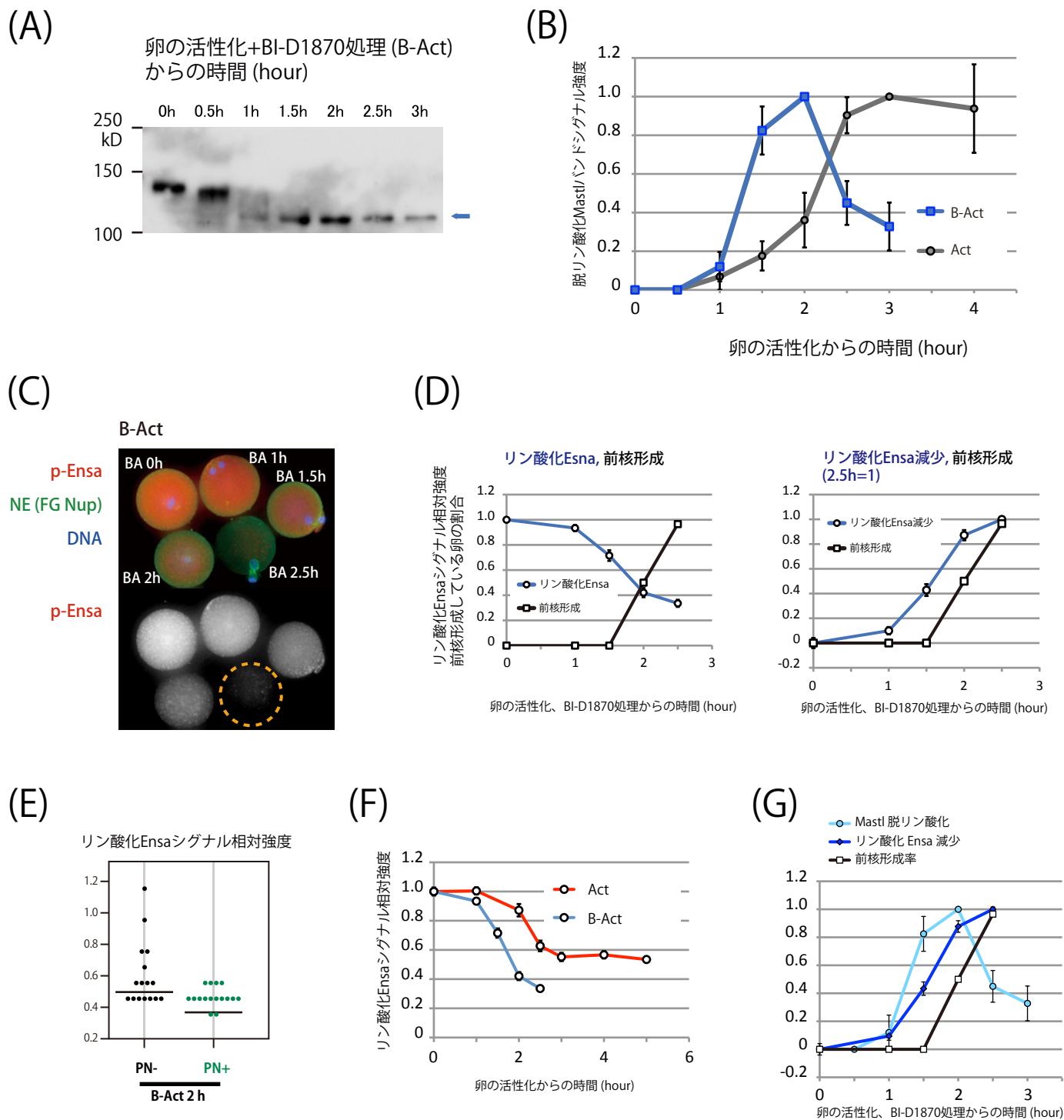
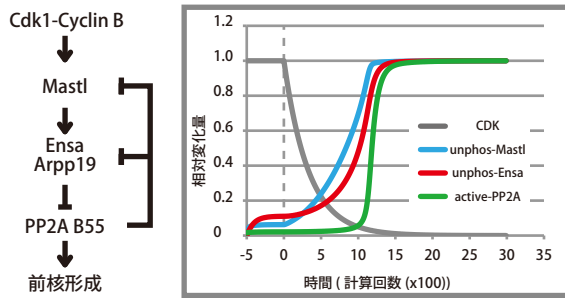


図 9. RSK 阻害により Mastl、Ensa 脱リン酸化タイミングが早まる

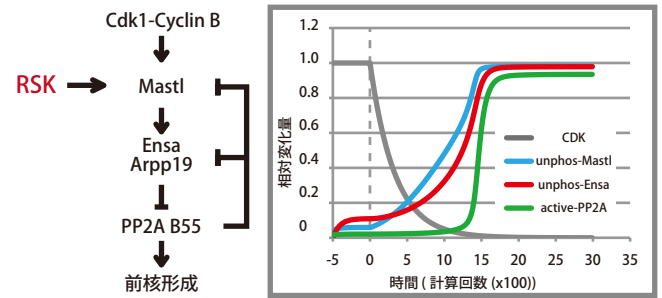
(A, B) MII 卵を B-Act から各時間 30 個ずつ SDS サンプル化し抗 Mastl 抗体で Western Blot した。(A) 代表的な例。(B) (A) で矢印で示したバンドを定量し、2 時間のシグナルを基準に相対化したグラフ (青線) を示した。黒線は図 6 C と同一。独立した実験 3 回の平均を示した。エラーバーは標準誤差を示す。(C-E) B-Act から各時間で卵を固定し、抗リン酸化 Ensa 抗体、mAb414 抗体、Hoechst33342 を用いて蛍光免疫染色を行った。独立した 3 回以上の実験を行いそれぞれの時間で合計 30 個以上の卵を観察した。リン酸化 Ensa 蛍光を測定し、各実験回ごとに MII 卵の平均値を基準として個々の卵の相対値を求めた。(C) 各時間での代表的な卵を並べて示した。(D) 左のグラフでは前核形成率 (灰色線) とリン酸化 Ensa 相対値 (青線) を示した。右のグラフの青線は左のグラフのリン酸化 Ensa のグラフを上下反転し 2.5 時間の値を 1 として拡大したもの。エラーバーは標準誤差を示す。(E) 卵の活性化から 2 時間の卵をそれぞれ前核が観察されたもの (緑点) とされなかったもの (黒点) に分け、そのリン酸化 Ensa 相対値を比較した。一つの点は一つの卵の値を示す。(F) リン酸化 Ensa 相対値の、通常の卵の活性化 (赤線; 図 6B 左と同一) と B-Act (青線; 図 9D 左) の比較。(G) 脱リン酸化 Mastl (水色線: 図 10B 青線と同一)、リン酸化 Ensa 減少と前核形成率 (90D 右) を比較したグラフ。

(A)



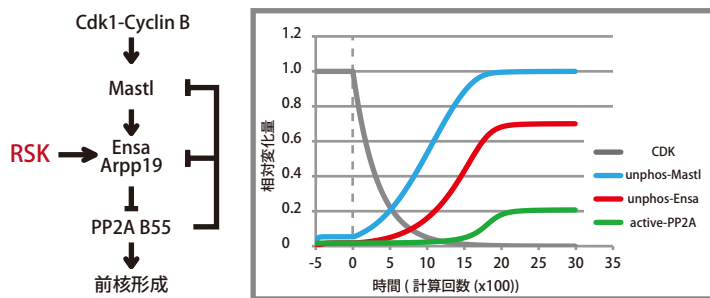
(B)

モデル1



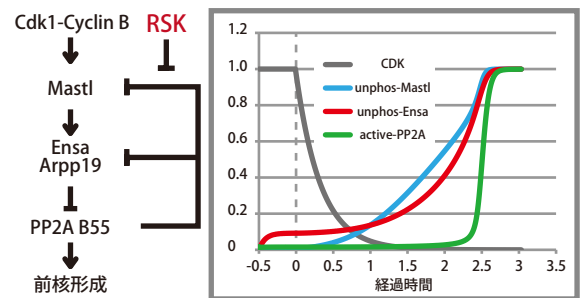
(C)

モデル2

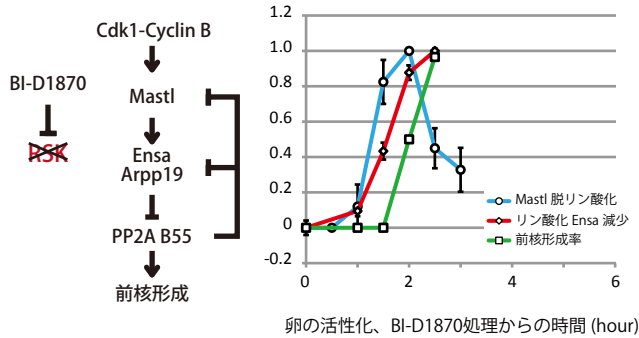


(D)

モデル3



(E)



(F)

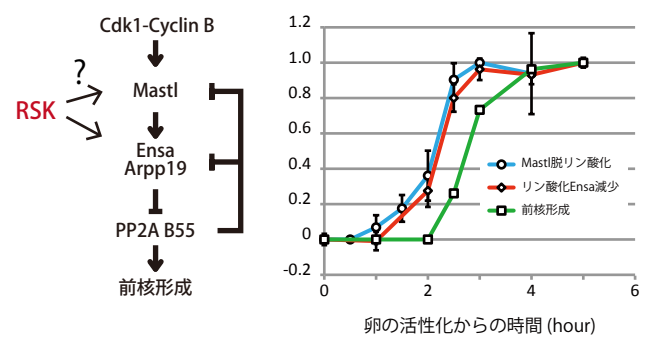
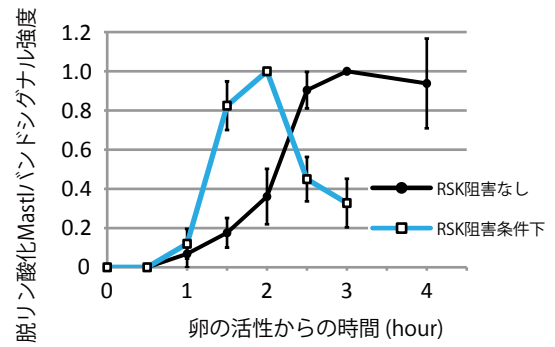
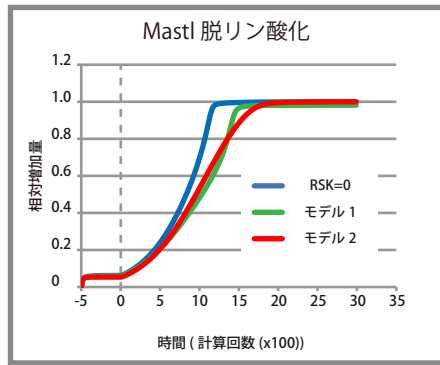


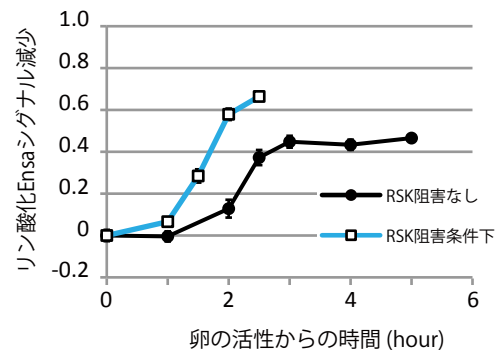
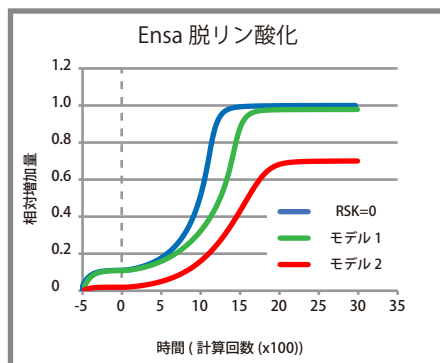
図 10. 前核形成時間制御の数理モデリング

(A–D) RSK と Mastl 経路の交流様式の各モデルでの模式図と、その数理モデリングによる計算シミュレーション結果。計算シミュレーションは分裂期終了を想定し、Cdk1 高活性、Mastl 高活性、Ensa 高リン酸化、PP2A 低活性状態から開始し、Cdk1 不活性化に伴う各因子の挙動をシミュレーションした。(E) B-Act からの各現象の実験結果 (図 9G と同一)。(F) 卵の活性化からの各現象の実験結果 (図 6D と同一)。

(A)



(B)



(C)

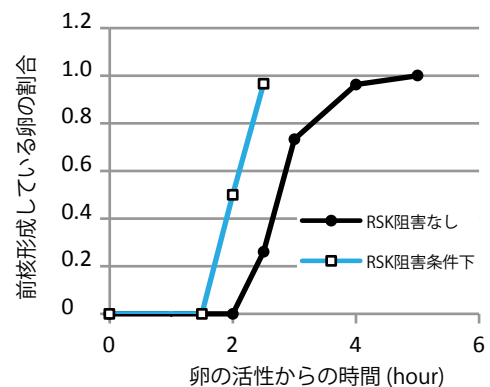
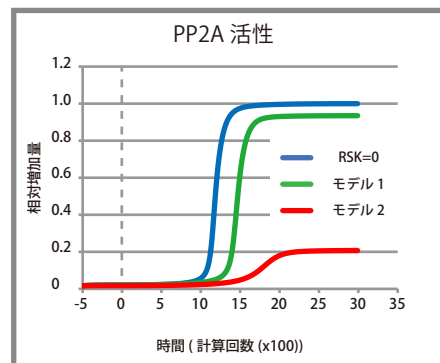
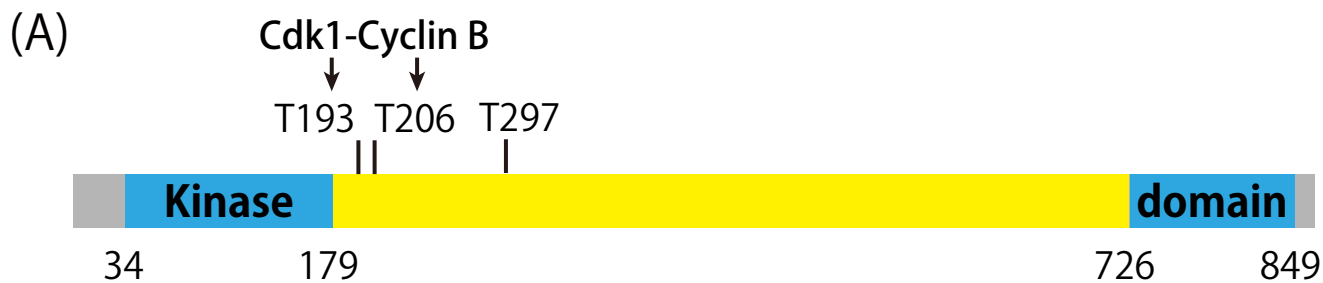


図 11. 各因子ごとの数理モデリングと実験結果の比較

(A) Mastl 脱リン酸化の各モデルでの計算シミュレーション結果 (左) と、脱リン酸化 Mastl の Western Blot により測定した実験結果 (右: 図 9B と同一)。 (B) Ensa 脱リン酸化の各モデルでの計算シミュレーション結果 (左) と、蛍光免疫染色によるリン酸化 Ensa 蛍光減少を測定した実験結果 (左: 図 9F を上下反転したもの)。 (C) PP2A 活性化の各モデルでの計算シミュレーション結果と、mAb414 抗体染色により前核形成タイミングを測定した実験結果 (右: 図 6B、9D の前核形成率と同一)。



		mouse T297 ↓	
mouse	TSYSSKLLKSCFETLSSNPEIPVKCLTSNLLQCR	RKRLGT	SSTSSQSHTFVSSVES 313
human	TPYSSKLLKSCLETVASNPGMPVKCLTSNLLQS	RKRLAT	SSASSQSHTFIVSSVES 315
Xenopus	LVKGNKLMISCPEASLSSPSIPVKCLTPNLLKCR	TQFAT	SSTSSQSRICLSSLES 309
starfish	SNSYISLIKSP-S-----PAGSWSMV-----	-----	TEESSISKGLGSVLEE 307
Drosophila	SDSKISGVSPFFS--AEEANESITHCTTNVNP	QDSSSSCSFHT	CNSADLSFHTC 329

(B)

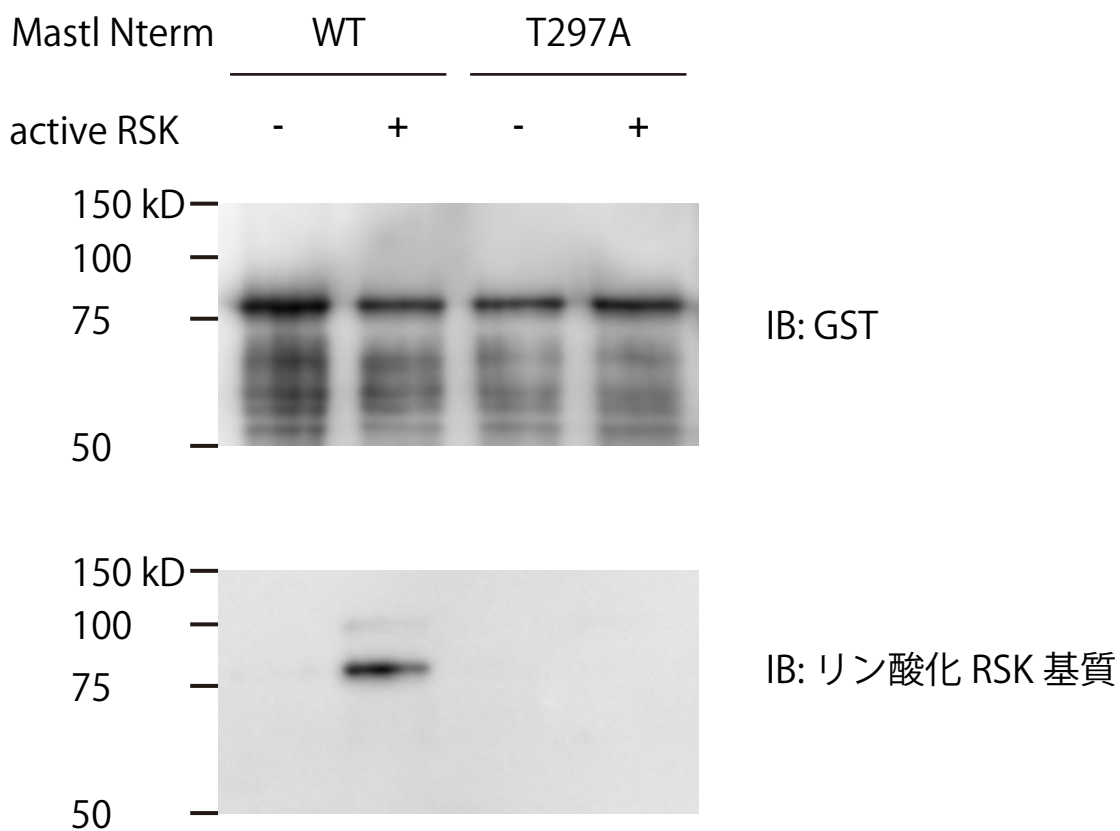


図 12. RSK は In vitro でマウス Mastl Thr297 をリン酸化する

(A) マウス Mastl タンパク質のドメイン模式図と T297 付近の種間アミノ酸配列アラインメント。青;kinase ドメイン。黄色; kinase ドメインリンカー。赤字; RSK コンセンサスモチーフ (B) 大腸菌より精製した GST-Mastl-WT-N 末側断片または GST-Mastl-T297A-N 末側断片を活性型 RSK と ATP 存在下で反応させた。反応終了物を SDS サンプル化し、Western Blot により、GST、リン酸化 RSK 基質を検出した。

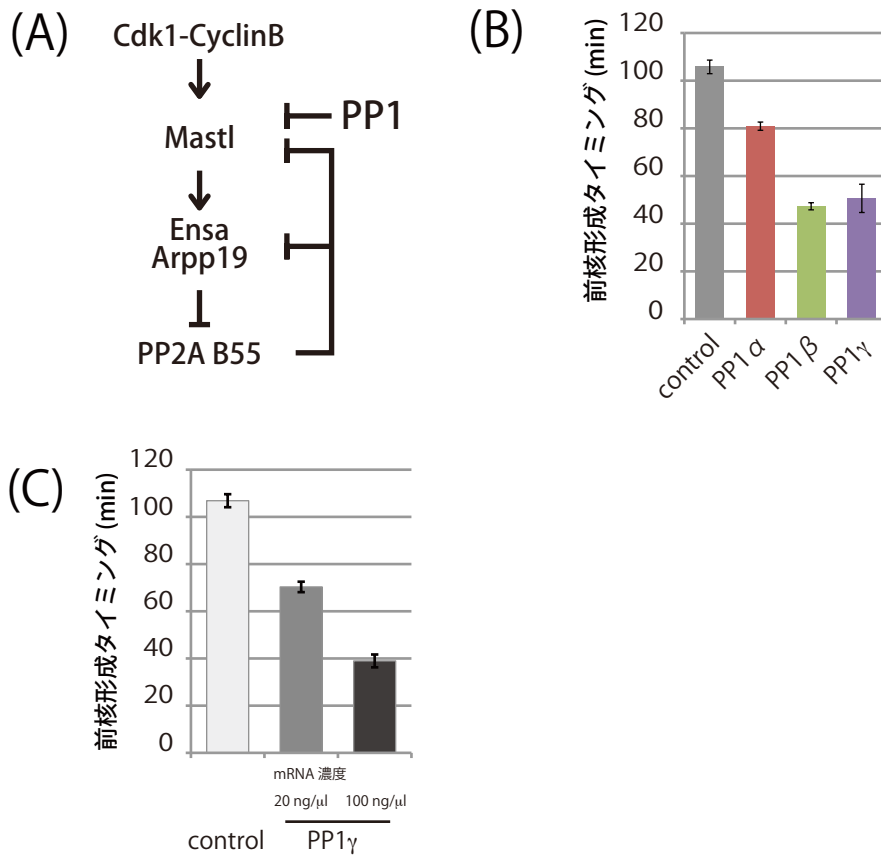
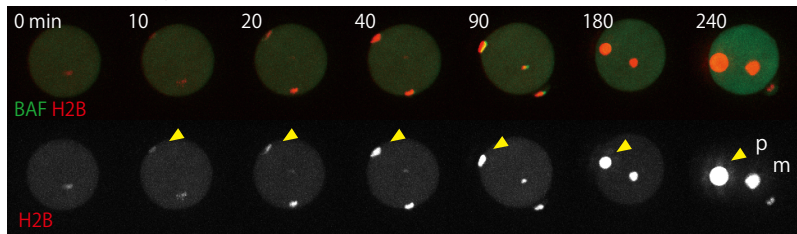


図 13. PP1 過剰発現により前核形成を大幅に早期化できる

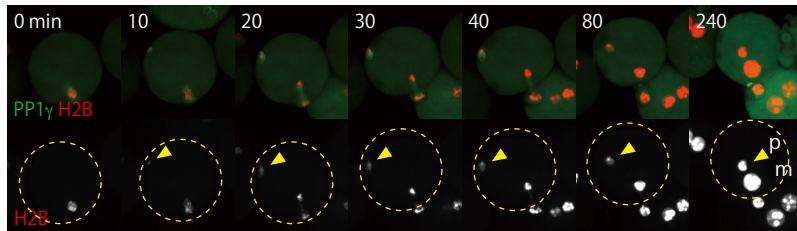
(A) PP1 と Mastl 経路の関係の模式図。(B、C) EGFP-BAF、H2B-mRFP と EGFP-PP1 α 、EGFP-PP1 β または EGFP-PP1 γ を M II 卵に mRNA マイクロインジェクションにより発現させ、卵の活性化後ライブイメージングを行い分裂後期から前核形成 (BAF 蛍光極大で判断) までの時間を計測した。独立した 2 回以上の実験を行い、合計 25 個以上の卵の観察からそれぞれの平均を算出した。エラーバーは標準誤差を示す。(B) PP1 各アイソフォームの過剰発現による前核形成タイミングへの影響。control ; PP1 mRNA なし、他 ; PP1 mRNA 濃度 = 100 ng/ μ l。(C) マイクロインジェクションした PP1 γ mRNA 濃度と前核形成タイミングの関係。

(A) 受精卵での前核形成過程

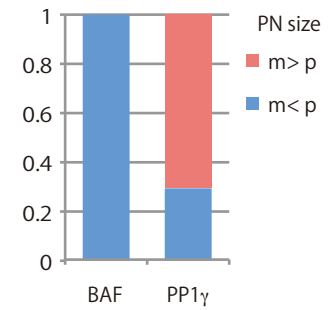
コントロール卵



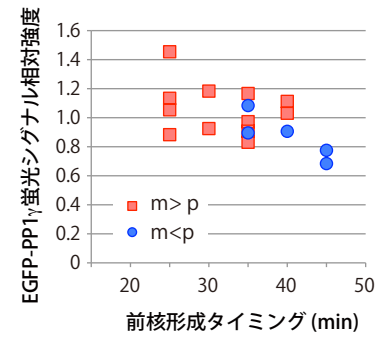
PP1 γ 過剰発現卵



(B)

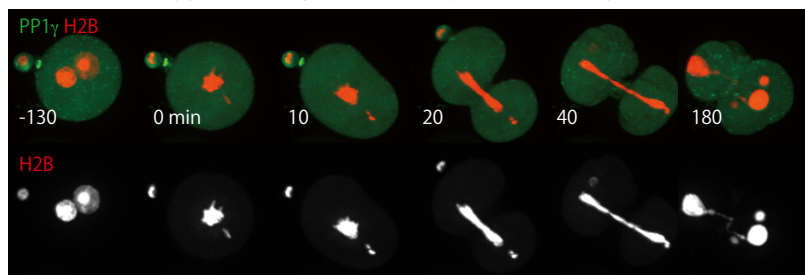


(C)

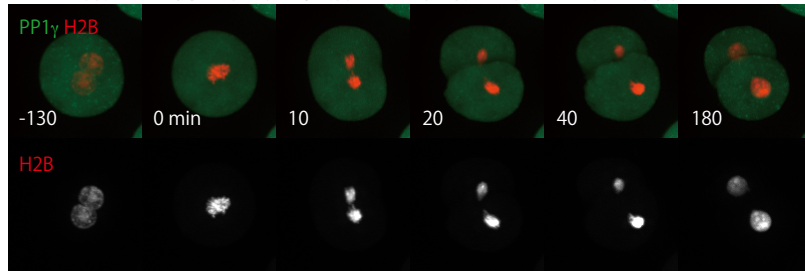


(D)

PP1 γ 過剰発現で前核形成を早期化した受精卵での第一卵割



PP1 γ 過剰発現で前核形成を早期化した単為発生胚での第一卵割



(E)

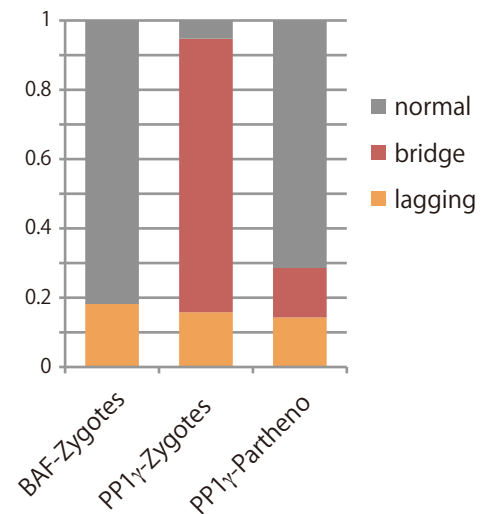
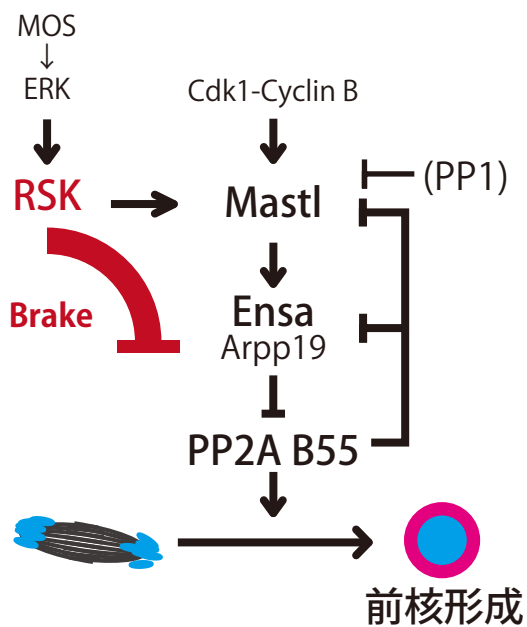


図 14. PP1 γ 過剰発現による前核形成の早期化により雄性前核形成に異常が生じる

MII卵に H2B-mRFP と EGFP-PP1 γ を mRNA インジェクションにより発現させ、体外受精あるいは単為発生を行った。(A–C) 発生開始から前核形成までをライブイメージングした。(A) 代表的な像。分裂後期開始からの時間 (min) を記している。黄色矢頭は雄性染色体を指している。黄色破線円で細胞の輪郭を示している。H2B-mRFP シグナルのピークを強調して示している。(B) 雌性前核サイズが雄性前核より大きいものの割合 (桃色) とその逆 (青) の割合。(C) 前核形成タイミング、EGFP-PP1 γ 発現量と矮小雄性前核の発生の関係。縦軸は細胞全体の EGFP-PP1 γ 蛍光シグナルの平均値に対する相対強度、横軸は分裂後期開始から前核形成開始 (H2B シグナルの膨化で判断) までの時間を示す。それぞれの点は一つの細胞のデータを示す。(D、E) 第一卵割の様子をライブイメージングした。(D) 代表的な像。H2B-mRFP シグナルのピークを強調して示している。(E) 第一卵割での染色体分配異常 (lagging chromosome と chromosome bridge) の割合。

(A)



(B)

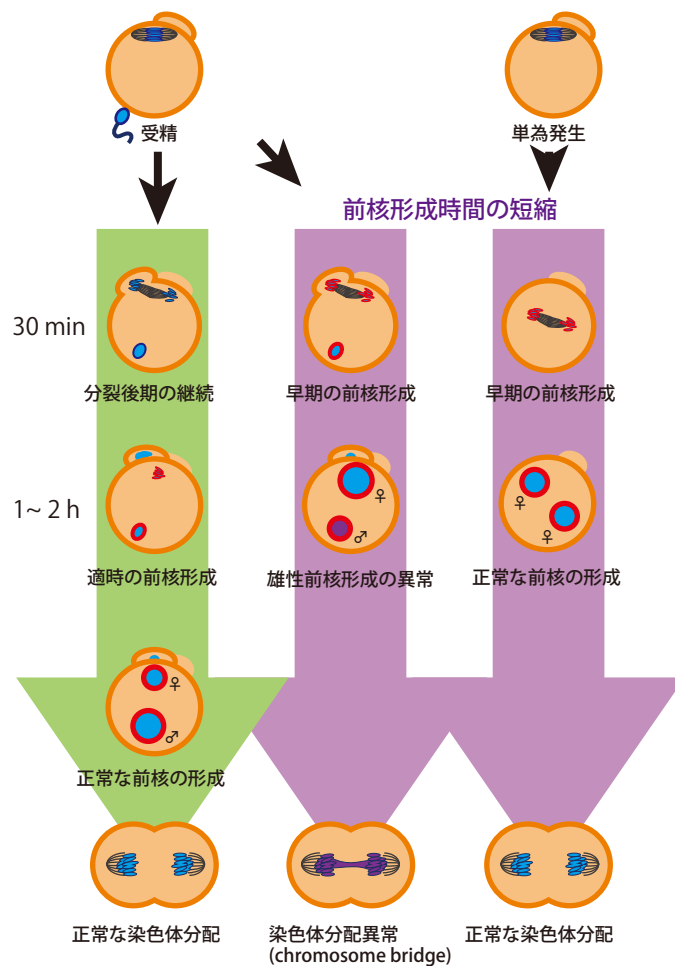


図 15. 前核形成タイミング制御機構とその重要性

(A) 実験結果から提唱される前核形成タイミング制御分子機構。Mastl-Ensa による PP2A B55 の活性抑制を Cdk1 不活性化後も RSK が支えることで、前核形成が遅延する。前核形成開始時には RSK は活性化状態のままであるが、Mastl 経路が不活性化され PP2A が活性化状態となる。Mastl 経路の不活性化は PP2A 自身あるいは PP1 など他の因子が担うと考えられる。(B) 前核形成遅延の生理的意義。通常、受精卵では精子侵入から前核形成までは十分な時間があり、精子核の変化が保証されている。受精卵で前核形成が早期化すると精子核の変化が不十分のまま前核が形成され、直接の原因は不明であるが、矮小な雄性前核という形態として現れる。この受精卵は第一卵割で染色体分配異常を起こし、それ以上発生できない。一方で単為発生胚は第一卵割までは顕著な異常は見られないことから、雌性染色体には前核形成早期化は影響を与えないと考えられる。以上より、前核形成までの時間を卵の細胞周期制御により確保することで雄性前核形成のための時間を保証することがこの前核形成タイミング制御機構の重要な意義であると考えられる。