

マウス胚の初期卵割における
細胞周期制御機構に関する研究

原口 清輝

①

マウス胚の初期卵割における
細胞周期制御機構に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科

獣医学専攻 平成6年4月入学

原口清輝

指導教官

勝木元也

目次

序論	1
第1章：G2/M期停止胚とM期進行胚を得るための実験系の確立	
緒言	7
材料および方法	
(1) マウス	10
(2) 受精培地	10
(3) 発生培地	10
(4) 体外受精	11
(5) 体外培養	11
(6) プロモデオキシウリジンの取り込みによるS期の評価	12
(7) ヒドロキシウレアによるDNA合成阻害	13
(8) AKR胚の子宮内移植	13
(9) 統計処理	13
結果	
(1) AKR胚の2-cell blockに対する培地中のリン酸除去の効果	15
(2) 胚発生阻害とリン酸濃度の関係	15
(3) AKR胚の2-cell blockに対するリン酸の作用時期の検討	16
(4) AKR 2-cell block胚のS期の検討	16
(5) 2-cell blockが解除された胚の正常性の検討	17
(6) AKR胚のM期に相当する時期の決定	17
考察	19

要約	24
図表	25
第2章：マウス初期胚におけるM期誘導因子の動態	
緒言	37
材料および方法	
(1) ヒストンH1キナーゼ活性測定	41
(2) ウェスタンブロッティング	42
(3) cdc25BおよびサイクリンB mRNAの定量	43
(4) オカダ酸処理	44
(5) ヘキスト染色	45
結果	
(1) ヒストンH1キナーゼ活性	46
(2) cdc2のリン酸化状態	46
(3) cdc25BおよびサイクリンB mRNAの量的変動	47
(4) cdc25Bの検出	48
(5) オカダ酸処理によるH1キナーゼ活性、cdc2、cdc25B、 および核相の変化	48
考察	50
要約	55
図表	56
第3章：マウス初期胚におけるmitogenシグナル伝達系の動態	

緒言	67
材料および方法	
(1) ウェスタンブロッティング	70
(2) コルセミド処理	70
(3) 免疫沈降	71
(4) オカダ酸処理	71
(5) MBPキナーゼ活性の測定	72
結果	
(1) M期進行胚、およびG2/M期停止胚におけるrasの変化	73
(2) M期進行胚、およびG2/M期停止胚におけるraf-1の変化	73
(3) 進行胚、およびG2/M期停止胚における14-3-3の変化	73
(4) 抗14-3-3抗体におけるraf-1の共沈	74
(5) M期進行胚、およびG2/M期停止胚におけるMEKの変化	74
(6) M期進行胚、およびG2/M期停止胚におけるERKの変化	74
(7) M期進行胚、およびG2/M期停止胚における MBPキナーゼ活性の変化	75
(8) オカダ酸処理によるras、raf-1、MEK、ERKの動態と MBPキナーゼ活性の変化	75
考察	76
要約	81
図表	82
総括	91

付図	97
参考文献	99
謝辞	115

序論

細胞周期の制御機構に関する研究は、ここ数年の間に飛躍的發展をとげてきた[Murray and Kirschner, 1989a,b; Murray et al., 1989; Nurse 1990; Draetta, 1990]。それまで個々独立に行われてきたサイクリン、MPF (maturation/M-phase promoting factor)などを対象とした生化学的研究と、酵母の*cdc* (cell division cycle) 変異株を用いた遺伝学的研究が合流し、大きな奔流となって発展したためである。細胞周期は基本的に4つの独立した位相、すなわち、G1期(第一間期)、S期(DNA合成期)、G2期(第二間期)、M期(分裂期)よりなる。現在、広くM期を誘導する因子として知られているMPFは、元来未成熟卵子において、卵成熟すなわち減数分裂(meiosis)を誘導する因子として、ヒトデ [Strausfeld et al., 1991; Picard et al., 1991]、ウニ[Evans et al., 1983; Murray and Kirschner, 1989a]、ニマイガイ[Draetta et al., 1989; Hunt et al., 1992]などの海産無脊椎動物、およびアフリカツメガエル[Masui and Markert, 1971; Kobayashi et al., 1991; Minshull et al., 1989; Newport and Kirschner, 1984; Haccard et al., 1995]の卵子を中心に研究されてきた。これらの卵子は、細胞周期が同調した材料を多量に得やすいという大きな利点があったためと考えられる。哺乳動物を対象としたmeiosisの研究には、均一な材料が比較的容易に得られるマウス卵子が主として用いられてきた[Choi et al., 1991; Verlhac et al., 1994; Kubiak et al., 1993; Araki et al., 1996; Hashimoto and Kishimoto, 1988]。一方、MPFがmeiosisのみならず、有糸分裂(mitosis)をも含んだM期を誘導する因子であることが示されると、mitosisの研究にはより多量に、より均一な

材料が得られ、培養法も確立している哺乳類培養細胞株が用いられるようになり、細胞周期の研究は大きく発展した[Nurse, 1990; Draetta, 1990]。現在、meiosisの研究には卵子が多用されるが、受精後のmitosis過程の細胞周期の研究に卵子が用いられることはまれであり、体細胞と同じであろうと考えられているようである。しかしながら、初期胚のmitosis、いわゆる卵割過程は特殊であり、体細胞とは異なる制御機構が存在している可能性がある。

体細胞の細胞周期では長いG1期に体積の増加がおり、細胞分裂をくり返しても細胞の体積が減少していくことはない。これに対し、初期胚のG1期は非常に短く、実質的には存在しない[Gamow and Prescott, 1970]。そのため、成長することなしに分裂し、分裂をくりかえすごとに割球がどんどん小さな細胞へと分割されていく。実質的なG1期が存在しないことは、卵割過程の特殊性の一つである。

また、哺乳類体細胞の増殖には増殖因子(mitogen)が必要であり、そのため体細胞培養では培養液中に血清が添加される。例えば、線維芽細胞では線維芽細胞増殖因子(FGF)、上皮増殖因子(EGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)などがmitogenとなり[Gotoh and Nishida, 1996; Carpenter and Cohen, 1990; Heldin, 1992]、これらのmitogenが細胞膜上の特異的な受容体と結合し、シグナル伝達因子の活性化を経て最終的には核内の様々な転写活性化を引き起こす[Sanchez and Dynlacht, 1996; Bartek et al., 1996]。Mitogenが存在しないと哺乳類体細胞はS期に進行することができず、G1期で停止しやがて静止期(G0期)に入る[Pardee, 1989]。逆に、G0期の細胞をG1期に誘導するためにはmitogenが必要である。一方、哺乳類の初期胚では、外因性のmitogenがなくても

G1期で停止することはなく発生を続けることが可能である。このことは、初期胚ではmitogenによって活性化されるシグナル伝達系が構成的 (constitutive) に活性化しているのか、あるいは内因性の因子によって体細胞と同様に活性化が起こっているのかもしれない。また別の可能性として、初期胚ではこの系が活性化される必要性が無いような機構が存在し、極端に言えばこの系自体が存在しない可能性もある。しかし、これまで哺乳類初期胚において、このシグナル伝達系の存在、あるいは活性化の状態を示した報告は、後に述べるMAPキナーゼを除いて見あたらない。

マウス胚では、系統によって1細胞期から体外培養したときに2細胞期で発生が停止するいわゆる "2-cell block" という現象が見られる [Goddard and Pratt, 1983; Toyoda et al., 1992]。マウス以外の哺乳類初期胚でも、停止する発生段階は異なるものの類似の現象がみられ、ウシでは8-cell block [Camouse et al., 1984]、ブタでは4-cell block [Davis and Day, 1978; Davis, 1985] として知られている。これらの細胞周期停止はS期が終了しており、G2/M期での停止といわれている [Luthardt et al., 1975]。一般に、体細胞ではいったんS期が終了すると、培養環境が悪化してもG2/M期で停止することはなく、次のG1期まで細胞周期は進行する [Pardee, 1989]。従って、この発生停止胚におけるG2/M期停止は胚特有の現象といえることができる。

このように、体細胞とは異なるいくつかの現象が哺乳類初期胚の卵割過程には存在している。このことは、体細胞と初期胚の分裂制御機構に何らかの相違が存在する可能性を強く示唆している。近年、体外受精技術、発生工学の進歩に伴い、哺乳類初期胚の培養は多用されるよう

になっている。これらの研究分野をさらに発展させるためにも、初期胚の卵割制御機構を解明することは不可欠であると思われる。しかしながら、前述の通り卵割はmitosisであり、この制御機構の研究には一般に哺乳類の培養細胞が用いられ、卵割もそれと同様という考え方が支配しているためか、卵割時の細胞周期制御因子の動態に関する報告はまだ少ない[Aoki et al., 1992; Kalab et al., 1996]。これらの限られた報告を見る限りにおいては、卵割と体細胞分裂の明らかな違いを見いだせないことも、この方面の研究が積極的に行われない一因かも知れない。しかしながら上述のごとく、体細胞分裂と初期胚卵割では、歴然とした相違があることもまた事実である。そこで本研究では、哺乳類初期胚の卵割制御機構には、体細胞のmitosis制御とは異なる点が必ず存在するはずであるという仮定のもとに、初期胚に特異的な制御機構を探索することを目的として実験を行った。本目的のためには、均一な状態の初期胚を多量に、しかも比較的容易に得られることが前提となる。現在のところ、これらの条件を満たす哺乳類初期胚はほぼマウスに限られる。さらに、初期胚に特異的な制御機構を見つけるためには、初期胚に特有の現象において、細胞周期制御因子の動態を調べるのが有効なアプローチになると考えられる。すなわち、胚特異的な制御機構は、胚特異的な状態において見つけやすいであろうという発想の下に実験を進めることにした。

本研究では、胚特異的な現象としてG2/M期における細胞周期の停止に着目した。S期が終了しているにも関わらずG2/M期で細胞周期が停止している胚では、M期誘導因子はどのような状態にあるのか。またこのような胚をM期に誘導できれば、胚特異的なM期誘導機構が明らかになる可能性が考えられる。さらに上述した通り、体細胞の培養系におい

ては、細胞周期の進行、停止はmitogenの存否と一義的に関連している。胚の細胞周期の進行はmitogen非依存性であるが、このときmitogenによって活性化されるシグナル伝達系がどのような状態にあるのかは報告されていない。すなわち、この系が存在するのか、また、もし存在するとすれば活性化されているのかといった疑問はMAPキナーゼを除いて調べられていないのである。この点について、細胞周期停止胚と進行胚において調べることは、胚特異的な細胞周期制御機構の発見につながるものと期待される。

実験開始にあたり、まずG2/M期で停止するマウス初期胚と、この胚をM期に誘導する実験系の確立から開始し、第一章とした。そして次にこの系を用いて、現在までに体細胞で明らかにされているM期誘導因子が、マウス初期胚においてどのような動態を示しているのかを調べ、第二章とした。さらにこの系において、mitogenにより活性化されるシグナル伝達因子の動態を調べ、第三章とした。以上より得られた結果から、胚特異的な細胞周期制御機構について、総括において考察した。以下、これらについて順を追って記述する。

第一章

G2/M期停止胚とM期進行胚を得るための 実験系の確立

緒言

本章ではまず、G2/M期で細胞周期を停止する胚を得ること、さらにこの胚をM期に誘導する実験系を確立することを目的とした。実験材料として一度に多くの胚を用いる必要性を考慮した場合、完全にG2/M期停止を起こす胚において、それをいかに高率に解除できるかということは最も重要な検討課題である。

*In vitro*におけるマウス2細胞期胚のG2/M期停止、いわゆる2-cell blockは、その起こりやすさに系統差が著しいことが報告されている。使用する発生培地にもよるが、C57BL/6N胚は全く2-cell blockを示さず [Toyoda et al., 1992]、ICRマウス胚では44% [Toyoda et al., 1992]、TUCKマウス胚においては75% [Noda et al., 1991]が2-cell blockを引き起こす。その中で近郊系であるAKR/N (AKR) マウス胚は、ほぼ完全に2-cell blockを示すことが知られている [Toyoda et al., 1992]。よって、もしAKR胚の2-cell blockを高率に解除することができれば、本研究の実験材料として適したモデルになると考えられる。これまでの報告から、ICR [Abramczuk et al., 1977; Toyoda et al., 1992]、DDD [Toyoda et al., 1992]、B2D6F1、CD1、CF1 [Fissore et al., 1989]マウス胚の2-cell blockの解除には、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) が効果を示し、また同様にICR [Noda et al., 1991; Toyoda et al., 1992]、TUCK [Noda et al., 1991]マウス胚の2-cell blockの解除には、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) が有効であることが報告されている。しかしながら、AKR胚の2-cell block解除には全く効果が示されていない [Toyoda et al., 1992]。

近年、Bavisterら [Schini and Bavister, 1988]は、ハムスター胚の2-cell blockが培地中のグルコースとリン酸により引き起こされることを報告した。すなわち、培地中からリン酸を除去することで2-cell blockを解除することが可能となった。さらに、ラット胚の2-cell blockにおいても、Miyoshiら[1994]によって同様の結果が報告されている。本章ではまず、ハムスターおよびラットでの報告をもとに、AKR胚についても培地中のグルコースおよびリン酸濃度を修正することで2-cell blockが解除されるかどうかを検討することにした。

序論でも述べたように、マウス2-cell block胚のS期は終了していることが報告されているが[Luthardt et al., 1975]、これがAKR胚にも当てはまるかを確認することは重要である。体細胞においても、DNAの複製が終了していない場合、あるいはDNAに損傷のある場合はG2/M期で停止することが知られており、G2/M期チェックポイントとよばれている [Weinert and Hartwell, 1988; Hartwell and Weinert, 1989; Furnari et al., 1997; Sanchez et al., 1997; Peng et al., 1997]。もし、AKR 2-cell block胚のS期が終了していないためにG2/M期停止を起こしているのであれば、これは胚特異的な細胞周期の制御機構によるものではなく、体細胞と同様にDNA合成機構の問題と考えられるからである。またこの様な場合、仮に2-cell blockが解除されても、それはG2/M期チェックポイント機構の破綻による極めて非生理的な状態といわねばならない。

そこで、AKRのG2/M期停止胚においても、S期が終了していることをチミジンのアナログであるプロモデオキシウリジンの取り込み実験により確認した。さらに、G2/M期停止が解除された胚でも、体細胞で示されているG2/M期チェックポイント機構が正常に機能していることを、

ヒドロキシウレアでS期を阻害し、そのとき細胞周期が停止することによって確認した。2-cell blockが解除された胚において、初期胚特異的な制御機構を探ろうとする場合、その胚が生理的状态であることが大前提である。そこで、この胚が正常発生であることを裏付けるため、胚移植によって胎子への発生を確認することにした。

また細胞周期の研究では、発生ステージ（細胞周期）の同調した材料を得ることが必要である。そこで、M期に相当する時期がいつかを知るために、胚発生を経時的に観察して、この時期を決定することとした。

これら全てのことが明確になったとき、AKR胚が本研究の実験材料として適したモデルになると思われる。

材料および方法

(1) マウス

雌マウスは8-12週齢のAKR/N系（日本SLC）と、対照として8-12週齢のMCH(ICR)系（日本CLEA）を用いた。雄マウスは15週齢以上のICR系（日本CLEA）を用いた。これらの動物は、SPF環境において自由摂餌・摂水、照明コントロール下（12時間明：6:00-18:00）で、実験に供するまで最低3日間馴致した。

(2) 受精培地

受精培地の組成は、Table 1-1に示した。受精培地および精子受精能獲得培地にはTYH [Toyoda et al., 1971]からリン酸 (KH_2PO_4) を除去し、0.5mg/ml BSA (fatty acid free, Yagai) を添加したものを使用した (mTYH)。受精培地 (200 μl) および精子受精能獲得培地 (400 μl) は濾過滅菌した後、ミネラルオイル (code 261-17; nacalai tesque) で覆い、37°Cの5% CO_2 インキュベーター (TABAI) 内で一晩平衡させた。

(3) 発生培地

発生培地の組成は、Table 1-1に示した。発生培地にはWhitten's medium [Whitten 1971] (0.1mM EDTA, 3mg/ml BSA添加) を使用し、以下の実験区によりそれぞれ組成を修正した。いずれの培地 (200 μl) も濾過滅菌した後、ミネラルオイルで覆い、37°Cの5% CO_2 インキュベーター内で一晩平衡させた。

(1) 胚発生におよぼすグルコース濃度とリン酸 (KH_2PO_4) 濃度の関係を調べる実験では、グルコース濃度0.5mMおよび5.55mMに対し、それぞれ1.17mMリン酸添加、および無添加の組み合わせで胚発生率を検討した。

(2) 胚発生阻害におよぼすリン酸濃度の関係を調べる実験では、グルコース濃度を0.5mMに固定し、それぞれ0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0mM濃度のリン酸添加培地で胚発生率を検討した。

(3) (1) および (2) 以外の実験ではグルコース濃度を0.5mMに固定し、1.17mMリン酸添加培地 (mWMP(+))、もしくは無添加培地 (mWMP(-)) を使用した。

(4) 体外受精

体外受精に先立ち、雌マウスには過排卵処理を施した。すなわち、PMSG (Peamex; 三共) 5IU、hCG (Puberogen; 三共) 5IUを48時間間隔で腹腔内投与し、hCG投与後16時間に卵管膨大部より卵丘卵子複合体を取り出し、受精培地に導入した。精子は、精巢上体尾部由来の精子を、精子受精能獲得培地で2-3時間培養して媒精に供した。媒精時の最終精子濃度は150精子/ μl とし、胚発生のステージを同調させるため、媒精時間 (精子と卵子の共培養時間) は2時間とした。

(5) 体外培養

(1) 媒精2時間後に、ヒアルロニダーゼ (type IV-S; SIGMA) を終濃度0.05%となるように受精培地に添加し、卵丘細胞を完全に除去、洗浄した後、20-30卵子/ドロップとなるように発生培地に移して37°Cの5% CO_2

インキュベーター内で培養した。媒精6時間後、倒立顕微鏡下で雌雄両前核の認められなかった卵は培地中から除いた。発生段階を記録するため、媒精後24、56、96、および120時間に倒立顕微鏡下で観察した。

(2) リン酸の作用する時期を決定する実験では、Fig. 1-1のそれぞれの横棒で示した時間のみmWmp(+)で、それ以外の時間をmWmp(-)で培養し、発生率を比較した。媒精後19時間から24時間まで、1時間間隔で観察したとき、第一卵割が認められた時間を2細胞期の0時間とした[Bolton et al., 1984]。媒精後72、96、および120時間に胚発生を倒立顕微鏡下で観察、記録した。

(3) AKR胚のM期に相当する時期を決定する実験では、1細胞期から2細胞期への発生を媒精後16時間から26時間(MCH胚では14時間から20時間)、および2細胞期から4細胞期への発生を媒精後40時間から56時間(MCH胚では36時間から48時間)2-4時間間隔で倒立顕微鏡下で観察、記録した。

(6) プロモデオキシウリジン (5-Bromo-2'-deoxy-uridine; BrdU) の取り込みによるS期の評価

第一卵割後4時間、8時間、および12時間に、mWmp(-)およびmWmp(+)に終濃度10 μ MのBrdU (Cat No. 1296736; Boehringer Mannheim Biochemica) を添加し、胚を30分間培養した。洗浄後、酸性タイロイド液で透明帯を除去し、100%メタノールで30分間固定した。2% Triton X-100で60分間透過処理後、さらに4N HClに30分間浸漬した。洗浄後、抗BrdUモノクローナル抗体、および蛍光標識された抗マウスIgGでそれぞれ60分間反応させた後、スライドガラスにマウントして蛍光顕微鏡下で

観察した。なお、BrdUの核内への取り込み量は、蛍光強度により3段階（++、+、-）に分類して評価した（Fig. 1-2）。

(7) ヒドロキシウレア（Hydroxyurea; HU）によるDNA合成阻害

DNA合成阻害剤であるHUで2細胞期胚を処理したとき、細胞周期が停止するかどうかを調べるため、第一卵割直後のMCH胚、およびmWmp(-) AKR胚を2.5mMのHU（SIGMA）を含む同培地に移した。その後、媒精後72時間まで培養し、発生状況を倒立顕微鏡下で観察、記録した。

(8) AKR胚の子宮内移植

mWmp(-)で培養した媒精96-100時間後の胚盤胞期胚を倒立顕微鏡下で観察し、形態的に正常と思われるものを子宮内移植に供した。移植する胚は、Hepes-WM（Table 1-1）に移して洗浄し、ミネラルオイルの混入を完全に除いた。精管結紮雄マウスとの交配により得られたDay 2.5（プラグが確認された日をDay 0.5とした）の偽妊娠雌マウス（ICR）6匹をレシピエントとして用いた。2.5%アバーチン（2.5g 2,2,2-tribromoethanol/2.5ml 3-methyl-1-butanol/100ml DW）を15-17 μ l/g体重となるよう腹腔内注射して麻酔をかけた後、子宮を引き出し片側の子宮に7-9個の卵を移植した[Mintz, 1967]。Day 17に剖見し、胎子数および着床痕を観察、記録した。

(9) 統計処理

各実験は少なくとも3回くり返した。各実験区の平均値から一元配置分散分析（ANOVA）を行い、これをボンフェローニ（Bonferroni）の方法に

より多重比較検定を行った。 $p < 0.05$ をもって有意差があると判定した。

結果

(1) AKR胚の2-cell blockに対する培地中のリン酸除去の効果

Table 1-2に示すように、発生培地中のグルコース濃度（0.5mM, 5.55mM）およびリン酸濃度（1.17mM, 0mM）に関係なく、全てのMCH胚およびAKR胚は2細胞期に進行した。MCH胚では、これら全ての実験区において90%以上が4細胞期へ、また70%以上が胚盤胞期へ有意差無く発生した。AKR胚ではリン酸添加区において2-cell blockが観察され、4細胞期への進行は0%（5.55mMグルコース区）および3.3%（0.5mMグルコース区）であり、胚盤胞期への発生は認められなかった。一方、リン酸無添加区では75.4%（5.55mMグルコース区）および91.8%（0.5mMグルコース区）の2細胞期胚が4細胞期へと発生した。また、胚盤胞期への発生はそれぞれ35.1%および42.6%であり、グルコース濃度0.5mMおよびリン酸無添加のときAKR胚の発生率が最も高かった。

(2) 胚発生阻害とリン酸濃度の関係

Table 1-3は、発生培地中のリン酸濃度とAKR胚発生の関係を調べたものである。培地中のリン酸（0.001, 0.01, 0.1, 1.0mM）は、4細胞期、桑実胚期、および胚盤胞期への発生を濃度依存的に阻害した。4細胞期への発生率は、リン酸濃度が最も低い0.001mMのときでも（71.8%）、リン酸無添加（91.4%）と比較して有意に低かった（ $p < 0.05$ ）。これまでの結果から、AKR胚の2-cell blockはリン酸を全く加えない培地中で培養することにより、90%以上解除できることが明らかとなったため、以後の実験系では発生培地中のグルコース濃度を0.5mMに固定し、1.17mMリ

ン酸添加培地 (mWMp(+))、およびリン酸無添加培地 (mWMp(-)) の2種類を用いることにした。

(3) AKR胚の2-cell blockに対するリン酸の作用時期の検討

Fig. 1-1に示すように8通り (A-H) の実験区を設定し、棒で示した時間をmWMp(+)で培養し、それ以外はmWMp(-)で培養した。その結果

(Table 1-4)、4細胞期以降の発生率が最も低かった区は、DおよびFであった。この両区は1細胞期後半(媒精後10時間以降)と2細胞期前半

(第一卵割後12時間以前)の両方を含んでいる。これらのうちの一方のみを含むB, C, E, Gでは、4細胞期への発生率がD, Fより有意に高いが、対照よりは有意に低かった。また、この両方を含まないA, Hでは対照と差はなかった。よって、リン酸が2-cell blockを引き起こす時期は1細胞期後半(媒精後10時間)から2細胞期前半(第一卵割後12時間)であることが示された。

(4) AKR 2-cell胚のS期の検討

Fig. 1-2に示すように、BrdUの核内への取り込み量を蛍光強度により3段階(++, +, -)に分類した。Fig. 1-2はmWMp(+)における各時間でのBrdUの核内への取り込みを示したものであるが、これはmWMp(-)においても同様であった。その結果はTable 1-5に示すように、mWMp(-)とmWMp(+)において差は認められなかった。すなわち、第一卵割後4時間では、mWMp(-)およびmWMp(+)における全ての胚において++のBrdUの取り込みが認められた。その後8時間では++の割合が減少し(13-14%)、+レベルのBrdUの取り込みが多く胚で認められた(70-

71%)。また12時間では、ほとんどの胚でBrdUの取り込みは認められなかった(-:96-97%)。

(5) 2-cell blockが解除された胚の正常性の検討

2-cell blockの解除されたAKR胚のG2/Mチェックポイント機構が正常であるかどうかを確認するため、第一卵割直後の2細胞期胚を、DNA合成阻害剤であるHUを含む培地で培養し、発生が停止するかどうかを調べた。その結果Table 1-6に示す通り、AKR胚の発生は、対照として調べたMCH胚同様、2細胞期で完全に停止した。次に、媒精96-100時間後の胚盤胞期胚を子宮内に移植し、正常胎子が得られるかどうかを調べた。その結果、合計96個の胚を6匹のレシピエントに移植し、Day 17に確認した結果、52個(54%)の着床痕と肉眼所見的に正常と思われる27匹(28%)の胎子が認められた(Table 1-7)。

(6) AKR胚のM期に相当する時期の決定

Fig. 1-3は受精後の発生段階を経時的に観察した結果である。AKR胚が第一卵割を開始する時間は、媒精後およそ18時間で、mWMp(-) AKR胚では22時間、mWMp(+) AKR胚では24時間で大部分の胚が第一卵割を終了した。MCH胚では媒精後およそ14時間から18時間であった。また、第二卵割を開始する時間は、mWMp(-) AKR胚では媒精後およそ44時間、MCH胚では36時間であった。大部分の胚が第二卵割を終了するのは、それぞれ媒精後56時間、48時間であり、個々の胚によっておよそ12時間の違いがあった。mWMp(+) AKR胚では第二卵割はほとんど見られず、前記実験結果が再現された。よって、AKR胚の1細胞期のM期に相当するの

は媒精18時間後から4時間であり、2細胞期のM期に相当するのは媒精44時間後から12時間であることが分かった。

考察

本章では、G2/M期で発生停止する胚と、これを解除しM期へ進行する胚を高率に得るための実験系の確立を目指した。その結果、AKR胚が良い材料となりうる可能性が示された。すなわち、ほぼ完全に起こるAKR胚の2-cell blockが、培地中のリン酸を除去することにより90%以上解除されることが初めて明らかになったのである。これまで、いくつかの系統のマウス胚でみられる2-cell blockの解除には、培地中にEDTA [Abramczuk et al., 1977; Toyoda et al., 1989; Fissore et al., 1989] やSOD [Noda et al., 1991; Johnson and Nasr-Esfahani, 1994] の添加が有効であるとされてきたが、これらはAKR胚には全く効果を示さなかった [Toyoda et al., 1992]。しかし今回、リン酸を完全に除去し、グルコース濃度を下げることで90%以上が4細胞期へ進行し、さらに40%以上が胚盤胞期まで発生可能となったのである。発生培地中のリン酸およびグルコースが初期胚発生に阻害作用を示すものとしては、これまでハムスター [Schini and Bavister, 1988]、ラット [Miyoshi et al., 1994]、ウシ [Pinyopummintr and Bavister, 1991]、ブタ [Petters et al., 1990] などと報告されている。グルコースとリン酸による発生阻害の生化学的説明としては、Bavisterら [Schini and Bavister, 1988] はクラブトリー効果 [Crabtree, 1929; Koobs, 1972] を挙げ、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化の代謝阻害によるエネルギー産生不足が原因になっているのではないかと述べている。つまり、グルコースは解糖系の基質となり、その結果、解糖系代謝が亢進することによって [Wu, 1965]、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化が抑制されてATP産生が阻害されるというものであ

る。一方、リン酸は解糖系を構成する3つの主要酵素（ヘキソキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ）を活性化するため、このクラブトリー効果を助長し、それがひいては2-cell blockを引き起こすというものである。Bavisterら[Seshagiri and Bavister, 1991]は、グルコースとリン酸の存在によるハムスター8細胞期胚の発生阻害が、クラブトリー効果によるものであるというこを、その酸素消費量を測定することにより示した。しかし、実際にAKR胚の2-cell blockが、同様の原因によっているかどうかは不明である。

発生培地（Whitten's medium）に含まれるリン酸濃度は1.17mMであるが、リン酸濃度を0mMから1.0mMまで5段階（0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0mM）に変化させ、濃度依存的に発生が阻害されるかどうかを検討したところ、わずか0.001mMで4細胞期への発生が有意に阻害された。また、1.0mMでは桑実胚期への発生が全く認められなかった。ラットでも2-cell blockはリン酸濃度に依存的に起こり、AKR胚と同じく0.001mMで発生率が有意に減少している[Miyoshi et al., 1994]。さらにハムスターでは桑実胚期への発生が1.0mMで完全に阻害されている[Schini and Bavister, 1988]。AKR胚のリン酸に対する感受性は、ハムスターおよびラットと近似しており、リン酸が2-cell blockを引き起こすメカニズムは、これらの種間で共通なのではないかと推測される。

さて、2-cell blockの解除という言葉通りの厳密な意味においては、2-cell blockを示している2細胞期の培地からリン酸を除去して、それが解除されることが望ましいであろう。そこで、培養途中に胚をリン酸存在から非存在培地へ移しかえる実験を行ったところ、2細胞期中期以降にリン酸を除いたのでは2-cell blockは解除されなかった。この実験

から、リン酸が発生停止に作用する時期は、1細胞期後半から2細胞期前半であることが示された。この時期はちょうど母性由来のmRNAから胚自身のゲノム由来のmRNAへ切り換わるいわゆる "zygotic gene activation" [Schultz, 1993; Wiekowski et al., 1991]の時期と一致しており、リン酸の作用機序を考えるうえで興味深い結果である。しかし、本実験のマウス初期胚に特異的な細胞周期制御機構を探求するという本来の目的からは離れるので、ここではこの問題についてはこれ以上議論しないこととする。本研究の目的においては、G2/M期での発生停止胚と、それが高率に解除され、M期が誘導される胚が得られる実験系が確立されれば十分であると考えられる。よって以後の実験では、mWMp(-)またはmWMp(+))の一種類の培地を培養開始時点から用いることにした。

これまでの報告からマウス2細胞期胚におけるS期は第一卵割後6-8時間とされている[Luthardt et al., 1975]。これはチミジン ($[^3\text{H}]$ -thymidine) をトレーサーに用いて、核内への取り込み実験により明らかとなった。さらにLuthardtら[1975]は、2-cell block胚でもS期が6-8時間で終了しており、G2/M期停止であることを報告している。本実験の目的は、このS期完了後のG2/M期停止という胚特有の現象を示すマウス胚を得ることにある。緒言でも触れたように、G2/M期停止は体細胞でも認められており[Weinert and Hartwell, 1988; Hartwell and Weinert, 1989; Furnari et al., 1997; Sanchez et al., 1997; Peng et al., 1997]、単にDNA合成機構の障害によるG2/Mブロックであり、リン酸除去によるこの停止の解除がG2/M期チェックポイント機構の破綻によるのであれば、本研究の目的とはかけ離れたものになってしまう。本目的のためには、これがS期終了後のG2/M期停止という現象であること、またこれを解除した胚が

正常なG2/M期チェックポイント機構を有し、生理的な状態であることが明確に示さなければならない。そこで、まずS期の終了を確認することにした。トリチウムで放射能ラベルされたチミジンを実験系に使うのに比べ、チミジンのアナログであるBrdUはその簡便さ、安全性から特に体細胞における細胞周期研究に多用されている[Ellwart and Dormer, 1985; Gratzner, 1982; Vanderlaan and Thomas, 1985]。そこで本実験ではBrdUを用いてこの点を調べた結果、2-cell block解除胚、および2-cell block胚で全く同様の結果が得られ、第1卵割後およそ8時間でBrdUの取り込みが終了していることが確認された。これはLuthardtら[1975]の報告と一致するものである。BrdU取り込みの終了が、直ちにDNA合成が終了したことを示す証拠とはならないが、2-cell block解除胚のDNA合成を人為的に阻害したとき、G2/M期での停止がおこったことは、G2/M期チェックポイント機構が体細胞と同様に機能していることを示している。さらに、mWMP(-)で胚盤胞期まで発生した胚を子宮内移植したところ、Day 17に肉眼的に正常胎子が確認されたことから、リン酸除去培地で2-cell blockが解除されたAKR胚は、極めて生理的な状態であることが明らかとなった。ハムスター[Schini and Bavister, 1990]、ラット[Miyoshi et al., 1995]においても、同じく胚移植によって正常胎子が得られていることは、リン酸除去が胚に対し非生理的な状態を誘導しているのではないことを支持するものである。以上の結果を考え合わせれば、少なくともmWMP(-)で培養された胚では2細胞期のDNA合成は正常に終了していたことは明らかである。AKR 2-cell block胚においても、BrdUの取り込みの時間経過や取り込み量に、正常発生胚との相違が全く見出されなかったことは、2-cell block胚においてもS期が完了していることを示唆する

ものである。以上より、本実験の目的であるS期終了後のG₂/M期停止という胚特有の現象を示す胚を得られ、またこれらをM期へ誘導する実験系ができたと考えられる。

本研究の以後の実験において、胚発生のどの時期がM期に相当するかを確認しておくことは重要である。そこで、胚発生を経時的に観察し、卵割開始時期を明らかにした。その結果、1細胞期、2細胞期のM期に相当する時間はそれぞれ、MCH胚で媒精後14-18時間と36-48時間、AKR胚で18-22時間と44-56時間であり、本培養系においては、AKR胚とMCH胚の発生時間に明らかな系統差があることも明らかとなった。以後の実験においてM期の胚を実験に用いるときは、これらの時期を目安にすることにした。

以上より、本実験ではAKR胚の2-cell blockがS期終了後のG₂/M期停止であり、この停止は培地中のリン酸を除去することで解除されることを初めて示すことができた。マウス胚の体外培養において、2-cell blockがこれほど高率にコントロールできる系はこれまでに報告がなく、本実験系は、本研究をすすめていくうえで優れたモデルであると思われる。次章以降、この培養系を用いて初期胚特有の細胞周期制御機構を検索していくこととする。

要約

マウス初期胚の卵割過程に特異的な制御機構を解明するにあたり、高率に2-cell blockを起こすAKR胚が本研究に適した実験材料となり得るかどうかを検討した。そのためにまず、AKR胚の2-cell blockを解除することを第一義に考えた。これまで2-cell blockの解除に有効であるとされてきたEDTAやSODは、AKR胚には全く効果が示されていなかったが、本実験では、培地中のリン酸を除去することで、AKR胚の2-cell blockが解除されることを初めて明らかにすることができた。グルコース濃度を0.5mMにし、リン酸を完全に除去した培地 (mWMp(-)) を培養開始時から用いたとき、最も高率に2-cell blockが解除された (91.8%)。AKR胚のリン酸に対する感受性は濃度依存的であり、0.001mMで4細胞期への発生が有意に阻害され、1.0mMでは胚盤胞期への発生が完全に阻害された。AKR 2-cell block胚において、S期が完了しているかどうかをBrdUの核内への取り込み実験により調べたところ、正常発生胚と同様に、第1卵割後およそ8時間でS期が終了していることが示唆された。2-cell blockが解除されたAKR胚は、G2/M期チェックポイント機構が正常に機能していることが、HUを用いた実験より示唆され、さらにこれらの胚は正常発生であることが胚移植の結果から確認された。M期に相当する時間を知るため、体外受精後の胚発生を経時的に観察して確認したところ、1細胞期のM期は受精後およそ18-22時間、2細胞期のM期は受精後およそ44-56時間に相当することが分かった。以上より、AKR胚は本研究の目的である、マウス初期胚の細胞周期制御機構に関する研究において、非常に優れた材料であると考えられた。

図表

Table 1-1

Composition of media

Component	Concentration in medium (mM)		
	mTYH	mWM	Hepes-mWM
NaCl	119.37	87.67	87.67
KCl	4.78	4.83	4.83
CaCl ₂ (2H ₂ O)	1.71	—	—
KH₂PO₄	—	(1.17) ^a	—
MgSO ₄ (7H ₂ O)	1.19	1.17	1.17
NaHCO ₃	25.07	190	—
Glucose	5.56	0.5 ^b	0.5
Na-Lactate (ml) (60% syrup)	—	0.37	0.37
Ca-Lactate (5H ₂ O)	—	1.72	1.72
Na-Pyruvate	0.5	0.31	0.31
EDTA-2Na (2H ₂ O)	—	0.1	0.1
Penicillin G (mg/ml) (1,000,000U/vial)	7.5	8	8
Streptomycin (mg/ml) (1g/vial)	5.0	5	5
BSA (mg/ml)	0.5	3	3
HEPES	—	—	2
0.4M NaOH (ml)	—	—	2

^a KH₂PO₄ was added only mWMp(+).

^b Concentration of glucose was modified at 0.5mM.

Table 1-2

Effects of phosphate and glucose on in vitro development of AKR/N and MCH embryos*

Embryo	Phos- phate	† Glu- cose (mM)	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to		
				2-cell (24h)	≥ 4-cell (56h)	Blastocyst (120h)
AKR/N	-	0.5	61	61(100)	56(91.8) ^a	26(42.6) ^a
	-	0.55	57	57(100)	43(75.4) ^b	20(35.1) ^a
	+	0.5	60	60(100)	2(3.3) ^c	0(0.0) ^b
	+	0.55	58	58(100)	0(0.0) ^c	0(0.0) ^b
MCH	-	0.5	68	68(100)	66(97.1) ^a	50(73.5) ^c
	-	0.55	70	70(100)	66(94.3) ^a	54(77.1) ^c
	+	0.5	72	72(100)	67(93.1) ^a	54(75.0) ^c
	+	0.55	62	62(100)	60(96.8) ^a	48(77.4) ^c

*Experiments were repeated three times.

†1.17 mM KH₂PO₄ was present (+) or absent (-) in culture medium.

^{a,b,c} Within a column, values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

Tab. 1-3

Effects of phosphate concentration on in vitro development of AKR/N embryos*

Phosphate conc. (mM)	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to			
		2-cell (24h)	≥4-cell (56h)	≥Morula (96h)	Blastocyst (120h)
0.0	93	93(100)	85(91.4) ^a	47(50.5) ^a	40(43.0) ^a
0.001	85	85(100)	61(71.8) ^b	30(35.3) ^{a,b}	21(24.7) ^b
0.01	95	95(100)	58(61.1) ^b	24(25.3) ^b	19(20.0) ^b
0.1	85	85(100)	16(18.8) ^c	6(7.1) ^c	2(2.4) ^c
1.0	90	90(100)	3(3.3) ^d	0(0.0) ^d	0(0.0) ^c

* Embryos were cultured in mWM supplemented with 0.5 mM glucose and with various concentrations of KH₂PO₄. Experiments were repeated three times.

^{a,b,c,d} Within a column, values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

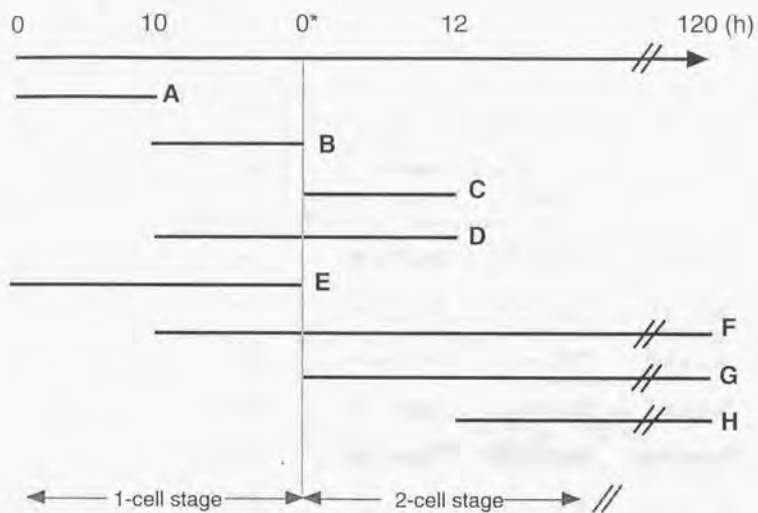


Fig. 1-1. Schematic protocol of embryos culture in the combination of mWMP(+) and mWMP(-). Bars show the period cultured in mWMP(+) medium. The numbers at the top of the Fig. represent the time after insemination (1-cell stage and 120h) and post first cell division (2-cell stage).
 * At 0h, the "pick-off" method was employed every 1h from 19h to 24h after insemination. The results were shown in Table 1-4.

Table 1-4

Relationship between exposure period to phosphate and developmental rate of AKR/N embryos*

Exposure period	No. of embryos cultured	Developmental rate (mean \pm SEM)		
		\geq 4-cell (72h)	\geq Morula (96h)	Blastocyst (120h)
A	95	80.4 \pm 2.4 ^a	52.8 \pm 5.1 ^a	29.6 \pm 4.2 ^b
B	157	41.1 \pm 3.9 ^b	12.5 \pm 2.6 ^{b,c}	7.9 \pm 2.2 ^c
C	125	42.4 \pm 3.6 ^b	23.3 \pm 3.2 ^b	8.9 \pm 2.9 ^c
D	123	12.7 \pm 3.5 ^c	4.1 \pm 1.3 ^c	1.6 \pm 1.6 ^c
E	115	56.1 \pm 6.7 ^{b,d}	27.3 \pm 7.5 ^b	16.1 \pm 6.0 ^{b,c,d}
F	95	10.2 \pm 2.7 ^c	2.1 \pm 1.3 ^c	1.0 \pm 1.0 ^c
G	92	32.1 \pm 4.3 ^b	14.1 \pm 6.2 ^{b,c}	8.0 \pm 3.3 ^c
H	122	68.1 \pm 8.0 ^{a,d}	47.4 \pm 3.5 ^a	28.5 \pm 4.7 ^{a,d}
Control [†]	70	83.2 \pm 3.3 ^a	50.1 \pm 4.4 ^a	35.7 \pm 1.9 ^a

* Experiments were repeated at least four times.

[†] Embryos were handled same way as group D, but were not exposed to phosphate; mWMP(-) was used instead of mWMP(+).

^{a,b,c,d} Within a column, values with different superscript are significantly different ($p < 0.05$).

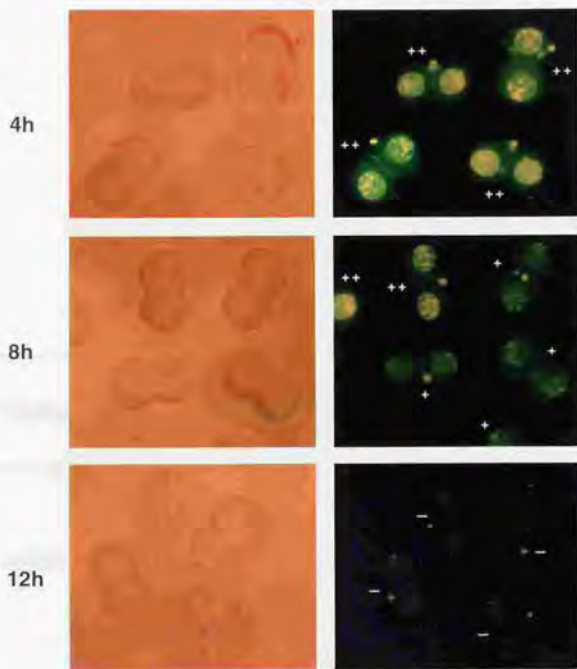


Fig. 1-2. DNA synthesis in the 2-cell stage AKR/N embryos. At 4, 8, and 12h post first cleavage, embryos were incubated with BrdU for 30min. Embryos were examined under light microscopy (left panel), and BrdU which incorporated into nuclei were detected using anti-BrdU and anti-mouse Ig fluorescein antibodies (right panel). Three criteria (++, +, -) were shown in the right panel. Although these photos show embryos cultured in mWMP(+), same results were also observed embryos cultured in mWMP(-).

Table 1-5
Incorporation of BrdU into nuclei of 2-cell
stage embryos

Medium	Hours after first cleavage	No. of embryos examined	No. (%) of embryos at the criteria of		
			++*	+*	-*
	4	42	42 (100)	0 (0)	0 (0)
mWMP(-)	8	28	4 (14.3)	20 (71.4)	4 (14.3)
	12	35	0 (0)	1 (2.9)	34 (97.1)
	4	45	45 (100)	0 (0)	0 (0)
mWMP(+)	8	30	4 (13.3)	21 (70.0)	5 (16.7)
	12	30	0 (0)	1 (3.3)	29 (96.7)

* Three criteria (++, +, -) were shown in Fig. 1-2.

Table 1-6

The effect of HU on the development of 2-cell stage embryos

Embryos	HU*	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to 4-cell stage
AKR/N [§]	-	36	33 (91.7)
	+	40	0 (0)
MCH	-	36	36 (100)
	+	42	0 (0)

* Embryos were cultured with (+) or without (-) 2.5mM hydroxy urea after first cleavage.

[§] AKR/N embryos were cultured in mWMP(-) medium.

Table 1-7

Development of AKR/N mouse embryos after embryo transfer*

Experiment number	No. of embryos transferred	No. (%) implanted	No. (%) of fetuses
1	16	6 (38)	4 (25)
2	15	3 (20)	2 (13)
3	16	10 (63)	3 (19)
4	16	13 (81)	7 (44)
5	16	10 (63)	6 (38)
6	17	10 (59)	5 (29)
Total	96	52 (54)	27 (28)

* At 96-100h after insemination, morphologically normal blastocysts derived from AKR/N embryos cultured in mWMP(-) were transferred into the uteri of 6 ICR mice on Day 2.5 of pseudopregnancy.

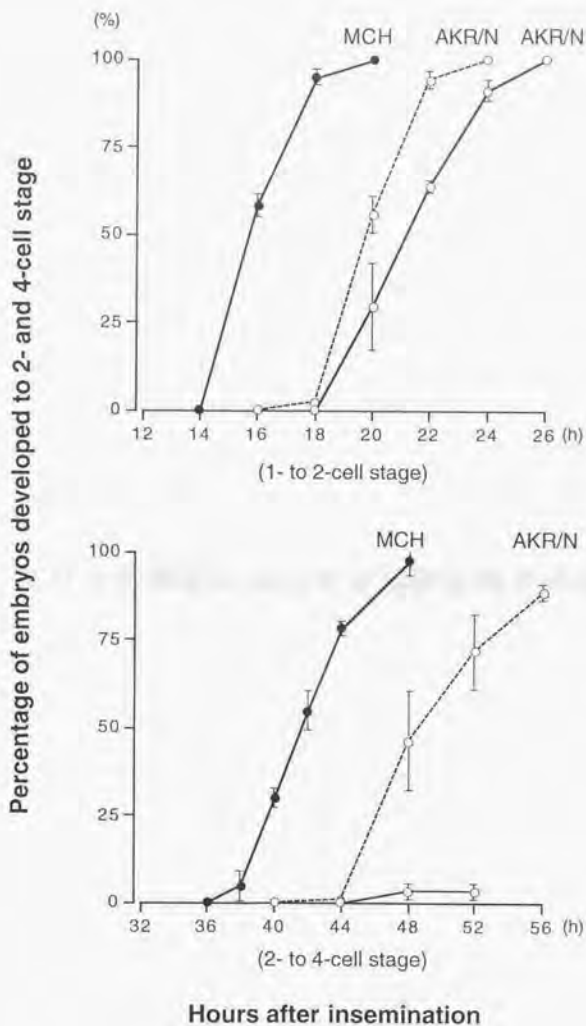


Fig. 1-3. Time course of MCH (●) and AKR/N (○) embryos developed to 2- and 4-cell stage. Embryos were cultured in mWmp(-) (broken lines) or mWmp(+) (solid lines). Values represent the average of five experiments \pm SEM.

第二章

マウス初期胚におけるM期誘導因子の動態

緒言

前章において、AKR胚は胚特有のS期終了後のG2/M期停止をほぼ完全に引き起こすことが確認され、また培地からリン酸を除くことでこれをほぼ完全に解除することが示された。本章では、この実験系を用いて初期胚特有のM期誘導機構を探索することにした。なお、本章以降2細胞期においてG2/M期停止を起こす胚を”G2/M期停止胚”、これを解除する胚を”M期進行胚”と表記する。

現在、全真核生物のM期を誘起する因子として、M期促進因子 (M-phase promoting factor: MPF) の存在が知られている。全ての真核生物において、MPFは触媒活性をもつcdc2キナーゼ (cdc2) と、その活性を調節するサイクリンBの複合体であり[Dunphy et al., 1988, Gautier et al., 1988]、cdc2は細胞周期を通して量的な変動はなく、その活性はサイクリンBとの結合、およびリン酸化によって制御されている。体細胞において、MPFが活性化される機序は以下の通りである。まずS期より合成が開始されるサイクリンBがcdc2に結合した後、cdc2の14位のスレオニン (T14)、15位のチロシン (Y15)、および161位のスレオニン (T161) がリン酸化され、G2/M期にかけて蓄積されていく [Solomon et al., 1990; Norbury et al., 1991; Coleman and Dunphy, 1994]。このT14およびY15のリン酸化型cdc2は活性を持たず、この状態はpre-MPFと呼ばれる。S期が終了すると、cdc25ホスファターゼ (cdc25) によりT14およびY15の脱リン酸化が起こり [Hoffman et al., 1993; Honda et al., 1993]、cdc2は活性化し、これが有糸分裂を起こす引き金となる (Appendix 1)。

体細胞におけるG2/M期停止は、DNA合成阻害、あるいはDNA損傷によりS期が完了しない場合にみられるG2/M期チェックポイント機構においてである。この場合の機序は、Chkと呼ばれる遺伝子産物がそれを感じて、cdc25活性を負に制御する結果、cdc2はpre-MPFの状態のまま活性化されず、細胞はM期に進行できないというものである[Furnari et al., 1997; Sanchez et al., 1997; Peng et al., 1997]。G2/M期停止胚では、S期が終了しているにも関わらずG2/M期で停止していることが第一章で示唆されたので、この機序とは異なる可能性もある。さらに、この一般的なM期誘導機構自体が当てはまらない可能性もある。G2/M期停止胚とM期進行胚において、MPFが活性化しているのか、サイクリンBの合成は起こっているのか、cdc2のリン酸化はどのようになっているのかといった疑問をまず解決する必要がある。

*In vivo*におけるMPFの基質は核酸タンパクであるラミン [Ottaviano and Gerace, 1985; Suprynowicz and Gerace, 1986]を始め、種々の候補があるが[Hisanaga et al., 1991; Moreno and Nurse, 1990]、いまだに確定したものは少ない。一方、*in vitro*でのMPF活性測定には、一般に基質としてヒストンH1が用いられ[Labbe et al., 1989; Draetta et al., 1989; Naito and Toyoda, 1991]、一定時間におけるこのリン酸化の程度により活性を推定することができる。また、ウエスタンブロッティング解析によりcdc2のリン酸化状態を知ることができる。すなわち、cdc2は34kD付近に3本のバンドとして検出され[Choi et al., 1991; Aoki et al., 1992; Naito et al., 1995]、このうち一番移動度の遅いバンドはサイクリンB結合型で、T14、Y15、およびT161がリン酸化された不活性型のpre-MPFの状態を示し、一方、一番移動度の速いバンドはT14および

Y15が脱リン酸化された活性型のものを含むことが示されている[Choi et al., 1991; Aoki et al., 1992; Naito et al., 1995]。よって、バンドの移動度の違いから脱リン酸化型とリン酸化型を識別することができる。G2/M期停止胚、およびM期進行胚におけるMPFの活性化、リン酸化状態については、この方法によって既にAokiら[1992]によって報告されている。それによると、M期に進行した胚ではMPFが活性化され、M期に進行しない胚ではMPFはリン酸化された状態で不活性のまま蓄積されていることが示されている。この結果は、体細胞におけるG2/M期ブロックのリン酸化状態と同様である。Aokiらは2-cell blockを示すddY系マウス胚と、2-cell blockを示さないB6C3F1マウス胚とを比較し、2-cell blockが起こるメカニズムを探ろうとしたわけであるが、系統差を考慮した場合、これらの比較は同一系統内で行われることが望ましいと思われる。本章では、まず彼らの結果をAKRという単一系統胚を用いて追試することから出発した。

cdc2の脱リン酸化を引き起こすcdc25においては、現在3種(cdc25A, cdc25B, cdc25C)のホモログが存在することが知られている[Miller and Russell, 1992; Nagata et al., 1991; Galaktionov and Beach, 1991]。このうちcdc25AはG1/S期の進行に作用し[Jinno et al., 1994; Hoffman et al., 1994]、cdc25Bおよびcdc25CがG2/M期で活性化される[Hoffman et al., 1993; Honda et al., 1993; Nishijima et al., 1997]。近年、体細胞のG2/M期においては、cdc25Bがcdc2活性の引き金を引き、わずかなMPF活性を起こすと、これがcdc25Cをリン酸化して活性化するというポジティブフィードバックにより急激なMPFの活性化が起こり、細胞がM期に進行することが明らかとなった[Nishijima et al., 1997]。こ

のことから、M期制御因子としては、cdc25Bを調べるのが重要であると考えられる。そこで本章では、cdc25Bの存在と、さらに活性化状態についても検討を行った。以上の結果からマウス胚のM期制御機構が、体細胞と異なるのではないかという可能性について考察した。

材料および方法

体外受精、および胚の体外培養は第1章に準じた。媒精時間を0時間とし、各Fig.に示した時間に卵子を採取した。それ以外の条件は、それぞれの結果の項で述べることにする。

(1) ヒストンH1キナーゼ活性測定

ヒストンH1キナーゼ活性測定は、Arakiら[1996]の方法に従った。各ステージの卵10個を、抽出バッファー (15mM EGTA, 60mM sodium β -glycerophosphate, 30mM *p*-nitrophenylphosphate, 25mM 3-[*N*-morpholino] propanesulfonic acid (Mops), 15mM MgCl₂, 0.2mM Na₃VO₄, 2 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml pepstatin, 1mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), and 50 μ M *p*-aminobenzoic acid) 2 μ lに加え、全てのサンプルが揃うまで-80°Cで保存した。融解後、それぞれのサンプルに1mM dithiothreitol (DTT) 0.5 μ l, 1% Nonidet P-40 0.5 μ l, 0.5 μ M cAMP-dependent protein kinase inhibitor (PKI) 2.5 μ lを加えて凍結融解を3回行った。cdc2キナーゼの基質として0.1mM ヒストンH1 (type III-S; SIGMA)を2.5 μ l加え、0.1mM [γ -³²P] ATP (0.4mCi/ml; ICN) 5 μ lを加えることによって反応を開始した。反応温度は30°C、時間は20分とした。20%トリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid; TCA) 0.4ml、および1% BSA 0.1ml を加えて反応を停止し、15,000 rpmで5分間遠心した後上清を除去した。さらに沈殿を20% TCAで3回洗浄し、1N水酸化ナトリウムを0.2ml加えて沈殿を完全に溶解してから、シ

ンチレーションカクテル (ACS II; Amersham) 1mlを加えた。比活性は液体シンチレーションカウンター (LCS-1000; Aloka) で測定した。バックグラウンドとして、卵の存在しないサンプルを同時に測定し、それぞれの数値から差し引いた。

(2) ウエスタンブロッティング

各ステージごとの卵をPVP-mWM (mWM培地 (Table 1-1) のBSAの代わりにポリビニルピロリドン (PVP) を1mg/ml添加) で3回洗浄後、卵抽出バッファー (50mM Tris-HCl (pH 7.2), 10mM MgCl₂, 1μg/ml aprotinin, 10μg/ml leupeptin, 1μg/ml pepstatin, 1mM PMSF, 1% NP-40) 5μlに加えた。卵子数はそれぞれ、25個 (cdc2)、50個 (cdc25B) とした。さらに、2倍濃度のSDSサンプルバッファー (60mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 0.025% BPB, 5% 2-mercaptoethanol) 5μlを加え100°Cで3分間煮沸後、全てのサンプルが揃うまで-80°Cで保存した。SDS-PAGEはLaemmli [1970]らの方法に従った。10%ポリアクリルアミドゲルで泳動後、タンパク質をニトロセルロース膜 (Millipore, Pore size 0.45μm, Bedford MA) に転写し、5%スキムミルクを含むTBS-Tween (0.1%) で4°C一晩ブロッッキングした。一次抗体として、cdc2の検出には抗PSTAIRモノクローナル抗体[Yamashita et. al., 1991]を、cdc25Bの検出には抗cdc25Bポリクローナル抗体 (C-20; Santa Cruze) を用いた。cdc25Bの吸収試験には、抗cdc25B抗体とそれに対する特異的ペプチドを4°Cで2時間反応させたものを一次抗体として用いた。一次抗体はTBS-Tに希釈し、4°Cで一晩反応させた。抗PSTAIR抗体の検出にはビオチン化抗マウスIgG (Amersham)、抗cdc25B抗体の検出にはビオチ

ン化抗ラビットIgG (SIGMA) 用い、続いてストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ複合体 (SIGMA) を反応させた。発色基質としてBCIP/NBT (SIGMA) を用いた。

(3) cdc25BおよびサイクリンB mRNAの定量

cdc25BおよびサイクリンBのmRNAは、RT-PCR法で定量した[Yokoi et al., 1993]。

(1) RNAの抽出：各ステージ30個の卵をRNA抽出バッファー (ISOGEN; ニッポンジーン) 0.3ml中に集め、キャリアーとしてPOLY C (Pharmacia) 30 μ g、ウサギ α グロビンmRNA (GIBCO BRL) 20pgを加えた。これに直ちに75 μ lのクロロホルムを加えて激しく混和した。室温で10分間静置した後、15,000 rpmで20分間遠心し、上清よりエタノール沈殿法にてmRNAを回収し、全てのサンプルが揃うまで-20°Cで保存した。また、本実験の定量性を検討するため、マウス未受精卵子をそれぞれ120個、30個、5個に調整したサンプルを用意した。

(2) 逆転写反応：RNAの沈殿に0.5 μ g/ μ lのオリゴ (dT) プライマー (pd(T)12-18; Pharmacia) 1 μ lを加え、DEPC (diethyl pyrocarbonate; SIGMA) 処理した蒸留水 (DEPC-DW) で9 μ lに調整した。70°Cで10分間変性後、逆転写反応バッファー (250mM Tris-HCl (pH 8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl₂) 4 μ l、0.1M DTT 2 μ l、2.5mM dNTP ミックス (TaKaRa) 4 μ lを加え、逆転写酵素 (SUPERScript II; GIBCO BRL) 1 μ lを加えて50分間反応させた。その後90°C、5分間の処理で反応を停止し、2UのRNase H (TaKaRa) 1 μ lを加え、37°Cで20分間RNAを分解し

た。これをcDNAサンプルとして、 -20°C で保存した。

(3) PCR: PCR反応溶液の組成は、cDNAサンプル $2\mu\text{l}$ にPCR用バッファー ($10\times$ Ex Taq buffer; TaKaRa) $20\mu\text{l}$ 、 200mM dNTPミックス (TaKaRa) $16\mu\text{l}$ 、各 $50\mu\text{M}$ プライマー $2\mu\text{l}$ (Table 2-1)、Ex Taq (TaKaRa) $2\mu\text{l}$ を加え、DWで $200\mu\text{l}$ とした。これの $12\mu\text{l}$ を 0.6ml のPCR用チューブ (QSP, cat #445, USA) に分注し、ミネラルオイル (SIGMA) を重層してPCR反応を行った (Thermal Sequencer TSR-300; IWAKI)。PCR反応条件は、 94°C で30秒間変性後、 94°C (40秒) $\rightarrow 60^{\circ}\text{C}$ (40秒) $\rightarrow 72^{\circ}\text{C}$ (60秒) とし、サイクリンBと α グロビンは27サイクル、cdc25Bは33サイクルとした。検量線を作成する場合は、10サイクルおよび15-45サイクルまで2サイクルごとに反応液をサンプリングした。

(4) PCR産物の定量: PCR反応の終了した各サンプル $8\mu\text{l}$ に 0.25% BPB, 1mM EDTA, 15% フィコールの混合液 $2\mu\text{l}$ を加え、 2% アガロースゲル (NuSieve3:1 Agarose; FMC) で電気泳動した。エチジウムブロマイド染色後、UVトランスイルミネーター上で写真撮影した。写真はスキャナ (GT-9000; EPSON) で取り込みを行った後、NIHイメージソフトにより各々のバンドのシグナルを数値化した。コントロールとして用いたウサギ α グロビンのRT-PCR結果をもとに補正を行い、未受精卵に存在するmRNA量を100とし、それに対する相対値として各ステージのmRNAを定量した。

(4) オキサダ酸 (OA) 処理

媒精後42時間培養したG2/M期停止胚を、終濃度が $2.5\mu\text{M}$ となるようにオ

カダ酸 (Wako) を直接培地に添加して3時間培養した。オカダ酸処理後、ヒストンH1キナーゼ活性測定、およびcdc2、cdc25Bのウエスタンブロットティングを行った。また、ヘキスト染色により、染色体像の変化を観察した。

(5) ヘキスト染色

オカダ酸処理後、核相の変化を観察するためヘキスト (Hoechst-33342; Calbiochem-Novabiochem) 染色を行った。ヘキストはPBS溶液中に1.0mg/ml濃度で調整し、これを終濃度1.0 μ g/mlとなるように直接培地に添加して30分間インキュベートした。その後、卵を3回洗浄し、2.5%グルタルアルデヒド添加PBSで30分間固定後、スライドガラス上にマウントし、蛍光顕微鏡下で染色体像を観察した。

結果

(1) ヒストンH1キナーゼ活性

MCH胚、AKRのG2/M期停止胚、およびAKRのM期進行胚の初期卵割におけるヒストンH1キナーゼ活性をそれぞれFig. 2-1B、Fig. 2-2B、およびFig. 2-2Dに示した。0hは媒精前の未受精卵を用い、媒精後は各Fig.の最上段に矢印で示した通り、それぞれ1、2、4細胞期のもののみを採取した。その結果、未受精卵(0h)では高いヒストンH1キナーゼ活性が認められた。受精後H1キナーゼ活性は急激に低下し、その後第一卵割直前まで基底値を維持した。第1卵割期(MCH: 14h, AKR: 20h)には一過性の有意な上昇を示したが、2細胞期に進行したものでは、その後再び基底値まで低下した。そして、MCH胚およびM期進行胚はともに第一細胞周期と同じ活性パターンを示し、第2卵割期(MCH: 40h, AKR: 46h)に一過性の有意な上昇を示した。一方、G2/M期停止胚の2細胞期におけるH1キナーゼ活性は、受精後50時間経過しても認められず、基底値のままであった。

(2) cdc2のリン酸化状態

MCH胚、AKRのG2/M期停止胚、およびAKRのM期進行胚の初期卵割におけるcdc2のウエスタンブロットの結果を、それぞれFig. 2-1A、Fig. 2-2A、およびFig. 2-2Cに示した。サンプルの採取条件は上記同様である。抗PSTAIRモノクローナル抗体により、cdc2は分子量34kD付近に3本のバンドとして検出された。それぞれ移動度の違い順にUバンド、Mバンド、Lバンドと呼ぶことにする。MCH胚とG2/M期停止胚の1細胞期

におけるcdc2のリン酸化状態の変化は同様であった。未受精卵(0h)でLバンドのシグナルが強く検出され、cdc2はT14およびY15脱リン酸化型であることが示された。受精後、第一卵割期にかけてLバンドのシグナルは弱くなっていく一方、Uバンドのシグナルが経時的に強く認められ、第一卵割期(MCH: 16h, AKR: 22h)に再びLバンドのシグナルが強く検出された。MCH胚およびM期進行胚の第二細胞周期におけるcdc2のバンドパターンは、第一細胞周期と同様に变化した。すなわち、第一卵割後、経時的にUバンドのシグナルが強くなり、第二卵割期(MCH胚: 42h, AKR胚: 48h)にはT14およびY15脱リン酸化型が増加した。一方、G2/M期停止胚は、第二細胞周期においてcdc2の経時的なリン酸化、および蓄積は認められたが、受精後56時間経過してもcdc2キナーゼのUバンドのシグナルは変化しなかった。ウエスタンブロッティングによるcdc2のリン酸化状態と、ヒストンH1キナーゼ活性の変化は連動しており、cdc2が脱リン酸化型を示す時期にヒストンH1キナーゼは活性化を示した。

(3) cdc25BおよびサイクリンB mRNAの量的変動

Fig. 2-3Aは、RT-PCR法によるmRNAの定量を行うためのサイクル数を決定するため、サイクル数とPCR産物量の関係を示したものである。その結果、サイクリンBと α グロビンは23-30、cdc25Bは27-36サイクル間でサイクル数に対しほぼ直線的な増加が見られたので、サイクリンBと α グロビンについては27サイクル、cdc25Bについては33サイクルと決定した。サイクリンB (Fig. 2-3B)、cdc25B (Fig. 2-3C) および α グロビンについて、未受精卵5、30、120卵をサンプルとしてPCRを行い、各サ

ンプル間のmRNA量とPCR産物が比例するかを調べた。なお、 α グロビンは全てのサンプルに等量加えてある。その結果、サイクリンBとcdc25Bに関しては、このサイクル数において卵子数に比例することが示された。未受精卵から得られたmRNA量を100%として、1細胞期および2細胞期におけるサイクリンB (Fig. 2-4) とcdc25B (Fig. 2-5) のmRNAを比較した結果、初期胚発生過程を通して、どちらも1細胞期のG2/M期(18h)で発現量が高い傾向を示し、その後2細胞期後期での発現量は、相対的に低かった。G2/M期停止胚とM期誘導胚を比較すると、サイクリンBおよびcdc25BのmRNA量は33hにおいてG2/M期停止胚の方が有意に低いことが示されたものの、それ以外は有意差は認められなかった。

(4) cdc25Bの検出

まず未受精卵50個をサンプルに用い、抗cdc25B抗体によりウエスタンブロットティングを行ったところ、分子量68kD付近にバンドが確認された (Fig. 2-6A)。このバンドは抗体に対する特異的なペプチドで吸収試験を行った結果消失した。M期進行胚 (mWmp(-))、およびG2/M期停止胚 (mWmp(+)) を比較したとき、細胞周期を通して同レベルのcdc25Bが存在することが明らかとなった (Fig. 2-6B)。バンドは単一であり、cdc2に見られるような時期の相違による移動度の変化は見られなかった。

(5) オキサダ酸処理によるH1キナーゼ活性、cdc2、cdc25B、および核相の変化

媒精後42時間のG2/M期停止胚は、前記の結果同様低いヒストンH1キナ

一ゼ活性を持ち、cdc2はUバンドが濃かった。オカダ酸処理せずに3時間培養しても何も変化は起こらなかったが、オカダ酸で3時間処理することで、ヒストンH1キナーゼ活性の有意な上昇が認められた。さらに、cdc2のLバンドのシグナルが強く検出され、脱リン酸化型に変化したことが示された。一方、cdc25Bはオカダ酸処理によるバンドの変化は認められなかった (Fig. 2-7)。Fig. 2-8は、G2/M期停止胚のオカダ酸処理前、および処理後の核相の状態を示したものである。オカダ酸処理前は核膜が存在し、染色体の存在は認められなかったが、オカダ酸処理により核膜の崩壊、および染色体の凝集が確認された。

考察

本章では、初期胚に特異的なM期誘導機構を探るため、MPFを中心に検索を行った。MPFは全真核生物に普遍的に存在し、この活性上昇がM期開始を誘導し、活性低下がM期脱出の引き金となることが知られている[Solomon et al., 1990; Norbury et al., 1991; Coleman and Dunphy, 1994]。本章ではまず、初期胚の卵割過程においてこの点を確認した。その結果、分裂期に相当する時期に高く、分裂間期に低い活性が得られ、一般的に考えられているMPFの作用を裏付ける結果であった。さらにG2/M期停止胚では、低活性が維持されておりMPFが活性化しなかったことは、胚特異的なS期終了後のG2/M期停止胚においてもその細胞周期はMPF制御下におかれていることを示唆している。これまでに哺乳類卵において受精後に急激にMPF活性が低下することはマウス[Choi et al., 1991; Aoki et al., 1992]、ウシ[Collas et al., 1993]、ブタ[Kikuchi et al., 1995]で示されているが、卵割期の活性上昇が示されている報告は極めて少なく、マウスのみである[Choi et al., 1991; Aoki et al., 1992]。今回の結果はこれを支持するものである。

体細胞同様、マウス胚においてもM期にはMPF活性が起こっていることが示されたが、その活性化機構はいかなるものであろうか。Aokiら[1992]はこの点に関し、体細胞と同様にG2/M期にむけてpre-MPFが蓄積し、脱リン酸化により活性化すること、またG2/M期停止胚では脱リン酸化が起こらないことを示したが、本研究においてもAKR胚を用いてこの点を追試した。その結果、卵割後徐々にT14、Y15リン酸化型cdc2が蓄積されていることが認められた。一般にcdc2はサイクリンBに結合した

後、T14、Y15がリン酸化されることが知られている[Solomon et al., 1990; Norbury et al., 1991; Coleman and Dunphy, 1994]。これを初期胚に当てはめて考えるとすれば、これは同時にサイクリンBの合成を意味している。G2/M期停止胚でも、T14およびY15リン酸化型cdc2が増加したことは、M期進行胚同様、G2/M期停止胚においてもサイクリンBが合成され、pre-MPFが蓄積されていることを示唆している。この結果はAokiら[1992]の報告を確認するものであり、初期胚のM期誘導機構が体細胞の機構と異なる可能性を支持するものではなかった。この一般的な説をさらに当てはめて考えれば、G2/M期停止胚ではサイクリンBは合成されており、pre-MPFの蓄積は認められるが、それを脱リン酸化するcdc25B活性がないため、G2/M期で発生を停止していると考えられる。

そこで次に、この考え方をAKR胚に当てはめてよいかどうか検討するために、G2/M期停止胚において実際にサイクリンBおよびcdc25Bの合成が起こっているかをmRNAレベルで調べることにした。その結果、どちらのmRNAも細胞周期を通じてM期進行胚とほぼ同レベルのmRNAが存在していることが示された。サイクリンmRNAの量に関しては、マウス胚においてRT-PCRによる報告があり[Yokoi et al., 1993]、それによれば後期2細胞期胚では未受精卵の約20%に減少することが示されている。今回の結果はこれとよく一致しており、M期進行胚でサイクリンBが合成されていることを支持する結果である。一方、G2/M期停止胚のサイクリンB mRNA量についてはこれまで報告がなく、今回が初めてである。G2/M期停止胚でもサイクリンB mRNA量はほぼM期進行胚と同様であった。この結果は前段の結果と同様、G2/M期停止胚においてもサイクリンBは合成されていることを示唆している。

cdc25mRNAに関し、マウス胚を用いたRT-PCRにより、未受精卵から2細胞期胚まで差がないとする報告と[Yokoi et al., 1993]、in situ ハイブリダイゼーション法により、2細胞期で一度減少した後4細胞期で増加する[Wickramasinghe et al., 1995]とする2つの報告がある。今回の結果は後者を支持するものであった。G2/M期停止胚については、cdc25B mRNAの測定も今回が初めてであるが、M期進行胚とG2/M期停止胚でほぼ差がなかったことは、G2/M期停止胚でもcdc25Bが産生されていることを示唆している。ところで、33hにおいてサイクリンBおよびcdc25BのmRNAレベルはG2/M期停止胚がM期進行胚にくらべて低いことが示された。この時期は2細胞期のS期終了時であり、培地中のリン酸がG2/M期停止に有効な時期の終了と一致しており (Fig. 1-1) 興味深い。サイクリンBとcdc25BのmRNAの両者に同様の結果が見られたことから、この時期mRNAの種類には非特異的に転写活性全般がリン酸によって抑制され、何らかの機序により結果的にG2/M期停止を引き起こす原因となっている可能性もある。しかし、その後の45hおよび56hにおいてサイクリンBとcdc25BのmRNAは、G2/M期停止胚とM期進行胚に差が見られなかったこと、および以下で考察するごとくタンパク質量にも差がないと考えられることから、少なくともサイクリンBやcdc25Bの量の減少が、直接的にこれらが関与する機構を介してG2/M期停止を起こしているとは考えにくい。

次にcdc25Bをタンパク質レベルで調べることにした。その結果、G2/M期停止胚、およびM期進行胚において同レベルのcdc25Bが存在していることが確認できた。従って、G2/M期停止胚においてcdc25B活性がないとしても、それはcdc25Bタンパク質が存在しないためでなく、活

性化されないためと推察される。cdc25がリン酸化されて活性化されると、ウエスタンブロッティング解析により、バンドがシフトアップすることが認められている[Kumagai and Dunphy, 1992; Izumi et al., 1992; Hoffman et al., 1993]。しかしながら、本実験ではリン酸化型（バンドのシフトアップ）はM期進行胚においても検出されなかった。これは、初期胚の卵割過程ではcdc25B以外のホスファターゼがcdc2を脱リン酸化し活性化していることを示すのかも知れない。すなわち、M期誘導に際しcdc25Bを活性化する機構は抑制されており、代わりに初期胚特異的なcdc2ホスファターゼが発現されていると考えることもできる。そうであるならば、極めて初期胚特異的な制御機構を捉えることができる。しかしながら、これは用いた抗体の性質によるものである可能性も否定できない。つまり、今回用いた抗体がリン酸化型のcdc25Bを検出できないことも考えられるのである。現在のところ、cdc25Bの活性化型がみられなかったのは抗体に原因がある可能性が高いと考えているが、この点については今後さらに検討する必要がある。

cdc25Bのリン酸化（活性化）を負に制御している因子としてプロテインホスファターゼタイプ1（PP1）、およびタイプ2A（pp2A）が示唆されており、オカダ酸はこのpp1およびpp2Aを特異的に阻害することでcdc25Bの活性化を誘導することが知られている[Kumagai and Dunphy, 1992; Izumi et al., 1992]。そこで、G2/M期停止胚をオカダ酸処理することでcdc2キナーゼが活性化されるかどうかを調べることにした。その結果、cdc25Bのバンドのシフトアップは観察されなかったが、cdc2は脱リン酸化され、ヒストンH1キナーゼ活性は有意に上昇し、さらに染色体の凝集も認められた。これらの現象は、オカダ酸により何らかのcdc2ホス

ファクターゼ、おそらくはcdc25Bの活性化が誘導され、cdc2の活性化を引き起こした結果と考えられる。本実験結果は、少なくともG2/M期停止胚でサイクリンBが合成され、pre-MPFが蓄積されていたこと、さらにはG2/M期停止胚もMPF活性化によりM期に誘導されることを明確に示している。なお、オキサゲ酸は細胞骨格系も阻害してしまうため、分裂は起こらないことが知られている[Rime and Ozone, 1990; Gavin et al., 1991]。

以上、本章では、リン酸によって発生が制御できるAKR胚を用いて、S期終了後のG2/M期停止胚とM期進行胚の違いを比較することで、体細胞と異なったマウス初期胚特有のM期誘導機構を探ることを目的とした。本実験の結果は、G2/M期停止胚もMPF活性の支配下であり、この活性化さえ起こせばM期に誘導されること、サイクリンB合成は起こっているが、cdc2はリン酸化により抑制されており脱リン酸化が起こらないこと、cdc2を活性化するcdc25Bは存在していることを示している。本章の結果からは体細胞とマウス初期胚の間にM期誘導機構の相違を示すことはできなかったが、初期胚特異的なcdc2ホスファターゼが存在する可能性も完全には否定できない。

要約

マウス初期胚の卵割過程において、体細胞のM期誘導機構が、マウス初期胚にも同様に採用されているかどうかを調べる目的で、本章ではMPFの活性化機序に焦点をあてて実験を進めた。G2/M期停止胚では、リン酸化型cdc2 (pre-MPF) は蓄積されていることが確認された。これは間期にサイクリンBが合成されていることを示唆しており、サイクリンB mRNAが存在していたことから支持される。しかしながら、cdc2の脱リン酸化は認められず、ヒストンH1キナーゼ活性も低値を維持したままであった。一方、M期進行胚では、体細胞と同様に間期におけるサイクリンBの合成とリン酸化型cdc2 (pre-MPF) の蓄積が起こり、G2/M期にヒストンH1キナーゼの活性化、およびcdc2の脱リン酸化が確認された。cdc2の脱リン酸化はcdc25Bによって引き起こされることが知られているため、これについて調べたところ、mRNAおよびタンパク量はG2/M期停止胚とM期進行胚ともに、同レベルで存在していた。G2/M期停止胚ではcdc25Bの活性化が起こっていないためにcdc2の脱リン酸化が誘導されないことが示唆されたため、次にオキサダ酸でG2/M期停止胚を処理したところ、ヒストンH1キナーゼ活性の有意な上昇とcdc2の脱リン酸化、さらに染色体の凝集が認められた。これらの現象は、cdc25Bが活性化されG2/M期停止胚がM期に誘導されたことを示唆するものであり、G2/M期停止胚もMPF活性の支配下にあり、この活性化さえ起こせばM期に誘導されることが明らかとなった。よって、マウス初期胚におけるM期誘導機構は、調べた限りにおいては体細胞と同じであり、初期胚特異的な点は見出されなかった。

图表



The first part of the text is very faint and illegible. It appears to be a paragraph of text, possibly describing the data shown in the graph above. The text is too light to transcribe accurately.

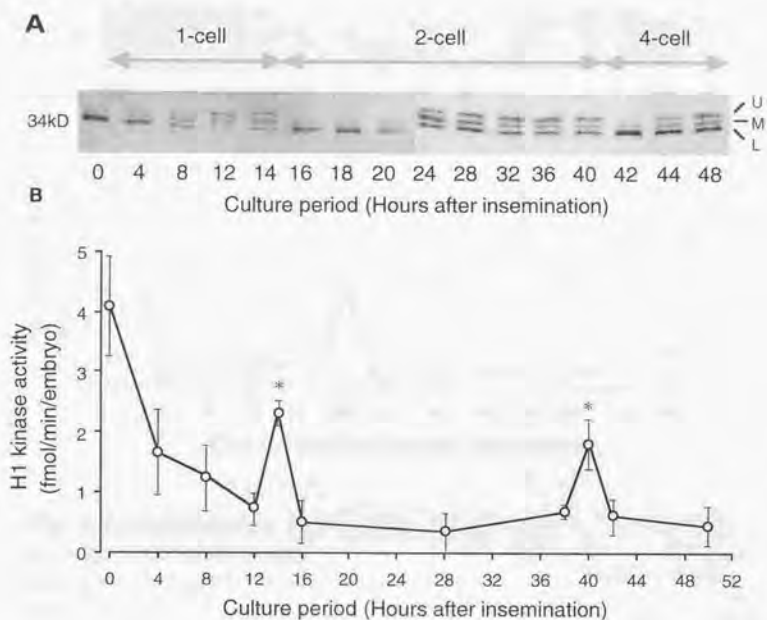


Fig. 2-1. Changes in the phosphorylation state of *cdc2* kinase and histone H1 kinase activity in MCH embryos. The embryos at the indicated stage (top) were collected at the indicated hours after insemination. **A:** Lysates of 25 embryos were subjected to immunoblotting with anti-PSTAIR antibody. **B:** Lysates of 10 embryos were subjected to the histone H1 kinase assay. The enzyme activity is indicated by the number of molecules of $^{32}\text{PO}_4$ incorporated into the histone H1/min per embryo. Vertical bars represent the \pm SEM of three or four experiments. * Significantly higher than the preceding data point.

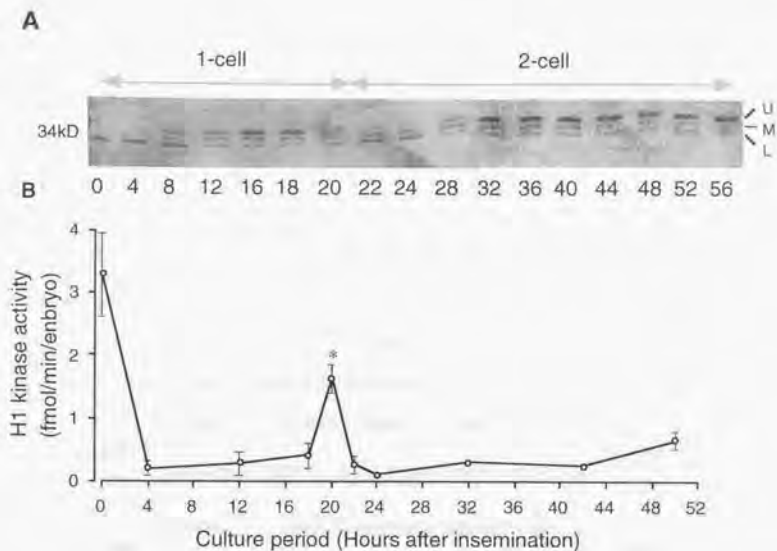


Fig. 2-2. Changes in the phosphorylation state of *cdc2* kinase and histone H1 kinase activity in AKR/N embryos cultured in mWmp(+) (A, B) and in mWmp(-) (C, D). The embryos at the indicated stage (each top) were collected at the indicated hours after insemination. A, C: Lysates of 25 embryos were subjected to immunoblotting with anti-PSTAIR antibody. B, D: Lysates of 10 embryos were subjected to the histone H1 kinase assay. The enzyme activity is indicated by the number of molecules of $^{32}\text{PO}_4$ incorporated into the histone H1/min per embryo. Vertical bars represent the \pm SEM of three or four experiments. * Significantly higher than the preceding data point.

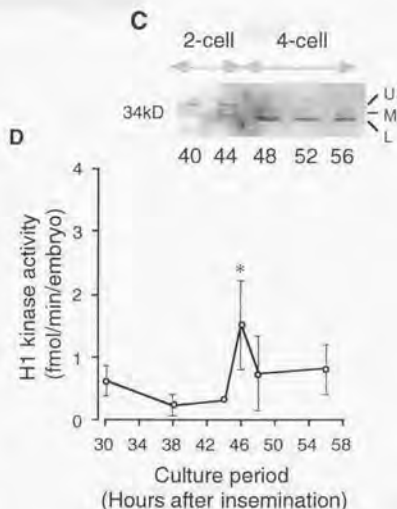


Table 2-1. Primers used for RT-PCR

Primer	Sequence	Fragment size (bp)
α -globin	(sense) 5'-GCAGCCACGGTGGCGAGTAT-3'	257
	(antisense) 5'-GTGGGACAGGAGCTTGAAT-3'	
cdc25B	(sense) 5'-AGGCTGCAAGACCAGTGATG-3'	609
	(antisense) 5'-CCAGGCCTAACGAGTAAGTG-3'	
cyclin B	(sense) 5'-AGAGCAGTCAGTTAGACC-3'	567
	(antisense) 5'-CTGTAGGATAGGTAGTGC-3'	

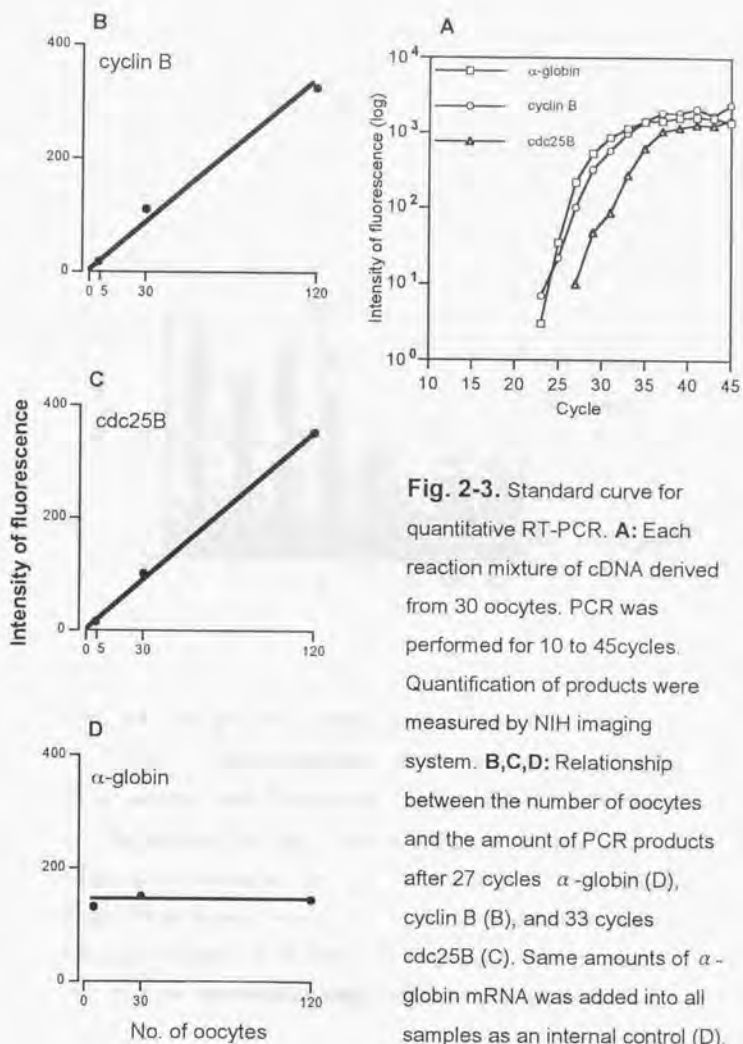


Fig. 2-3. Standard curve for quantitative RT-PCR. **A:** Each reaction mixture of cDNA derived from 30 oocytes. PCR was performed for 10 to 45 cycles. Quantification of products were measured by NIH imaging system. **B,C,D:** Relationship between the number of oocytes and the amount of PCR products after 27 cycles α -globin (D), cyclin B (B), and 33 cycles cdc25B (C). Same amounts of α -globin mRNA was added into all samples as an internal control (D).

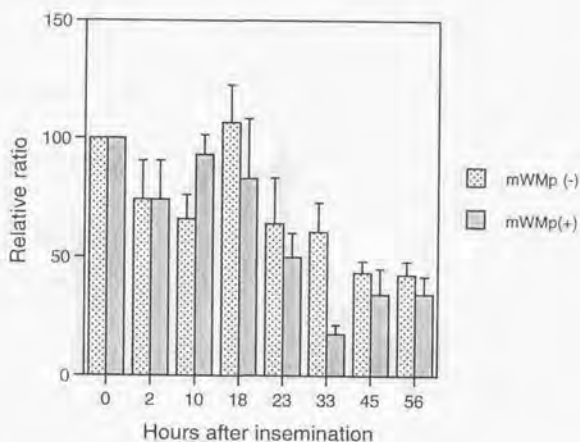


Fig. 2-4. Changes in the relative levels of cyclin B mRNA in AKR/N mouse embryos cultured in mWmp(-) or mWmp(+). For each developmental stage, the amount of cyclin B mRNA was modulated in order to adjust the rabbit α -globin mRNA, which was initially added as an internal standard, to the same level. The value of each stage was expressed as relative ratio to the value for the oocyte (0h). Quantification of mRNAs were measured by NIH imaging system. Data are shown as mean +SEM of three experiments.

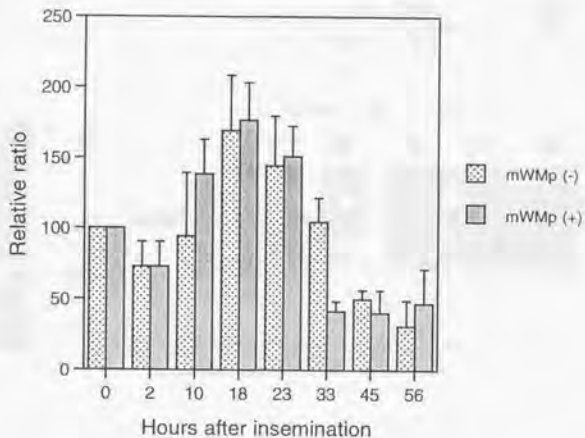


Fig. 2-5. Changes in the relative levels of *cdc25B* mRNA in AKR/N mouse embryos cultured in mWmp(-) or mWmp(+). For each developmental stage, the amount of *cdc25B* mRNA was modulated in order to adjust the rabbit α -globin mRNA, which was initially added as an internal standard, to the same level. The value of each stage was expressed as relative ratio to the value for the oocyte (0h). Quantification of mRNAs were measured by NIH imaging system. Data are shown as mean \pm SEM of three experiments.

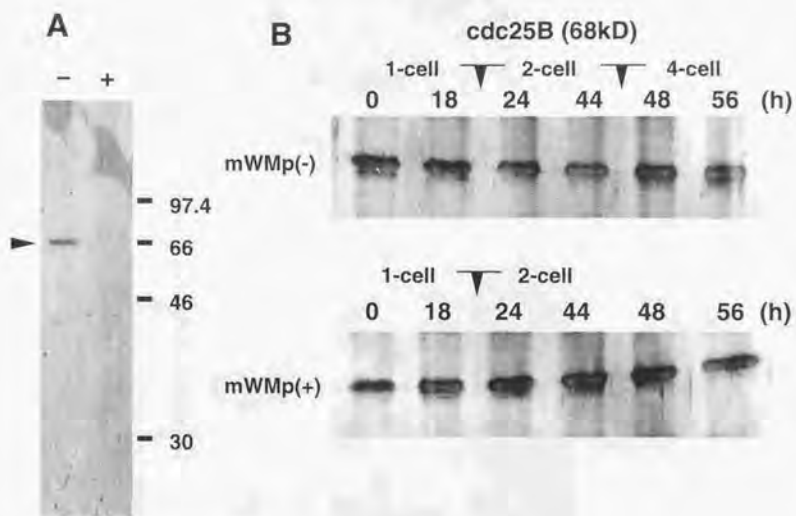


Fig. 2-6. Western blot showing the presence of *cdc25B* protein in AKR/N embryos. **A:** Preincubation of anti-*cdc25B* antibody with (+) or without (-) specific peptide. Lysate of 50 embryos were subjected to immunoblotting with anti-*cdc25B* antibody. The band of *cdc25B* (68kD) is denoted by arrow head. Molecular mass are given on the right the panel in kilodaltons. **B:** Fifty eggs at the indicated stages were collected at the indicated hours after insemination and subjected to immunoblotting with anti-*cdc25B* antibody.

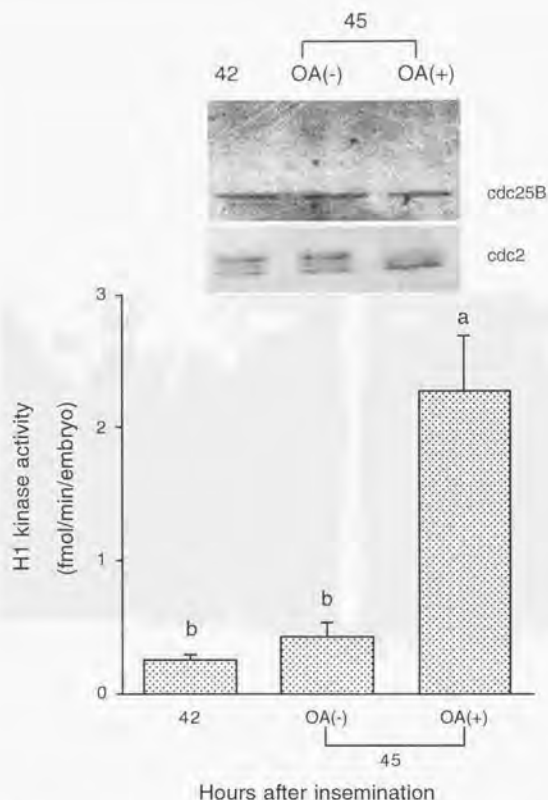


Fig. 2-7. Effects of OA on AKR/N embryos arrested in the 2-cell stage.

The embryos were incubated with (OA (+)) or without (OA (-)) 2.5 μ M OA in mWMP(+) from 42 to 45h after insemination. Upper panel: Lysate of the embryos were subjected to immunoblotting with anti-cdc25B antibody or anti-PSTAIR antibody. Lower panel: Lysate of the embryos were subjected to the histone H1 kinase assay. Activation is indicated by the number of molecules of 32 P O_4 incorporated into the histone H1/min per embryo. Vertical bars represent the +SEM of three or four experiments. ^{a, b} Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

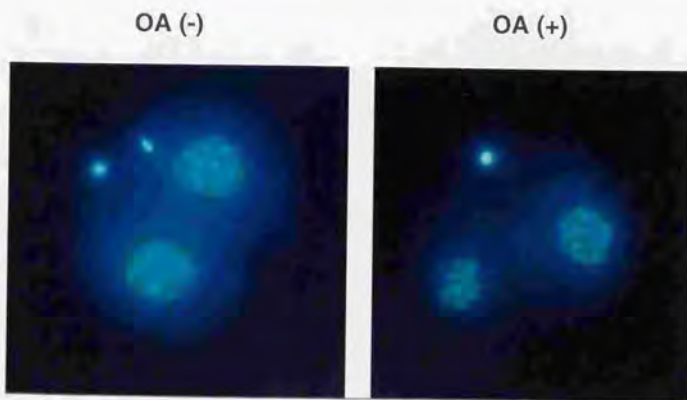


Fig. 2-8. Induction of nuclear membrane breakdown and chromosome condensation in mWMP(+) AKR/N embryos by OA treatment. Embryos were incubated with (OA(+)) or without (OA(-)) 2.5 μ M OA in mWMP(+) from 42 to 45h after insemination.

第三章

マウス初期胚における mitogenシグナル伝達系の動態

緒言

本章では、初期胚特異的な細胞周期制御機構の探索の焦点を、体細胞で認められているmitogenにより活性化される系の各因子にあてることにした。体細胞の培養系では、細胞周期の進行にmitogenが必須であるが、マウス初期胚では、外因性のmitogenが存在しなくても正常発生が可能であり、そこには何らかの相違点が存在する可能性が考えられるからである。

静止期(G0期)にある哺乳類培養細胞にインスリン、EGF、PDGFなどのmitogenを添加すると、増殖因子受容体のチロシンキナーゼの活性化に引き続いて、mitogen activated protein kinase (MAPK) が活性化することが知られている[Boulton and Cobb, 1991; Gotoh et al., 1990; Hoshi et al., 1988; Morrison et al., 1989; Ray and Sturgill, 1987]。MAPKの活性化には "MAPキナーゼカスケード" と呼ばれるras依存性のシグナルカスケード、すなわち、ras→raf-1→MAPKキナーゼ(MAPKK)→MAPKが存在しており[Cobb et al., 1991; Nishida and Gotoh, 1993]、細胞増殖における中心的情報伝達経路と考えられている(Appendix 2)。なお、哺乳類のMAPKKには、45kDのMEK1と47kDのMEK2の2つのアイソフォームが存在することが近年明らかとなった[Otsu et al., 1993]。また、MAPKにも、44kDのERK1, 42kDのERK2が存在することが知られている[Gotoh et al., 1990]。

哺乳動物では、このrasからERKに至るシグナルカスケードの活性化機構は、一般に以下のように考えられている。Rasは、分子量約21kDのGTP結合タンパクで、mitogen刺激によりGDP結合型の不活性型から、

GTP結合型の活性型に変化する[Downward et al., 1990; Satoh et al., 1990]。活性型rasは、その標的タンパク質であるraf-1を間接的に活性化するか[Avruch et al., 1994; Daum et al., 1994; Dickson et al., 1992; Vojtek et al., 1993]、この過程はまだ完全には解明されていない。近年、ras→raf-1の活性化機構には、14-3-3に依存した膜移行が関与していることが報告されている[Fu et al., 1994; Irie et al., 1994; Fantl et al., 1994]。すなわち、raf-1のN端側にはrasおよび14-3-3との結合部位が存在し[Freed et al., 1994; Morrison, 1994]、不活性型raf-1は14-3-3と複合体を形成している。Rasが活性化するとraf-1は14-3-3依存的に膜に移行し、活性型rasに結合する。そこでリン酸化により活性化されると14-3-3と解離するというものである[Freed et al., 1994]。

活性化されたraf-1はC端側に存在するMEK結合部位を介して、MEKの2つのセリン残基をリン酸化することによってこれを活性化させる[Alessi et al., 1994; Zheng and Guan, 1994]。MEKは、セリン/スレオニン/チロシンキナーゼであり[Kosako et al., 1993]、活性化されたMEKは、その下流に位置するERKのスレオニンとチロシンの両アミノ酸残基(TEY配列領域)をリン酸化して活性化する[Payne et al., 1991; Seger et al., 1992]。以上がMPAKカスケード活性化の一般的理解であると考えている。

Raf-1[Fabian et al., 1993; Muslin et al., 1993; Verlhac et al., 1996]、MEK[Alessandrini et al., 1996]およびERK[Araki et al., 1996; Inoue et al., 1995]の活性型はウエスタンブロットティングによるバンドのシフトアップで知ることができる。また*in vitro*においては、MAPK活性をミエリン塩基性タンパク質(myelin basic protein; MBP)を基質とし

て用いることにより測定できることが知られている[Erickson et al., 1990]。現在までのところ、MEKの基質となり得るタンパク質はERK以外見つかっていない。したがって、MEKはERKのTEY配列を認識しリン酸化する非常に基質特異性の高いキナーゼであり[Kosako et al., 1992; Matsuda et al., 1992]、MEKとERKは常に、同時に活性化し、機能していると考えられている。

このように、体細胞におけるmitogen由来のシグナルカスケード機構は、かなり詳しく分子レベルで解明されてきているが、マウス初期胚におけるこれらの機構はおろか、その存在すら分かっていないのが現状である。マウス胚では細胞周期の進行にmitogenが必要ないということは、この系がconstitutiveに活性化しているのか、内因性のmitogenによって活性化されるのか、あるいは逆にこの系が活性化する必要がないのかといった可能性が考えられる。しかしながら近年になって、ERKはマウス初期胚（2細胞期前期まで）においては活性化されないという報告がなされた[Kalab et al., 1996]。それでは、ERKの上流に位置している因子は存在していないのであろうか、あるいは存在すると仮定したら、それらも同様に活性化されないということなのであろうか。

本実験では、これらの知見をもとに、MAPKカスケードを構成している各因子について、まずそれらの存在を明らかにすることを試みた。さらにG2/M期停止胚とM期進行胚において、量的変化の有無および活性化状態に変化が認められるのかを調べ、マウス初期胚に特異的な細胞周期制御機構を探ることを目指した。

材料および方法

体外受精、および胚の体外培養は第1章に準じた。媒精時間を0時間とし、各Fig.に示した時間に卵子を採取した。それ以外の条件は、それぞれの結果の項で述べることにする。

(1) ウエスタンブロッティング

サンプルは第二章に準じて調整した。卵子数はそれぞれ、200個

(ras)、50個(14-3-3、raf-1、MEK、ERK)とした。ポリアクリルアミドゲルの組成として、分離ゲルは375mM Tris-HCl (pH 8.8)、0.1% SDS、10%アクリルアミド、0.04%ビスアクリルアミド、0.025%過硫酸アンモニウム、0.2%TEMEDに調整した。濃縮ゲルは125mM Tris-HCl (pH6.8)、0.1% SDS、3%アクリルアミド、0.13%ビスアクリルアミド、0.025%過硫酸アンモニウム、0.2%TEMEDに調整した。一次抗体は、抗rasモノクローナル抗体(clone 18; Transduction Laboratories)、抗rafモノクローナル抗体(clone 53; Transduction Laboratories)、抗14-3-3βポリクローナル抗体(K-19; Santa Cruze)、抗MAPKKモノクローナル抗体(4A5; MBL)、抗ERKポリクローナル抗体(K-23; Santa Cruze)を使用した。以降の操作は、第二章に準じた。

(2) コルセミド処理

2細胞期胚をM期に同調させるため、体外受精後40-48時間の8時間、終濃度が0.1μg/mlとなるように、コルセミド(KARYOMAX; GIBCO BRL)を

mWMP(-)、およびmWMP(+)培地に添加して培養した。コルセミド処理後の胚は、raf-1、MEK、およびERKのウエスタンブロッティングと、14-3-3の免疫沈降に用いた。

(3) 免疫沈降

コルセミド処理後のM期進行胚200個、および媒精後48時間のG2/M期停止胚200個を1サンプルとした。それぞれのサンプルにRIPAバッファー(140 μ M NaCl, 25 μ M Tris (pH 7.4), 5 μ M EDTA, 0.2% TritonX-100, 2 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml pepstatin, 1 μ g/ml aprotinin, 1mM PMSF, 100mM NaF, 0.2mM Na₃VO₄) 0.5 μ lを加え、凍結融解を5回くり返した。サンプルに抗14-3-3 β ポリクローナル抗体1 μ lを加え、4°Cで1時間反応させた後、同RIPAバッファーで平衡化した50%プロテインGセファロース (Zymed Laboratory) を3 μ lを加え、さらに30分間振盪しながら反応させた。反応後の上清約3 μ lを回収し、直ちに2倍濃度のSDSサンプルバッファー3 μ lを加え、100°Cで3分間煮沸した。セファロースビーズはRIPAバッファーで3回洗浄した後、同じく2倍濃度のSDSサンプルバッファー3 μ lを加え、100°Cで3分間煮沸した後、ウエスタンブロッティングを行った。一次抗体には抗14-3-3 β ポリクローナル抗体、および抗rafモノクローナル抗体を用いた。

(4) オカダ酸処理

方法は第2章に準じた。オカダ酸処理後の胚は、ras、raf-1、MEK、およびERKのウエスタンブロッティングと、MBPキナーゼ活性の測定に用い

た。

(5) MBPキナーゼ活性の測定

MBPキナーゼ活性の測定法は、第二章におけるヒストンH1キナーゼの場合と同様で、使用する基質が異なるだけである。MBPキナーゼ活性の測定には、基質として MBP (0.022mM) (SIGMA)を使用した。

結果

(1) M期進行胚、およびG2/M期停止胚におけるrasの変化

本抗体はH-ras、N-ras、K-rasの全てに反応するものである。Rasは、分子量21kDとしてM期進行胚、およびG2/M期停止胚の全てのステージで検出され、胚の発生段階の違いによるタンパク質量の明らかな変化は認められなかった。また、M期進行胚、およびG2/M期停止胚に明らかな相違は見られなかった (Fig. 3-1)。

(2) M期進行胚、およびG2/M期停止胚におけるraf-1の変化

Raf-1は、分子量74kDとしてM期進行胚、およびG2/M期停止胚の全てのステージで検出された。胚の発生段階の違いによるタンパク質量の明らかな変化は認められなかった。また、両区の未受精卵 (0h)、および1細胞期のM期 (18h) には明らかなraf-1のバンドの移動度の減少が検出され、また2細胞期のS期 (24h) でもわずかなバンドの移動度の減少がみられた。しかし、2細胞期のM期 (44h) では、バンドの移動度の減少は検出されなかった。一方、コルセミド処理によりM期に同調させた結果、M期進行胚においてのみ活性型が検出された (Fig. 3-2)。

(3) M期進行胚、およびG2/M期停止胚における14-3-3の変化

本抗体は14-3-3ファミリーに属する全ての14-3-3に反応する。14-3-3は分子量30kD付近に2本のバンドとして、M期進行胚、およびG2/M期停止胚の全てのステージで検出され、胚の発生段階の違いによるタンパク質量

の明らかな変化は認められなかった。また、M期進行胚、およびG2/M期停止胚に明らかな相違は見られなかった (Fig. 3-3)。

(4) 抗14-3-3抗体によるraf-1の共沈

Fig. 3-4は、コルセミド処理したM期進行胚、および媒精後44時間のG2/M期停止胚を、抗14-3-3抗体で免疫沈降した結果を示したものである。両区の胚において、シグナルの強度は低かったが不活性型のraf-1と14-3-3が沈殿中に検出された。一方、上清中にはより多量の14-3-3とraf-1が検出され、M期進行胚の上清には活性型のraf-1が検出された。

(5) M期進行胚、およびG2/M期停止胚におけるMEKの変化

本抗体は、MEKの2種のアイソフォームMEK-1 (45kD) とMEK2

(46kD) のうち、MEK-1を特異的に認識する。MEKは分子量45kDのバンドとしてM期進行胚、およびG2/M期停止胚の全てのステージで検出された。胚の発生段階の違いによるタンパク質量の明らかな変化は認められなかった。活性型MEKが検出されたのは、raf-1と同様、未受精卵 (0h) と1細胞期のM期 (18h) であった。また、2細胞期のM期 (44h) では活性型は検出されず、コルセミド処理によりM期に同調させた結果、M期進行胚においてのみ活性型が検出された (Fig. 3-5)。

(6) M期進行胚、およびG2/M期停止胚におけるERKの変化

ERKは、分子量42kDと44kDの2本のバンドとして検出された。M期進行胚、およびG2/M期停止胚の全てのステージで検出され、胚の発生段階の違いによるタンパク質量の明らかな変化は認められなかった。活性型は

未受精卵(0h)においてのみ認められ、1細胞期(18h)、および2細胞期(44h)のM期においては検出されなかった。さらに、M期進行胚をコレミド処理した後も、活性型は検出されなかった(Fig. 3-6)。

(7) M期進行胚、およびG2/M期停止胚におけるMBPキナーゼ活性の変化
未受精卵(0h)では高いMBPキナーゼ活性が認められた。G2/M期停止胚の受精後4時間ではわずかな低下がみられたが、高い活性を維持していた。その後、媒精後12時間では基底値まで低下し、第一卵割直前までこの低い値が維持された。第1卵割期(20h)に再びMBPキナーゼ活性は一過性の上昇を示した後、基底値まで低下した。M期進行胚の第2細胞周期では、第2卵割後(48h)に一過性の有意な上昇を示した。一方、G2/M期停止胚の2細胞期におけるMBPキナーゼの活性化は、受精後56時間経過しても認められず、基底値の状態であった(Fig. 3-7)。

(8) オキサゲ酸処理によるras、raf-1、MEK、ERKの動態とMBPキナーゼ活性の変化

Fig. 3-8は、オキサゲ酸処理後の胚をras、raf-1、MEK、およびERKのそれぞれの抗体を用いて、ウエスタンブロッティングを行ったときの結果である。Rasは、コントロール胚(OA(-))と比較し、バンドのシグナル、および移動度に変化は認められなかった。Raf-1は、オキサゲ酸処理後にバンドのシグナルが弱くなることが示された。MEKは、オキサゲ酸処理後に活性型に変化した。ERKは全く変化を示さなかった。一方、MBPキナーゼ活性は、オキサゲ酸処理により有意に上昇することが示された。

考察

本章は、体細においてmitogenにより活性化されるシグナル伝達系、すなわちMAPKカスケードが、マウス初期胚に存在しているかどうかを確認することから始めた。そのためにまず、MAPキナーゼカスケードを構成するras、raf-1、14-3-3、MEK、およびERKのそれぞれの因子について、それらがマウス胚に存在しているかどうかを順を追って調べ、さらに卵割過程においてどのような動態を示しているのかを探った。

まず、rasの存在についてウエスタンブロッティングを行ったところ、G2/M期停止胚およびM期進行胚の全ての胚で同レベルのrasが検出された。体細胞では、rasの分子量は21kDであることが知られているが[Downward et al., 1990; Satoh et al., 1990]、マウス胚におけるrasタンパク質も同じく分子量21kDとして検出された。ウエスタンブロッティングでは、rasの活性化状態を知ることはできないが、少なくともその存在は示された。

そこで次に、raf-1の存在について調べたところ、rasと同じく、全ての胚において同レベルのタンパク質量が検出された。さらに、未受精卵(0h)、および1細胞期のM期(18h)においてバンドのシフトアップが確認された。活性型raf-1は、ウエスタンブロッティングによりバンドがシフトアップすることが知られているため[Fabian et al., 1993; Muslin et al., 1993; Verlhac et al., 1996]、これはAKR胚のこの時期においてraf-1が活性化していることを示唆している。これまで、MAPKカスケードの終点に位置するERKが、哺乳類の未受精卵で活性化していること

は、マウス[Kalab et al., 1996; Verlhac et al., 1994;], ラット[Goetz et al., 1997]、ヤギ[Devieu et al., 1996]、ブタ[Inoue et al., 1995]、ウシ[Fissore et al., 1996; Levesque and Sirard, 1996]で報告されているが、その活性化を引き起こすのはERKの上流に存在するMEKと*c-mos*産物の*mos*であり[Posada et al., 1993; Verlhac et al., 1996]、*raf-1*が働いているとは考えられていない。今回、*raf-1*の活性化が示されたことは、*mos*のみならず、未受精卵でも既にこの系が働いていることを初めて示した点で意義が大きいと思われる。さらに1細胞期のM期にも*raf-1*の活性化が示された。緒言でも述べたとおり、この時期ERKは活性化されないという報告があり[Kalab et al., 1996]、その上流の*raf-1*も活性化するとは考えられていない。従って、この点も未受精卵の結果同様注目に値すると思われる。しかし、2細胞期のM期では当初、*raf-1*の活性型が検出されなかった。2細胞期胚のM期に相当する時期として、本実験では媒精後44時間の胚を用いているが、Fig. 1-3の結果から2細胞期のM期は媒精後44-56時間とかなり幅が認められており、この時期のAKR胚の細胞周期がM期に同調していないため、活性型*raf-1*の濃度が低く検出されない可能性が考えられた。そこで、コルセミド処理により2細胞期胚をM期に同調させた結果、2細胞期のM期進行胚でも同じく活性化状態が検出された。この活性型*raf-1*は、M期に進行していないG2/M期停止胚では検出されないことから、コルセミド処理による非特異的な効果によるものではないことは明らかであり、M期に特異的に活性化されることを示唆している。

Raf-1の活性化機序として、14-3-3タンパクの関与が明らかとなっている[Fu et al., 1994; Irie et al., 1994; Fantl et al., 1994]。14-3-3タンパクは不活性型*raf-1*と結合しており、*raf-1*の活性化に伴い遊離する

[Freed et al., 1994]。このraf-1活性化機構が、マウス胚においても採用されているかどうかを免疫沈降によって調べた結果、抗14-3-3抗体で不活性型raf-1が共沈され、活性型raf-1は上清中に検出された。これはマウス胚におけるraf-1の活性化機序が、体細胞の場合と同様であることを示唆するものである。これが正しいとすれば、raf-1上流のrasの活性化はウエスタンブロッティングでは検出できなかったわけであるが、rasもまたM期に活性化しているものと推察される。

MEKはraf-1の下流に位置しており、raf-1によって活性化される[Alessi et al., 1994; Zheng and Guan, 1994]。Raf-1の活性化がM期で示されたことから、MEKもタンパク質レベルで存在して、そして同様にM期で活性化されているであろうと予測されたが、結果はその通りで、raf-1と全く同じ時期に活性化を示し、さらに当初活性化が検出されなかった2細胞期胚でも、コルセミド処理によりM期進行胚でのみ活性型が検出された。ここまでの結果から、ras→raf-1/14-3-3→MEKというカスケードがマウス初期胚にも存在しており、カスケードの活性化機構は体細胞と同様であることが示唆された。現在、体細胞ではG0期/G1期におけるMAPキナーゼカスケード活性化の重要性に注目が集まっており、盛んに細胞周期の研究が行われている[Boulton and Cobb, 1991; Gotoh et al., 1990; Hoshi et al., 1988; Ray and Sturgill, 1987]。しかしながら、このカスケードが体細胞のM期に活性化されているといった報告はされていない。上述した通り、マウス初期胚のM期にrasからMEKに至る系が活性化しているということを示したのはこれが初めてであるが、このカスケードがM期に活性化されているということを示したのは体細胞を含めても初めてであり、マウス初期胚に存在する特殊な細胞周期制御機構な

のかも知れない。この点は、体細胞をM期に同調させ、このカスケードが活性化されるか否かを調べていく必要がある。

Kalabら[1996]は、マウス胚でERKの活性化状態をウエスタンブロットティングによって調べ、初期胚発生過程（2細胞期まで）は活性化されないことを報告しているが、この点は本実験結果からも支持された。すなわち、2細胞期までERKの活性型は検出されなかったのである。一方、MBPキナーゼ活性を測定した結果、ウエスタンブロットティングの結果とは異なり、第一卵割期、および第二卵割期にも有意な活性化が検出された。未受精卵におけるERKの活性化はウエスタンブロットティングの結果からも示されたため、未受精卵のMBPキナーゼの活性化はERKの活性化を反映し、第一卵割期、および第二卵割期のMBPキナーゼ活性はERK以外の酵素活性を反映していると考えざるを得ない。ここで特筆すべきことは、1細胞期および2細胞期のM期において、MEKが活性化しているにも関わらず、ERKの活性化が認められないということである。つまり、MEKとERKが乖離していることを示している。ERKのチロシンとスレオニンのリン酸化が、MEKによって触媒されることは既に確定しており[Kosako et al., 1992; Matsuda et al., 1992]、また逆に、現在のところMEKの基質となりうるのはERK以外は知られていない。従ってこの現象は、従来報告されている内容と全く異なったものであり、極めて初期胚特異的な制御機構と考えられる。

さて、G2/M期停止胚では、rasからMEKに至る系は活性化されなかった。第二章の結果から、オカダ酸はこの胚を結果的にM期に誘導し得ることが示唆されたので、これらの現象が誘起されるかどうかを調べた結果、MEKのみ活性化されたが、raf-1に関しては活性型はみられず、

その代わりに検出されるタンパク質量が減少した。この結果は、オキサダ酸処理によりタンパク質の分解が誘導されたのか、あるいは構造変化が起こり抗体が結合し得なくなったのか、明らかなことは分らないが、生理的な活性化状態が誘起されなかったことは事実である。従って、オキサダ酸による本実験の解釈は慎重を要する。MEKは、PP2Aで処理すると脱リン酸化され、その活性が失活することが報告されており[Matsuda et al., 1992; Kosako et al., 1992]、オキサダ酸はこのPP2Aを特異的に阻害するため[Kumagai and Dunphy, 1992; Izumi et al., 1992]、その結果MEKの活性化が誘導されたものと考えられる。注目すべき点は、オキサダ酸によりMBPキナーゼ活性も有意に上昇したが、それにも関わらずERKの活性化は引き起こされなかったということである。すなわち、今回のオキサダ酸の実験は生理的なM期を誘起するものではないが、少なくともこの時期、MEKとERKの活性化は乖離しており、ERKとは別のMBPキナーゼが存在することは裏付けられた。

本実験結果から、マウス初期胚に特異的な制御機構として、M期においてMAPKカスケードの活性化が起こるが、MEKとERKは乖離しておりERKは活性化せずに、何らかの別のMAPKが活性化されていることが示唆された。これが何を意味するのか現時点では推測の域を出ないが、考え得る可能性について総括で考察する。

要約

体細胞の細胞周期が回帰するためには、mitogenが必須であるが、初期胚では少なくとも外因性のmitogenは必要ないことから、mitogenによって活性化されるMAPKカスケードについて、それを構成しているras、raf-1、14-3-3、MEK、およびERKの各因子が、マウス初期胚に存在するかどうかを調べた。その結果、全てのタンパク質が、M期進行胚、およびG2/M期停止胚に同じレベルで存在していることが分かった。これらの分子量はいずれも、体細胞で認められている分子量と一致していた。Raf-1は、未受精卵、および1細胞期胚のM期に活性化していることが示された。また、2細胞期胚においてもコルセミド処理によってM期に同調させた結果、活性化を示すことが確認された。14-3-3は不活性型raf-1に結合していることが認められたため、ras→raf-1の活性化機序は、体細胞の場合と同様であると推察された。MEKはraf-1と同様にM期に活性化されることが認められたが、ERKの活性化は初期卵割のM期には認められなかった。一方、MBPキナーゼ活性は初期胚のM期においても検出された。以上より、本章ではMAPキナーゼカスケードを構成する各因子がタンパクレベルで存在すること、マウス初期胚ではM期にMAPKカスケードが活性化していることが明らかとなった。そしてさらに、体細胞と異なった初期胚特異的な制御機構として、M期にMEKが活性化しているにも関わらず、ERKの活性化は認められないことが明らかとなった。すなわち、MEKとERKは乖離していることが示された。また、MBPキナーゼがM期に活性化されていたことから、ERKにかかわる何らかの因子が、MEKによって活性化されている可能性が示唆された。

図表

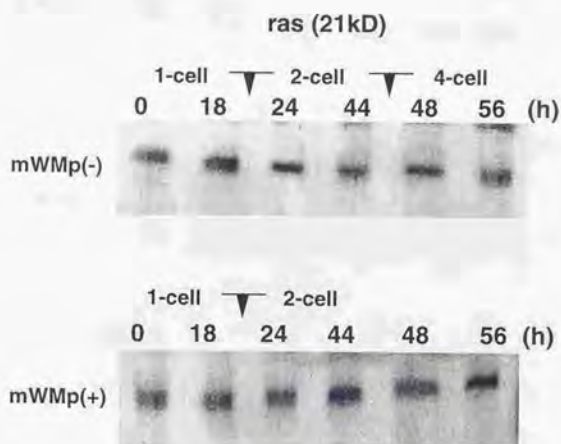


Fig. 3-1. Changes of ras in AKR/N embryos cultured in mWmp(-) or mWmp(+). Ras was detected by immunoblotting at 21kD. Two hundreds eggs at the indicated stages were collected at the indicated hours after insemination, and subjected to immunoblotting with anti-ras monoclonal antibody.

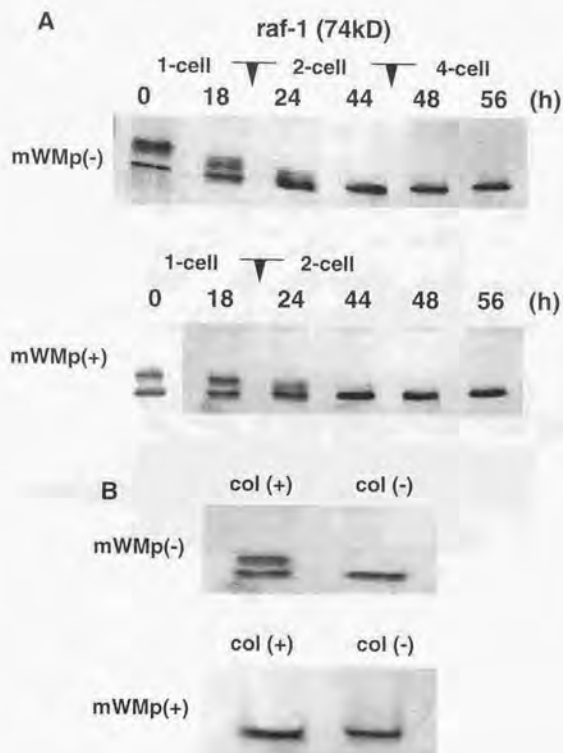


Fig. 3-2. Changes of raf-1 in AKR/N embryos cultured in mWMP(-) or mWMP(+). **A:** Raf-1 was detected by immunoblotting at 74kD. Fifty eggs at the indicated stages were collected at the indicated hours after insemination, and subjected to immunoblotting with anti-raf-1 monoclonal antibody. Decreased electrophoretic mobility was detected markedly at 0h and 18h, and slightly at 24h both mWMP(-) and mWMP(+). **B:** AKR/N embryos were incubated with 0.1 μ g/ml colcemid from 40h to 48h after insemination, and subjected to immunoblotting with anti-raf-1 monoclonal antibody. Decreased electrophoretic mobility was detected only mWMP(-).

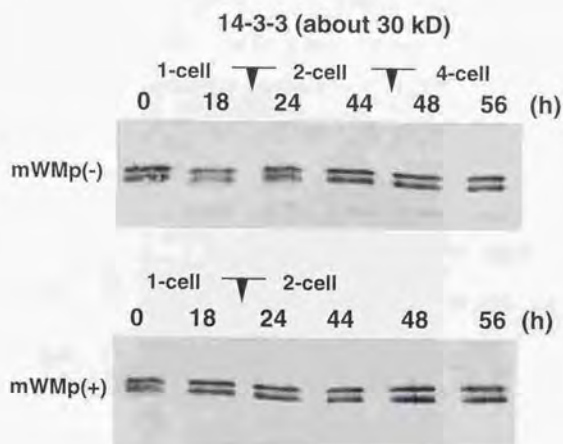


Fig. 3-3. Changes of 14-3-3 in AKR/N embryos cultured in mWmp(-) or mWmp(+). 14-3-3 was detected by immunoblotting around 30kD. Fifty eggs at the indicated stages were collected at the indicated hours after insemination, and subjected to immunoblotting with anti-14-3-3 polyclonal antibody.

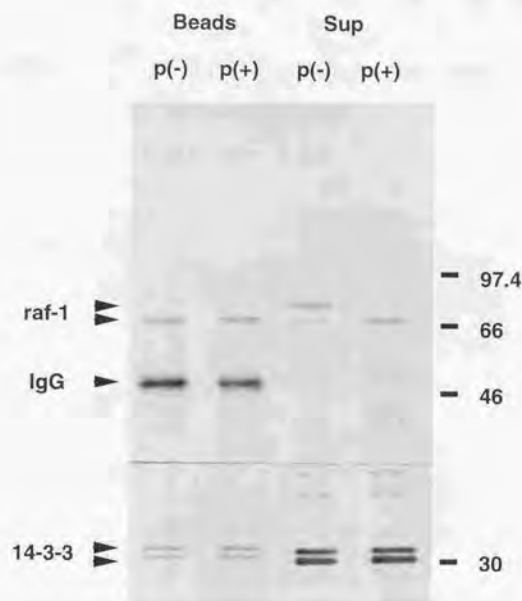


Fig. 3-4. Binding of 14-3-3 to inactivated raf-1. 14-3-3 were immunoprecipitated with anti-14-3-3 polyclonal antibody from embryos cultured in mWMP(-)(p(-)) and mWMP(+)(p(+)). The embryos cultured in mWMP(-) were treated with colcemid for 8h (40-48h). The beads and supernatant (Sup) were subjected to immunoblotting with anti-14-3-3 polyclonal antibody or anti-raf-1 monoclonal antibody. The activated raf-1 was detected in the sup of p(-). Molecular mass are given on the right of the panel in kilodaltons.

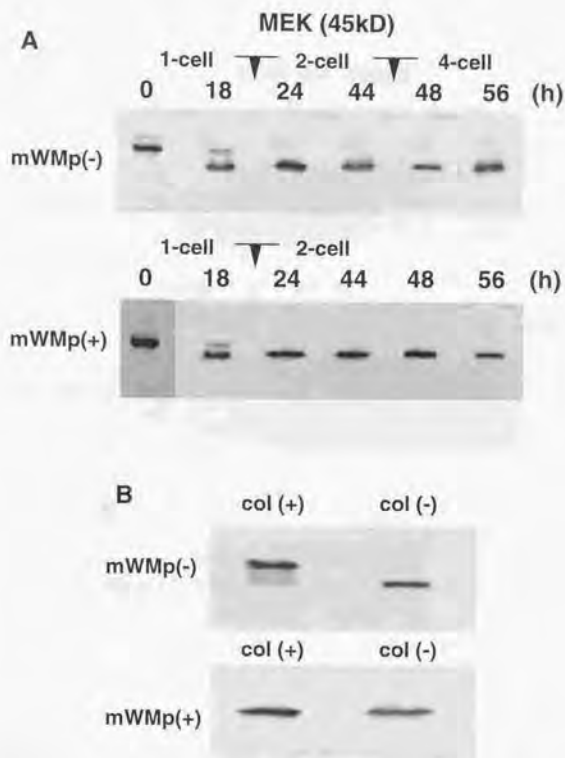


Fig. 3-5. Changes of MEK in AKR/N embryos cultured in mWMP(-) or mWMP(+). **A:** MEK was detected by immunoblotting at 45kD. Fifty eggs at the indicated stages were collected at the indicated hours after insemination, and subjected to immunoblotting with anti-MEK monoclonal antibody. Decreased electrophoretic mobility was detected at 0h and 18h both mWMP(-) and mWMP(+). **B:** AKR/N embryos were incubated with 0.1 μ g/ml colcemid from 40h to 48h after insemination, and subjected to immunoblotting with anti-MEK monoclonal antibody. Decreased electrophoretic mobility was detected only mWMP(-).

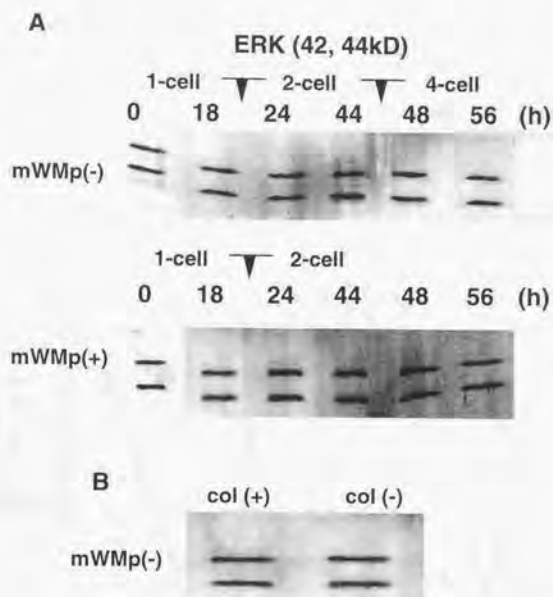


Fig. 3-6. Changes of ERK in AKR/N embryos cultured in mWMP(-) or mWMP(+). **A:** ERK was detected by immunoblotting at 42kD and 44 kD. Fifty eggs at the indicated stages were collected at the indicated hours after insemination, and subjected to immunoblotting with anti-ERK polyclonal antibody. ERK electrophoretic mobility changed at 0h. **B:** AKR/N embryos cultured in mWMP(-) were incubated with 0.1 μ g/ml colcemid from 40h to 48h after insemination, and subjected to immunoblotting with anti-ERK polyclonal antibody. ERK electrophoretic mobility did not change.

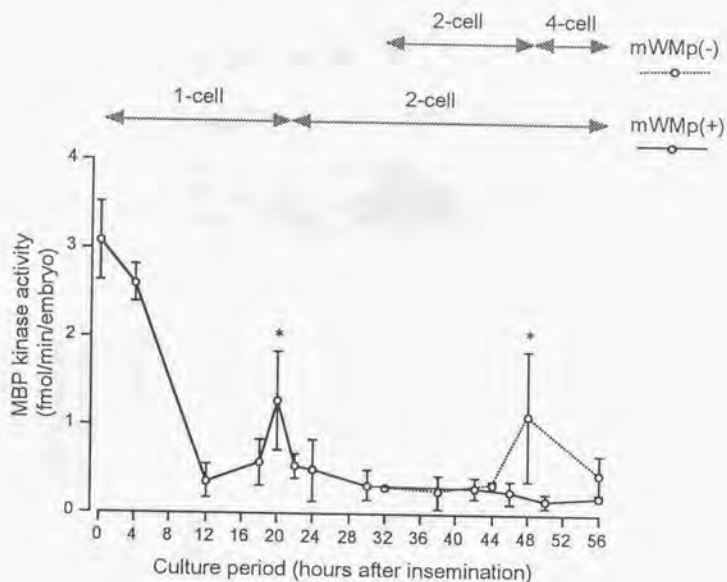


Fig. 3-7. Changes in MBP kinase activities in AKR/N embryos cultured in mWMP(-) or mWMP(+). Each ten embryos at the indicated stage were collected at the indicated hours after insemination. The enzyme activity is indicated by the number of molecules of $^{32}\text{PO}_4$ incorporated into the MBP/min per embryo. Vertical bars represent the \pm SEM of three or four experiments. * Significantly higher than the preceding data point.

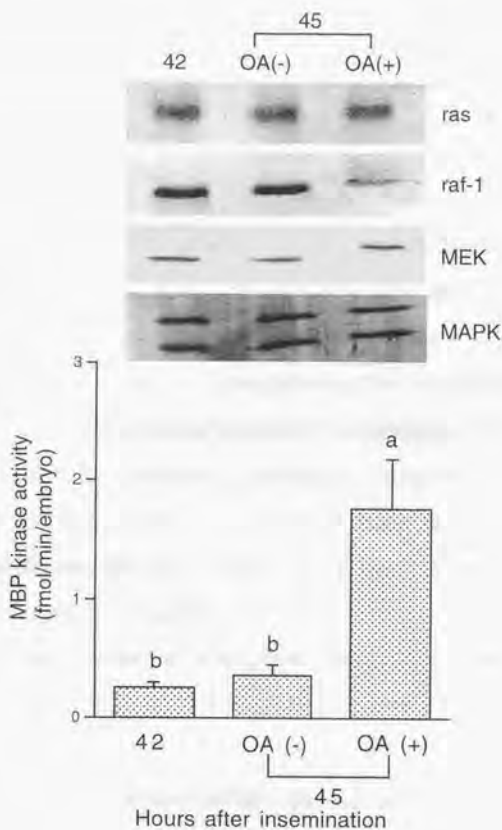


Fig. 3-8. Effects of OA on the phosphorylation state of various proteins and MBP kinase activity in AKR/N embryos arrested in the 2-cell stage. The embryos were incubated with (OA (+)) or without (OA (-)) 2.5 μ M OA in mWMP(+) from 42 to 45h after insemination. Upper panels: Lysate of the embryos were subjected to immunoblotting with each antibodies. Lower panel: Lysate of the embryos were subjected to the MBP kinase assay. Activation is indicated by the number of molecules of $^{32}\text{PO}_4$ incorporated into the MBP/min per embryo. Vertical bars represent the +SEM of three or four experiments. ^{a,b}Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

総括

本研究は、体細胞と異なったいくつかの現象が哺乳類初期胚の卵割過程に存在している事実から、両者の細胞周期制御機構には何らかの相違があるものと考え、初期胚特異的な制御機構を解明しようとしたものである。この目的のためには、初期胚に特異的な現象を示す材料において、細胞周期制御因子の動態を探るのが一つの有効なアプローチと考え、マウス初期胚特異的な現象である2細胞期におけるS期終了後のG2/M期停止、いわゆる"2-cell block"に焦点をあてた。すなわち、これを起こしている胚と、これを解除しM期に進行した胚を比較すれば初期胚特異的な細胞周期の停止、進行を制御する機構が見つかるのではないかと期待し実験を開始した。

まずこの様な胚を得るための実験系の確立を行った。その結果、ほぼ完全に2-cell blockを起こすAKR系マウス胚[Toyoda et al., 1992]の培養系からリン酸を除去することで高率にこれを解除できること、またAKR胚の2-cell blockはS期終了後のG2/M期停止であること、これを解除しM期に進行した胚は正常発生をすることが示された。以上よりAKR胚を用いた本培養系では、本研究を行う上で十分均一な"G2/M期停止胚"と"M期進行胚"を容易に得ることができ、非常に優れた実験系になるものと考えられた。

そこで本実験系を用い、細胞周期制御因子の一つでM期誘導機構の中心的役割を果たすことが知られているMPF、及びその活性化因子であるcdc25Bの動態を探った。MPFは酵素活性を持つcdc2と、その活性を制御するサイクリンBの複合体であり[Dunphy et al., 1988, Gautier et

al., 1988]、一般にその活性化にはサイクリンBの合成によるpre-MPFの蓄積と[Solomon et al., 1990; Norbury et al., 1991; Coleman and Dunphy, 1994]、cdc25によるpre-MPFの脱リン酸化が必要であることが知られている[Hoffman et al., 1993; Honda et al., 1993; Nishijima et al., 1997]。その結果G2/M期停止胚では、MPFは低活性が維持されること、サイクリンBは合成されるが脱リン酸化は起こらずpre-MPFが蓄積していること、cdc25BはmRNA、蛋白質レベルで存在するか活性化されないことが示唆された。この結果は、体細胞のG2/M期チェックポイント機構が働いて停止している状態と同様であった。人為的にMPFを活性化した場合、G2/M期停止胚もM期に進行し得ることから、この胚も体細胞同様MPFの制御下にあることが分かった。またM期進行胚のMPF活性化機構にも、調べた限りでは明らかな体細胞との相違はなかった。

体細胞では細胞周期の進行にmitogenが必須であるが、初期胚では少なくとも外因性のmitogenは必要ないことから、次にmitogenで活性化されるMAPKカスケード[Cobb et al., 1991; Hattori et al., 1992]の各因子、ras、raf-1、14-3-3、MEKおよびERKの存在と動態について探った。その結果、全ての因子がG2/M期停止胚とM期進行胚に同量存在すること、rasからMEKに至る系は体細胞と同様であるが、M期進行胚でのみ活性化されていること、さらにMEKが活性化されたにも関わらずERKの活性化が起こらないことが示された。MAPKカスケードが初期胚のM期に活性化されるという報告は無く新知見であるが、これが初期胚特異的かどうかは体細胞で確認する必要がある。一方、MEKの基質特異性は非常に高く[Kosako et al., 1992; Matsuda et al., 1992]、現在までMEKの基質となる蛋白質として知られているのはERKのみであり、逆にERKのチロ

シンとスレオニンの両残基をリン酸化できるキナーゼはMEK以外は見つかっていない。MEKが活性化してERKが活性化しないという例は、現在まで一つとして報告されていない。従ってこの点は、初期胚特異的な制御機構と考えられ興味深い。

マウス初期胚は、外因性のmitogenが無いにも関わらず、なぜMAPKカスケードが活性化し得るのであろうか。これまでの報告で種々のmitogenを培地に添加することで発生率が改善されることが示されている。例えばCD-1マウスの2-cell blockは、TGF β ファミリーであるアクチビン培地に添加することで解除される[Lu et al., 1990]。またマウス初期胚にアクチビンレセプターが発現していることも明らかとなっている[Lu et al., 1993]。さらにマウス初期胚に種々の成長因子とそのレセプターmRNAが発現していることも示されている[Harvey et al., 1991; Doherty et al., 1994; Rapolee et al., 1992]。そしてこれらの知見から、オートクライン/パラクラインによる胚自身のmitogen産生が、胚発生を刺激しているのではないかということも考えられている[Adamson, 1993; Schultz and Heyner, 1993]。本実験で明らかとなったマウス初期胚のM期におけるMAPKカスケードの活性化も、オートクライン/パラクラインによる胚自身の刺激によるのかもしれない。

未受精卵ではMEKはERKを活性化するのに対し、受精後の初期胚ではERKが存在するにもかかわらず、MEKはERK以外の別のMAPKを活性化していることが示唆された。つまりMEKの活性は保持したままで基質特異性が変化したことになり、これを説明する最も簡単な仮説はERKよりMEKとの親和性が高い別のMAPKが合成されたと考えることである。受精刺激によって蛋白質合成パターンが変化することはよく知られ

ている[Van, 1979; Endo et al., 1986; Howlett and Bolton, 1985]。受精後に新たに合成される蛋白質の1つにこのzygotic MAPKとでも呼ぶべき新しいMAPKがあり、ERKを阻害すると同時に自らMAPKとして活性を発揮すると考えれば、1種類の蛋白質を想定するだけで上記の現象は説明がつく。ERKは活性化すると細胞質から核内に移行することが知られている[Fukuda et al., 1997]。すなわち、MEKのN末端にはロイシン残基に富む核外シグナル(nuclear export signal; NES)が存在しているため、その活性化状態に関わらず常に細胞質中に存在する[Fukuda et al., 1996]。これに対しERKは、不活性型ではMEKと常に結合しているが、C末側のキナーゼドメインによりERKが活性化(リン酸化)されると、MEKと遊離し核内へ移行する[Fukuda et al., 1997]。仮にzygotic MAPKの仮説を正しいとして考察すれば、この酵素は活性化してもMEKからは遊離せず、結合したまま細胞質に留まるものでなければならない。さもないと遊離したMEKがERKを活性化してしまうことになる。従ってzygotic MAPKとERKの基質特異性は異なり、核内の基質はリン酸化できず、細胞質に存在する基質のみをリン酸化すると想像される。

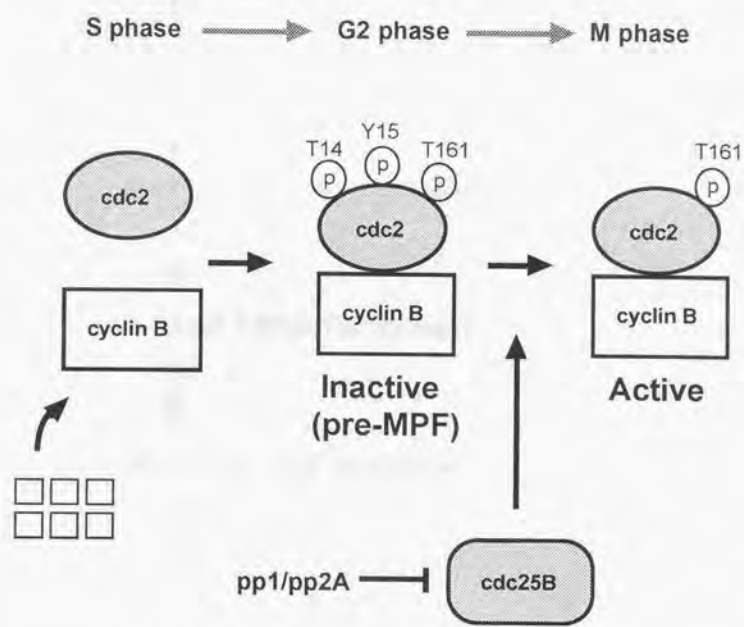
それではなぜ、初期胚ではERKの活性化を抑制する必要があるのであろうか。卵成熟過程ではERKが活性化していることは哺乳動物ではマウス[Kalab et al., 1995; Verlhac et al., 1994;], ラット[Goetz et al., 1997]、ブタ[Inoue et al., 1995]、ヤギ[Debieu et al., 1996]、ウシ[Fissore et al., 1996; Levesque and Sirard, 1996]で報告がある。卵成熟過程ではERKの上流に存在するのはraf-1ではなくmosであると考えられている[Posada et al., 1993; Nebreda and Hunt, 1993]。Mosの作用としては、DNA合成を抑制し、M期が2回の連続することを可能にすること、

および第2減数分裂中期で減数分裂を停止させるcytostatic factor(CSF)活性を持ち、単為発生が起こるのを防ぐことなどが示されている[Sagata et al., 1989; Posada et al., 1993; Araki et al., 1996]。これらの作用は、ERKを介していることが示されている[Sagata et al., 1989; Posada et al., 1993; Araki et al., 1996]。仮に卵割過程でM期にERK活性が上昇すると発生は分裂中期で止まってしまうことになる。現在、*in vivo*におけるERKの基質が何であるか完全には確定していないが、細胞骨格系に関与するものや、転写因子を活性化するものなどが報告されている[Sanchez and Dynlacht, 1996; Bartek et al., 1996]。おそらく前段で仮定した通り、zygotic MAPKはERKと基質特異性が異なっており、活性が上昇しても細胞周期を分裂中期で止める作用はないものと推察される。それではもし、MEKの活性がzygotic MAPKで抑制しきれないほど過剰に活性化した場合はどうなるのであろうか。*Xenopus*においては過剰の活性化型MEK、あるいはmosのmRNAを卵割中の割球に注入した場合は分裂が中期で止まってしまうことが報告されている[Sagata et al., 1989]。すなわち卵割過程において、例えば細胞骨格系に関与する部分の作用は残したままCSF活性を持たないようなMAPKが必要であり、そのためERKではなく、わざわざ別のMAPKを用意したと考えることもできる。

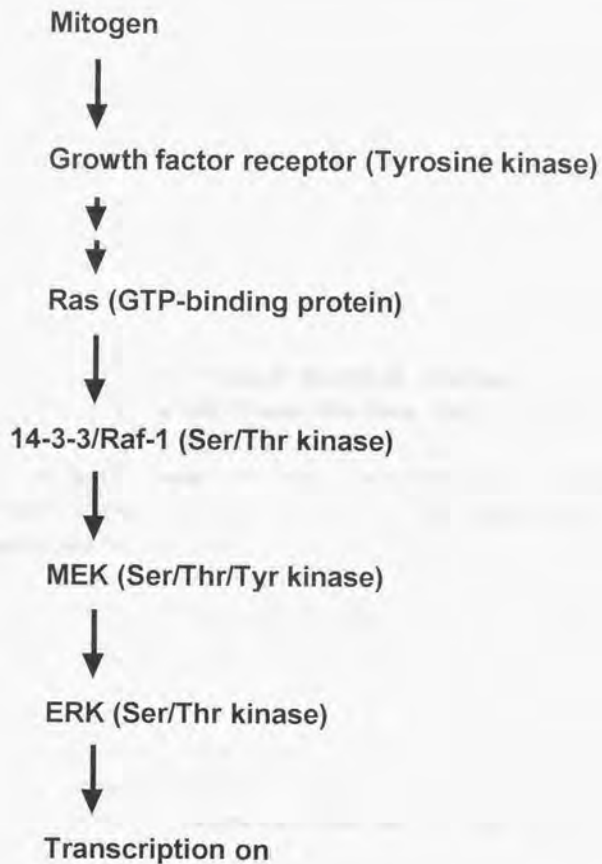
体細胞では、細胞周期の進行にmitogenが必須であるが、その報告の多くはG0期の細胞をG1期に誘導する系を用いている[Gotoh and Nishida, 1996; Carpenter and Cohen, 1990; Heldin CH, 1992]。ERKが細胞周期を回帰している細胞の、いつ、どのように活性化して、何をしているのか具体的な報告は見あたらない。仮に、ERKが細胞をG1期に誘導するような活性を持つとすれば、卵割過程でERKが活性化しないことが

実質的にG1期を欠く、初期胚特異的な細胞周期制御機構を解く一つの手がかりになるかも知れない。

以上、本実験で得られた初期胚特異的な細胞周期制御機構の意味についてかなり大胆な仮説も含めて考察を行った。本研究は、初期胚においてMEKとERKの乖離していることを示すことができた点で非常に興味深いものである。さらに、初期胚のM期にMAPKカスケードが活性化していることも明確に示すことができた。今後これらの現象をさらに研究していくことにより、初期胚特異的な卵割の制御機構の全容が解明されるものと期待される。



Appendix 1.
Mechanism of MPF activation



Appendix 2.
MAP kinase cascade in somatic cell

参考文献

- Abramczuk J, Solter D, Koprowski A. The beneficial effect of EDTA on development of preimplantation mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Dev Biol* 1977; 61: 378-383.
- Adamson ED. Activity of growth factors in preimplantation embryos. *J Cell Biol* 1993; 53: 280-287.
- Alessandrini A, Greulich H, Huang W, Erickson RL. Mek1 phosphorylation site mutants activate raf-1 in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 31612-31618.
- Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ, Cowley S. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74^{src}. *EMBO J* 1994; 13: 1610-1619.
- Aoki F, Choi T, Mori M, Yamashita M, Nagahama Y, Kohmoto K. A deficiency in the mechanism for p34^{cdc2} protein kinase activation in mouse embryos arrested at 2-cell stage. *Dev Biol* 1992; 154: 66-72.
- Araki K, Naito K, Haraguchi S, Suzuki R, Yokoyama M, Inoue M, Aizawa S, Toyoda Y, Sato E. Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: Activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biol Reprod* 1996; 55: 1315-1324.
- Avruch J, Zhang XF, Kyriakis JM. Raf meets ras: completing the framework of a signal transduction pathway.
- Bartek J, Bartkova J, Lukas J. The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin in Cell Biol* 1996; 8: 805-814.
- Bolton VN, Oades PJ, Johnson MH. The relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo. *J Embryol Exp Morphol*

1984; 79: 139-63

Boulton TG, Cobb MH. Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul* 1991; 2: 357-371.

Camouse S, Heyman Y, Meziou W, Menezo Y. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J Reprod Fertil* 1984; 72: 479-485.

Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1990; 265: 7709-7712.

Choi T, Aoki F, Mori M, Yamashita M, Nagahama Y, Kohmoto K. Activation of p34^{cdc2} protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. *Development* 1991; 113: 789-795.

Cobb MH, Robbins DJ, Boulton TG. ERKs, extracellular signal-regulated MAP-2 kinases. *Curr Opin Cell Biol* 1991; 3: 1025-1032.

Coleman TR and Dunphy WG. Cdc2 regulatory factors. *Current Opin Cell Biol* 1994; 6: 877-882.

Collas P, Sullivan EJ, Barnes FL. Histone H1 kinase activity in bovine oocytes following calcium stimulation. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 224-231.

Crabtree HG. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J* 1929; 23: 536-545.

Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries HW, Troppmair J, Rapp UR. The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 474-480.

Davis DL, Day BN. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs in vitro. *J Anim Sci* 1978; 46: 1043-1053.

- Davis DL. Culture and strage of pig embryos. *J Reprod Fertil* 1985; 33: 115-124.
- Devieu T, Gall L, Crzet N, Sevellec C, Ruffini S. Mitogen-activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and acquisition of meiotic competence. *Mol Reprod Dev* 1996; 45: 351-358.
- Dickson B, Sprenger F, Morrison D, Hafen E. Raf functions downstream of Ras1 in the Sevenless signal transduction pathway. *Nature* 1992, 360: 600-603.
- Doherty AS, Temeles GL, Schultz RM. Temporal pattern of IGF-I expression during mouse preimplantation embryogenesis. *Mol Reprod Dev* 1994; 37: 21-26.
- Downward J, Graves JD, Warne PH, Rayter S, Cantrell DA. Stimulation of p21^{ras} upon T-cell activation. *Nature* 1990; 346: 719-723.
- Draetta G, Luca F, Westendorf J, Brizuela L, Ruderman J, Beach D. Cdc protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell* 1989; 56: 829-838.
- Draetta G. Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanisms of cdc2 activation. *Trends Biochem Sci* 1990; 15: 378-383.
- Dunphy WG, Brizuela L, Beach D, Newport J. The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 1988; 54: 423-431.
- Ellwart J, Dormer P. Effect of 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FdUrd) on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd) incorporation into DNA measured with a monoclonal BrdUrd antibody and by the BrdUrd/Hoechst quenching effect. *Cytometry* 1985; 6: 513-520.
- Endo Y, Kopf GS, schultz RM. Stage-specific changes in protein phosphorylation accompanying meiotic maturation of mouse oocytes and fertilization of mouse eggs, *J Exp Zool* 1986; 239: 401-409.

Erickson AK, Payne DM, Martino PA, Rossomand AJ, Shabanowitz J, Weber MJ, Hunt DF, Sturgill TW. Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase. 1990; *J Biol Chem* 265: 19728-19735.

Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 1983; 33: 389-396.

Fabian JR, Morrison DK, Daar IO. Requirement for raf and MAP kinase function during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *J Cell Biol* 1993; 122: 645-652.

Fantl WJ, Muslin AJ, Kikuchi A, Martin JA, MacNicol AM, Gross RW, Williams LT. Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins. *Nature* 1994; 371: 612-614.

Fissore RA, Jackson KV, Kiessling AA. Mouse zygote development in culture medium without protein in the presence of ethylenediaminetetraacetic acid. *Biol Reprod* 1989; 41: 835-841.

Fissore RA, He CL, Woude GFV. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod* 1996; 55: 1261-1270.

Freed E, Symons M, Macdonald SG, McCormick F, Ruggieri R. Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase raf and effects on its activation. *Science* 1994; 265: 1713-1716.

Fu H, Xia K, Pallas DC, Cui C, Conroy K, Narsimhan RP, Mamon H, Collier RJ, Roberts TM. Interaction of the protein kinase raf-1 with 14-3-3 proteins. *Science* 1994; 266: 126-129.

Fukuda M, Gotoh Y, Nishida E. Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH₂-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J Biol Chem* 1996; 271: 20024-20028.

Fukuda M, Gotoh Y, Nishida E. Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J* 1997; 16: 1901-1908.

Furnari B, Rhind N, Russell P. Cdc 25 mitotic inducer targeted by Chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science* 1997; 277: 1495-1497.

Galaktionov K and Beach D. Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: Evidence for multiple roles of mitotic cyclins. *Cell* 1991; 67: 1181-1194.

Gamow EI, Prescott DM. The cell life cycle during early embryogenesis of the mouse. *Exp Cell Res* 1970; 59: 117-123.

Gautier J, Norbury C, Lohka M, Nurse P, Maller J. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* 1988; 54: 433-439.

Gavin AC, Tsukitani Y, Schorderet-Slatkine S. Induction of M-phase entry of prophase-blocked mouse oocytes through microinjection of okadaic acid, a specific phosphatase inhibitor. *Exp Cell Res* 1991; 192: 75-81.

Goddard MJ, Pratt HPM. Control of events during early cleavage of the mouse embryo at analysis of the "2-cell block". *J Embryol Exp Morphol* 1983; 73: 111-133.

Goetz MZ, Verlhac MH, Geraud G, Kubiak JZ. Protein phosphatases control MAP kinase activation and microtubule organization during rat oocyte maturation. *Eur J Cell Biol* 1997; 72: 30-38.

Gotoh Y, Nishida E, Yamashita T, Hoshi M, Kawasaki M, Sakai H. Microtubule-associated protein (MAP) kinase activated by nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells. *Eur J Biochem* 1990; 193: 661-669.

Gotoh Y, Nishida E. Signals for mesoderm induction. Roles of fibroblast growth factor

(FGF)/mitogen-activated kinase (MAPK) pathway. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1288: 1-7.

Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 1982; 218: 474-475.

Haccard O, Lewellyn A, Hartley RS, Erikson E, Maller JL. Induction of *Xenopus* oocyte meiotic maturation by MAP kinase. *Dev Biol* 1995; 168: 677-682.

Haraguchi S, Naito K, Azuma S, Sato E, Nagahama Y, Yamashita M, Toyoda Y. Effects of phosphate on *in vitro* 2-cell block of AKR/N mouse embryos based on changes in cdc2 kinase activity and phosphorylation states. *Biol Reprod* 1996a; 55: 598-603.

Haraguchi S, Naito K, Sato E. Development *in vivo* of AKR/N mouse blastocysts developed from the 1-cell stage in a phosphate-free medium. *J Reprod Dev* 1996b; 42: 273-275.

Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989; 246: 629-634.

Harvey MB, Peter LK. Mouse blastocysts respond metabolically to short-term stimulation by insulin and IGF-1 through the insulin receptor. *Mol Reprod Dev* 1991; 29: 253-258.

Hashimoto N, Kishimoto T. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev Biol* 1988; 126: 242-252.

Heldin CH. Structural and functional studies on platelet derived growth factor. *EMBO J* 1992; 11: 4251-4259.

Hisanaga S, Kusubata M, Okumura E, Kishimoto T. Phosphorylation of neurofilament

H subunit at the tail domain by cdc2 kinase dissociates the association to microtubules. *J Biol Chem* 1991; 266: 21798-21803.

Hoffmann I, Clarke PR, Marcote MJ, Karsenti E, Draetta G. Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J* 1993; 12: 53-63.

Hoffman I, Draetta G, Karsenti E. Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO J* 1994; 13: 4302-4310.

Honda R, Ohba Y, Nagata A, Okayama H, Yasuda H. Dephosphorylation of human p34^{cdc2} kinase on both Thr-14 and Tyr-15 by human cdc25B phosphatase. *FEBS* 1993; 318: 331-334.

Hoshi M, Nishida E, Sakai H. Activation of a Ca²⁺-inhibitible protein kinase that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro by growth factors, phorbol esters, and serum in quiescent cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 1988; 263: 5396-5401.

Hoshi M, Ohta K, Gotoh Y, Mori A, Murofushi H, Sakai H, Nishida E. Mitogen-activated-protein-kinase-catalyzed phosphorylation of microtubule-associated proteins, microtubule-associated protein 2 and microtubule-associated protein 4, induces an alteration in their function. *Eur J Biochem* 1992; 203: 43-52.

Howlett S, Bolton VN. Sequence and regulation of morphological and molecular events during the first cell cycle of mouse embryogenesis. *J Embryol Exp Morphol* 1985; 87: 175-206.

Howlett SK. A set of proteins showing cell cycle dependent modification in the early mouse embryo. *Cell* 1986; 45: 387-396.

Hunt T, Luca FC, Ruderman JV. The requirements for protein synthesis and

degradation, and the control of destruction of cyclins A and B in the meiotic and mitotic cell cycles of the clam embryo. *J Cell Biol* 1992; 116: 707-724.

Inoue M, Naito K, Aoki F, Toyoda Y, Sato E. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote* 1995; 3: 265-271.

Irie K, Gotoh Y, Yashar BM, Errede B, Nishida E, Matsumoto K. Stimulatory effects of yeast and mammalian 14-3-3 proteins on the raf protein kinase. *Science* 1994; 265: 1716-1719.

Izumi T, Walker DH, Maller JL. Periodic changes in phosphorylation of the *Xenopus* cdc25 phosphatase regulate its activity. *Mol Biol Cell* 1992; 3: 927-939.

Jinno S, Suto K, Nagata A, Igarashi M, Kanaoka Y, Nojima H, Okayama H. Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO J* 1994; 13: 1549-1556.

Johnson MH, Nasr-Esfahani MH. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? *Bioessays* 1994; 16: 31-38.

Kalab P, Kubiak JZ, Verlhac M-H, Colledge WH, Maro B. Activation of p90rsk during meiotic maturation and first mitosis in mouse oocytes and eggs: MAP kinase-independent and -dependent activation. *Development* 1996; 122: 1957-1964.

Kikuchi K, Izaike Y, Noguchi J, Furukawa T, Daen FP, Naito K, Toyoda Y. Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1995; 105: 325-330.

Kobayashi H, Minshull J, Ford C, Golsteyn R, Poon R, Hunt T. On the synthesis and destruction of A- and B-type cyclins during oogenesis and meiotic maturation in *Xenopus laevis*. *J Cell Biol* 1991; 114: 755-765.

Koobs DH. Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects. *Science* 1972;

178: 127-133.

Kosako H, Gotoh Y, Matsuda S, Ishikawa M, Nishida E. Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *EMBO J* 1992; 11: 2903-2908.

Kosako H, Nishida E, Gotoh Y. cDNA cloning of MAP kinase kinase reveals kinase cascade pathways in yeasts to vertebrates. *EMBO J* 1993; 12: 787-794.

Kubiack JZ, Weber M, dePennart H, Winston NJ, Maro B. The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *EMBO J* 1993; 12: 3773-3778.

Kumagai A, Dunphy WG. Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. *Cell* 1992; 70: 139-151.

Labbe JC, Picard A, Peaucellier G, Cavadore JC, Nurse P, Doree M. Purification of MPF from starfish: identification as the H1 histone kinase p34^{cdc2} and a possible mechanism for its periodic activation. *Cell* 1989; 57: 253-263.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

Levesque JT, Sirard MA. Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. *Biol Eprod* 1996; 55: 1427-1436.

Lu RZ, Shiota K, Toyoda Y, Takahashi M. Activin (EDF) release the "two-cell block" of mouse embryos in culture. *Jpn J Anim Reprod* 1990; 36: 127-132.

Lu RZ, Matsuyama S, Nishihara M, Takahashi M. Developmental expression of activin/inhibin β_A , β_B , and α subunits, and activin receptor-IIB genes in preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 1993; 49: 1163-1169.

Luthardt FW, Donafue RP. DNA synthesis in developing two-cell mouse embryos. *Dev Biol* 1975; 44: 210-216.

Matsuda S, Kosoko H, Takenaka K, Moriyama K, Sakai H, Akiyama T, Gotoh Y, Nishida E. Xenopus MAP kinase activator: identification and function as a key intermediate in the phosphorylation cascade. *EMBO J* 1992; 11: 973-982.

Masui Y, Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 1971; 177: 129-145.

Millar JBA, Russell P. The cdc25 M-phase inducer: An unconventional protein phosphatase. *Cell* 1992; 68: 407-410.

Minshull J, Blow JJ, Hunt T. Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated *Xenopus* eggs to enter mitosis. *Cell* 1989; 56: 947-956.

Mintz B. Mammalian embryo culture. In *methods in developmental biology* (eds.) Wilt EH and Wessels NK. San Francisco: Freeman; 1967: 379-400.

Miyoshi K, Funahashi H, Okuda K, Niwa K. Development of rat one-cell embryos in a chemically defined medium: effects of glucose, phosphate and osmolarity. *J Reprod Fertil* 1994; 100: 21-26.

Miyoshi K, Abeydeera LR, Okuda K, Niwa K. Effects of osmolarity and amino acids in a chemically defined medium on development of rat one-cell embryos. *J Reprod Fertil* 1995; 103: 27-32.

Moreno S, Nurse P. Substrates for p34^{cdc2}: In vivo veritas? *Cell* 1990; 61: 549-551.

Morrison DK, Kaplan DR, Escobedo JA, Rapp UR, Roberts TM, Williams LT. Direct activation of the serine/threonine kinase activity of raf-1 through tyrosine phosphorylation by the PDGF β -receptor. *Cell* 1989; 58: 649-657.

Morrison D. 14-3-3: modulators of signaling proteins? *Science* 1994; 266: 56-57.

Murray AW, Kirschner MW. Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science* 1989a; 246: 614-621.

Murray AW, Kirschner MW. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 1989b; 339: 275-280.

Murray AW, Solomon MJ, Kirschner MW. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* 1989; 339: 280-286.

Muslin AJ, Macnicol AM, Williams LT. Raf-1 protein kinase is important for progesterone-induced *Xenopus* oocyte maturation and acts downstream of mos. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 4197-4202.

Nagata A, Igarashi M, Jinno S, Suto K, Okayama H. An additional homolog of the fission yeast *cdc25+* gene occurs in humans and is highly expressed in some cancer cells. *New Biol* 1991; 3: 959-968.

Naito K, Toyoda Y. Fluctuation of H1 kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes. *J Reprod Fertil* 1991; 93: 467-473.

Naito K, Hawkins C, Yamashita M, Nagahama Y, Aoki F, Kohmoto K, Toyoda Y, Moor RM. Association of p34^{cdc2} and cyclin B1 during meiotic maturation in porcine oocytes. *Dev Biol* 1995; 168: 627-634.

Nebreda AR, Hunt T. The *c-mos* proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *EMBO J* 1993; 12: 1979-1986.

Newport JW, Kirschner MW. Regulation of the cell cycle during early *Xenopus* development. *Cell* 1984; 37: 731-742.

Nishida E, Gotoh Y. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci* 1993; 4: 128-131.

Nishijima H, Nishitani H, Seki T, Nishimoto T. A dual-specificity phosphatase cdc25B is an unstable protein and triggers p34^{cdc2}/cyclin B activation in hamster BHK21 cells arrested with hydroxyurea. *J Cell Biol* 1997; 138: 1105-1116.

Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, Kishi J, Mori T. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol Reprod Dev* 1991; 28: 356-360.

Norbury C, Blow J, Nurse P. Regulatory phosphorylation of the p34^{cdc2} protein kinase in vertebrates. *EMBO J* 1991; 10: 3321-3329.

Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 1990; 344: 503-508.

Otsu M, Terada Y, Okayama H. Isolation of two members of the rat MAP kinase kinase gene family. *FEBS Lett* 1993; 320: 246-250.

Ottaviano Y, Gerace L. Phosphorylation of the nuclear lamins during interphase and mitosis. *J Biol Cell* 1985; 260: 624-632.

Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989; 246: 603-608.

Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* 1991; 10: 885-892.

Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, P-Worms H. Mitotic and G2 checkpoint control: Regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of cdc25C on serine-216. *Science* 1997; 1501-1505.

Petters RM, Johnson BH, Reed ML, Archibong AE. Glucose, glutamine and inorganic

phosphate in early development of the pig embryo in vitro. *J Reprod Fertil* 1990; 89: 269-275.

Picard A, Labbe JC, Barakat H, Cavadore JC, Doree M. Okadaic acid mimics a nuclear component required for cyclin B-cdc2 kinase microinjection to drive starfish oocytes into M phase. *J Cell Biol* 1991; 115: 337-344.

Pinyopummintr T, Bavister BD. In vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture medium. *Biol Replod* 1991; 45: 736-742.

Posada J, Nelson Y, Ahn NG, Vande Woude GF, Cooper JA. Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 2546-2553.

Rappolee DAS, Sturm KS, Behrendtsen O, Schultz GA, Pederson RA, Werb Z. Insulin-like growth factor II acts through an endogenous growth pathway regulated by imprinting in early mouse embryo. *Gene Dev* 1992; 6: 939-952.

Ray L, Sturgill T. Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1502-1506.

Rime H, Ozon R. Protein phosphatases are involved in the in vivo activation of H1 kinase in mouse oocyte. *Dev Biol* 1990; 141: 115-122.

Sagata N, Daar I, Oskarsson M, Showalter SD, Vande Woude GF. The product of the *c-mos* proto-oncogene as a candidate "initiator" for oocyte maturation. *Science* 1989; 245: 643-646.

Sanchez I, Dynlacht BD. Transcriptional control of the cell cycle. *Curr Opin in Cell Biol* 1996; 8: 318-324.

Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, P-Worms H, Elledge SJ. Conservation of the checkpoint pathway in mammals: Linkage of DNA damage to cdk regulation through cdc25. *Science* 1997; 277: 1497-1501.

Satoh T, Endo M, Nakafuku M, Nakamura S, Kaziro Y. Platelet-derived growth factor stimulates formation of active p21^{ras}.GTP complex in Swiss mouse 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5993-5997.

Schini SA, Bavister BD. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol Reprod* 1988; 39: 1183-1192.

Schini SA, Bavister BD. Normal offspring produced after transfer of hamster embryos grown from two-to eight cells in a chemically-defined culture medium. *Theriogenology* 1990; 33(6): 1255-1262.

Schultz GA, Heyner S. Growth factor in preimplantation mammalian embryos. *Oxf Rev Reprod Biol* 1993; 15: 43-81.

Schultz RM. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *BioEssays* 1993; 531-538.

Seger R, Ahn NG, Posada J, Munar ES, Jensen AM, Cooper JA, Cobb MH, Krebs EG. Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 14373-14381.

Seshagiri PB, Bavister BD. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: evidence for the "Crabtree effect". *Mol Reprod Dev* 1991; 30: 105-111.

Solomon MJ, Glotzer M, Lee TH, Philippe M, Kirschner MW. Cyclin activation of p34^{cdc2}. *Cell* 1990; 63: 1013-24.

Strausfeld U, Labbe JC, Fesquet D, Cavadore JC, Picard A, Sadhu K, Russell P, Doree

M. Dephosphorylation and activation of a p34^{cdc2}/cyclin B complex in vitro by human cdc25 protein. *Nature* 1991; 351: 242-245.

Suprynowicz FA, Gerace L. A fractionated cell-free system for analysis of prophase nuclear disassembly. *J Cell Biol* 1986; 103: 2073-2081.

Toyoda Y, Yokoyama M, Hoshi T. Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *Jpn J Anima Reprod* 1971; 16: 147-151.

Toyoda Y, Azuma S, Takeda S. Effects of chelating agents on preimplantation development of mouse embryos fertilized in vitro. In: Yoshinaga K, Mori T (eds.), *In development of preimplantation embryos and their environment*. New York: A. R. Liss, 1989: 171-179.

Toyoda Y, Azuma S, Itagaki Y, Takeda S. Strain difference in the development of preimplantation mouse embryos in a medium supplemented with superoxide dismutase or ethylenediamine tetraacetic acid. *J Mamm Ova Res* 1992; 9: 180-190.

Van BJ. Molecular differentiation of the rabbit ovum: III. Fertilization-autonomous polypeptide synthesis. *Dev Biol* 1979; 72: 188-194.

Vanderlaan M, Thomas CB. Characterization of monoclonal antibodies to bromodeoxyuridine. *Cytometry* 1985; 6: 501-505.

Verlhac MH, Kubiak JZ, Clarke HJ, Maro B. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* 1994; 120: 1017-1025.

Verlhac MH, Kubiak JZ, Weber M, Geraud G, Colledge WH, Evans MJ, Maro B. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development* 1996; 122: 815-822.

Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA. Mammalian ras interacts directly with the serine/threonine kinase raf. *Cell* 1993; 74: 205-214.

Weinert TA, Hartwell LH. The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 241, 317-322, 1988.

Whitten WK. Nutrient requirements for the culture of preimplantation mouse embryos *in vitro*. In: Raspa G (ed.), *Intrinsic and extrinsic factors in early mammalian development*. *Advances in the bioscience*, vol. 6. New York: Pergamon Press; 1971: 129-141.

Wickramasinghe D, Becker S, Ernst MK, Resnick JL, Centanni JM, Tessarollo L, Grabel LB, Donovan PJ. Two CDC25 homologues are differentially expressed during mouse development. *Development* 1995; 121: 2047-2056.

Wiekowski M, Miranda M, DePamphilis ML. Regulation of gene expression in preimplantation mouse embryos: effects of the zygotic clock and the first mitosis on promoter and enhancer activities. *Dev Biol* 1991; 147: 403-414.

Wu R. Control mechanisms of glycolysis in Ehrlich ascites tumor cells. *J Biol Chem* 1965; 240: 2827-2832.

Yamashita M, Yoshikuni M, Hirai T, Fukuda S, Nagahama Y. A monoclonal antibody against the PSTAIR sequence of p34^{cdc2}, catalytic subunit of maturation-promoting factor and key regulator of the cell cycle. *Dev Growth Differ* 1991; 33: 617-624.

Yokoi H, Natsuyama S, Iwai M, Noda Y, Mori T, Mori K, Fujita K, Nalayama H, Fujita J. Non-radioisotopic quantitative RT-PCR to detect changes in mRNA levels during early mouse embryo development. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 195: 769-775.

Zheng CF, Guan KL. Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J* 1994; 13: 1123-1131.

謝 辞

本稿を終えるにあたり、常に的確な御指導、御鞭撻を賜りました
東京大学医科学研究所、獣医学研究部の勝木元也教授に深謝致します。

また、入学時の指導教官であり、本研究のテーマのきっかけを与
えて下さいました豊田裕教授、絶え間ざる暖かい御指導を頂きました佐
藤英明教授に、深い感謝の意を表します。

この4年間、目まぐるしく変わりゆく状況の中にあって、終始多大
な御指導を頂きました内藤邦彦助教授に、心から感謝の意を表します。

既に研究室を去られた諸先輩方、並びに谷島百合子さんには心よ
り感謝致します。また、時折励ましの暖かいお言葉をかけて頂きました
獣医学研究部の久和茂博士には厚くお礼を申し上げます。

そして最後に、これまで気苦労ばかりかけてきた両親、そして
兄、弟にこの場を借りて感謝致します。

