

## 論文の内容の要旨

論文題目 : Studies on the Mechanism of Egg Activation at Fertilization in the Ascidians, *Ascidia Sydneiensis Divisa* and *Ciona Savignyi*.

受精時におけるホヤ卵の活性化機構に関する研究

氏名 泉水 奏

(指導教官 森澤正昭)

受精の際、卵は精子の刺激により活性化され、急速に様々な形態的、生理的変化を起し個体発生を開始する。この卵活性化機構については海産無脊椎動物から脊椎動物、ほ乳類にいたまで多くの動物種で研究が進められており、多くの細胞で普遍的に知られているシグナル伝達系と同様、 $IP_3$ 、 $Ca^{2+}$ などのセカンドメッセンジャーが関与していることが明らかになりつつある。しかし、脊椎動物の起源との関係で系統的に興味深い尾索類のホヤでの卵活性化機構は、その意義の重要性に反して研究が十分になされていない。本研究では、ユウレイボヤ *Ciona savignyi* 及びスジキレボヤ *Ascidias sydneiensis divisa* の受精時における卵活性化機構について研究を行った。

### 第1部 ホヤ卵減数分裂開始因子の同定

多くの動物種では受精可能な卵は減数分裂の様々な段階で分裂を停止している。従って、受精における卵の活性化の一つの重要な意義は停止していた減数分裂を再開させることである。未受精卵の減数分裂停止については第2減数分裂の中期(MII)で分裂を停止している両生類および哺乳類において研究が進められており、分子の実体をはじめとする分子機構の解明が進んでいる。これらの種では未受精卵の細胞質中に分裂停止因子 Cytostatic Factor (CSF) が存在しており精子の刺激により、CSF の消失の結果、中期促進因子(Metaphase Promoting Factor)の活性が低下し減数分裂の再開が起こることが知られている。一方、MII 以外の段階で減数分

裂を停止している未受精卵を持つ動物種については、その停止-再開機構はほとんど明らかになっていない。第一部では、第1減数分裂中期 (MI) で停止しているホヤ (ユウレイボヤ、スジキボヤ) においてその停止-再開機構について調べた。まず、未受精卵に CSF が存在するか、或いは受精後に未知の分裂開始に関する因子が新生されるか否かを明らかにするため、ポリビニルアルコールを用いた細胞融合法を開発し、第1減数分裂中期で停止している未受精卵と減数分裂が進行途中の受精卵あるいは体細胞分裂をしている割球とを融合させた。その結果、融合卵では、受精卵側の減数分裂および割球側の体細胞分裂の進行は抑えられなかった。一方、未受精卵側では減数分裂が再開し極体が放出された。また、未受精卵同士の場合では、減数分裂の再開により極体が放出されることはなかった。これらの結果から、ホヤ卵では第2減数分裂中期で分裂を停止している両生類、哺乳類の未受精卵に見られるような CSF は存在しないであろう事、そして、受精後に分裂開始因子が新生される事、そしてこの因子は割球にも存在することが明らかとなった。

## 第2部 受精時の減数分裂開始及び卵形変化に果たす $\text{Ca}^{2+}$ の役割

受精の際 CSF を消失させ、減数分裂を再開させるとして  $\text{Ca}^{2+}$  が考えられている。そこで、受精時の卵の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の変動をクラゲ由来の発光物質エクオリンを注入したユウレイボヤ卵からの  $\text{Ca}^{2+}$  依存発光を測定することにより調べた。さらに  $\text{Ca}^{2+}$  緩衝液の注入により、卵内の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を直接変化させ、卵活性化への影響について調べた。まず、受精時の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化では、媒精直後、大きな  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の一過性の上昇 (Phase I) が卵形の変化とそれに伴う卵細胞質の再配置の時期に出現し、引き続き小さな数回の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上下動 (振動) (Phase II) が見られた。さらに第一極体放出後 10 回程度の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上下動 (振動) (Phase III) が起こり、その後第二極体が放出され、減数分裂が完了した。一方、未受精卵に  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の低い緩衝液を注入し、受精時における  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇を抑えると、卵形変化、減数分裂の進行による極体形成が抑制された。逆に高濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  を含む  $\text{Ca}^{2+}$  緩衝液を注入し未受精卵の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を段階的に上昇させると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i = 0.9 \mu\text{M}$  では減数分裂は再開せず卵形変化と卵細胞質の再配置のみが、 $[\text{Ca}^{2+}]_i = 2.0 \mu\text{M}$  では引き続きおこる第一極体放出と MII までの過程、そして  $[\text{Ca}^{2+}]_i = 10.1 \mu\text{M}$  では第二極体の放出し前核形成までの過程が、それぞれ  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  濃度に応じて段階的に引き起こされた。このことから、受精時に起こる卵形変化、減数分裂の各進行過程にはそれぞれ異なった濃度の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が必要である事が明らかとなった。また、特定の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  濃度では通常 MII で減

数分裂が停止しないホヤ卵においても、第一極体放出後 MII で減数分裂が停止し、さらなる  $\text{Ca}^{2+}$  の追加でその停止が解除された。このことから  $\text{Ca}^{2+}$  により調節されうる潜在的な MII 停止機構が存在すると考えられる。

### 第3部 卵活性化における $\text{Ca}^{2+}$ 変動の役割とその発生機構

受精時に起こる  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の変動をさらに詳しく解析するために、エクオリンに比べ感度の高い  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光色素 fura-2 及び、Calcium Green を用いて  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の変動を測定した (図1)。その結果、第2部で得られた結果を確認することができ、更に  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の変動をより詳細にとらえることができた。

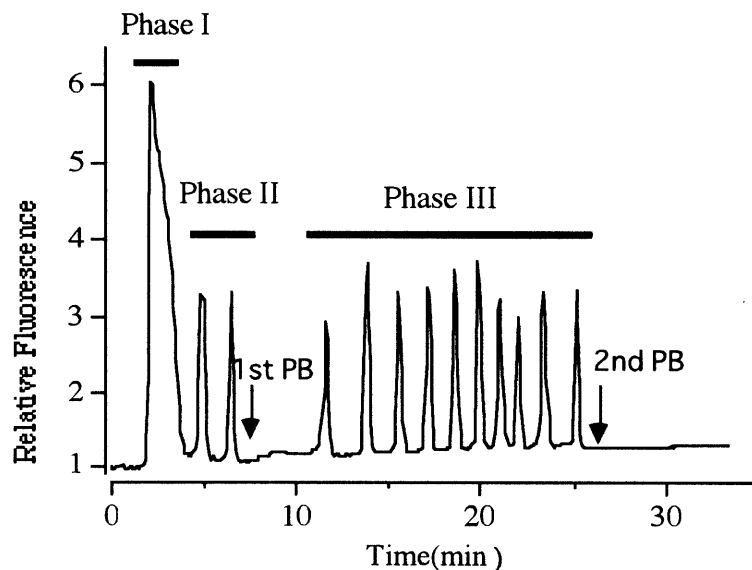


図1. fra-2を用いた、受精時の卵  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  濃度の変動測定； 縦軸は  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (相対値) 横軸は媒精後の時間を示す。第一極体 (1st PB) 放出、第二極体 (2nd PB) の放出時期は矢印で示されている。

次に  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の変動の役割及びその発生機構を膜系チャンネルに対する抗体、作動薬、拮抗薬を用い調べ、まず  $\text{IP}_3$  受容体を介する  $\text{IP}_3$  誘導性  $\text{Ca}^{2+}$  放出の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の変動における関与を検討したところ、未受精卵への  $\text{IP}_3$  の注入は Phase I -II 様の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変動と卵形変化、第一極体放出を起こし、MII で分裂を停止する事が明らかとなった。この分裂を停止した卵にさらに  $\text{IP}_3$  を注入すると  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の再上昇と第二極体の放出が起こり減数分裂は終了した。これらの結果から Phase I -II は卵形変化と減数分裂の MI から MII への移行過程を促進し、第1極体形成後に現れる Phase III は潜在的 MII 停止を解除し、減数分裂を完了させる働きをしていると考えられる。一方、 $\text{IP}_3$  受容体の作動薬 adenophostin は未受精卵に持続的な  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の振動を引き

起こし、受容体の拮抗薬であるヘパリン及びタイプ 1IP<sub>3</sub>受容体に対する抗体は受精時 Phase I-II の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の振動を抑えないが Phase III の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の振動を抑制した。さらに、IP<sub>3</sub>以外の細胞内 Ca<sup>2+</sup>放出機構であるリアノジン受容体を介する Ca<sup>2+</sup>誘導性 Ca<sup>2+</sup>放出機構の関与も検討したところ、リアノジン受容体拮抗薬であるルテニウムレッド、作動薬である c-ADP ribose は、共に未受精卵及び受精卵の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の動態にはほとんど影響を与えず、受精後の卵形態変化、卵割などの発生過程にも影響を及ぼさなかった。以上の結果から受精時の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の変動は IP<sub>3</sub> 誘導性 Ca<sup>2+</sup>放出 (IP<sub>3</sub> Induced Calcium Release: IICR) によるものであり、Ca<sup>2+</sup>誘導性 Ca<sup>2+</sup>放出機構(Calcium Induced Calcium Release: CICR)の関与は薄いこと、さらに Phase I-II の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の振動と、Phase III の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の振動は、異なる機構により引き起こされると結論された。

#### 第4部 受精時の卵活性化における G タンパク質の役割

GTP 結合蛋白質(G タンパク質)には様々な種類があり、IP<sub>3</sub>の産生酵素である PLC (PLC-β)の調節を初めとする、様々な、シグナル伝達系において重要な役割を果たしていることが知られている。そこで G タンパク質の受精における役割を詳細に調べる目的で、拮抗薬 GDP-β-s 及び作動薬である GTP-γ-s を用いて研究を行った。まず、GDP-β-s は受精時の Phase I -II の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>変動に影響を及ぼさないことから、受精時の IICR による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>変動は G タンパク質非依存的 PLC の関与のもとで起こると考えられる。一方、GDP-β-s は卵表層のアクチン繊維の分布を乱し、卵形変化を抑制し、GTP-γ-s は卵胞表層のアクチン繊維の増強と異常な卵変形を引き起こす事が観察された。このことから Ca<sup>2+</sup>下流でアクチン系が関与している卵形変化に、G タンパク質が関与していることが考えられる。更、GDP-β-s は Phase III [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>変動の開始を遅らせ、その期間を長引かせるなど、大幅な[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>変動パターンの乱れを生じさせ、減数分裂の進行も抑制した。一方、GTP-γ-s は異常なパターンの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>変動を引き起こすが、減数分裂の進行を引き起こさない。従って、減数分裂の進行には何らかのパターンの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>変動が必要であり、その過程に G タンパク質が関与していると考えられる。

以上、本研究ではホヤ卵受精時の特徴的な細胞内カルシウムの動態が鮮明となり、そのカルシウムの動態の卵活性化時の卵形態変化、減数分裂再開と進行における役割、そして IP<sub>3</sub> 及び G-タンパク質による調節の概略が明らかにされた。