

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成 16 年度博士課程 進学

氏 名 鹿島 光司

指導教員名 内藤 邦彦

論文題目 マウス初期胚の細胞分裂制御における CSF の作用に関する研究

哺乳類の着床前胚、いわゆる初期胚は、体細胞と比べ短時間に卵割を繰り返して、細胞数を著しく増加させる高い分裂能を有している。本研究は、哺乳類初期胚のこの高い分裂能に注目し、マウス初期胚が持つ特異的生理機構の一端を明らかにした物である。本研究では、脊椎動物の受精直前の卵が第 2 減数分裂中期 (MII) で停止するのに必須である CytoStatic Factor (CSF) と呼ばれる因子に着目した。カエルでは MII で停止中の未受精卵の細胞質を、受精後の 2 細胞期胚の片側の割球に注入すると、注入された割球のみ初期発生が分裂期 (M 期) で停止することが知られており、CSF は未受精卵のみならず、高い分裂能をもつ初期発生をも M 期で停止させる強力な M 期停止因子であると定義されている。哺乳類においては、MII で停止している未受精卵にカエルの CSF と同様の因子が存在することは確認されており、やはり CSF と呼ばれ、初期発生を M 期停止させるとの認識がある。しかし、哺乳類初期胚の分裂能に対する知見には不十分な点が多く、現在まで未受精卵の MII 停止に働く因子によって、初期胚が M 期で停止することを明確に示した報告は無く、現在この分野において最も研究が進んでいるアフリカツメガエル (*Xenopus*) の結果をそのまま当てはめている部分も多く見受けられる。そこで本研究では、マウスの初期胚には高い分裂能と関連する特異的な生理機構があるのではないかと予想し、マウスの CSF が初期胚に M 期停止を導入できるかを検証することから開始した。

第1章 Mos/MAPK 経路がマウス初期胚の細胞分裂に及ぼす影響

第1章では、まず未受精卵の MII 停止に必須であることが報告されている MAPK 経路 (Mos/MEK/ERK) の活性化が、マウスの初期胚を M 期で停止させるかを検討した。通常マウスの初期胚では全く活性化のみられない MAPK の ERK を活性化させるために、MAPK 経路の構成因子の1つである MEK を恒常的に活性化した変異体 SDSE-MEK を作製し、体外受精により得られた BDF1 マウスの初期胚の前核に発現ベクターを顕微注入したところ、ERK の下流因子である RSK に活性化の指標となるリン酸化がみられ、また myelin basic protein (MBP) を基質とした活性測定により ERK の高活性が確認され、MAPK の活性化に成功した。このマウス初期胚に M 期停止が引き起こされるかを調べたところ、*Xenopus* とは異なり初期発生は M 期停止を起こさなかった。そこで次に、MEK の上流であり受精前の卵に特異的に発現している Mos の作用について同様に確認した。Mos は MAPK 経路に加え、別の経路も介して MII 停止に関与するとの報告があり、MAPK より強い M 期停止作用も持つ可能性があった。野生型 Mos を初期胚に発現させたところ、速やかに分解されることが示されたので、これを回避するため分解抑制型変異体の ds-Mos を作製し、初期胚での継続的な Mos の存在を可能にして検討した。その結果、ds-Mos により MAPK 経路の活性化には成功したが、やはり M 期停止を引き起こさないことが示された。

未受精卵では MII 停止に作用する CSF が、マウスでは受精後にその機能を失っているという事実は、マウス初期胚が持つ高い分裂能を保障するため、M 期停止を回避する *Xenopus* にはないマウス独自の新しい機構の存在を示唆するものであった。そこで、次章以降ではこの M 期停止回避機構の解明を目指し、マウス初期胚に M 期停止を実験的に引き起こすことを試みた。マウス初期胚に M 期停止を引き起こすことができれば、どのような機構でそれを回避しているかわかると考えられたからである。

第2章 Emi1 および Emi2 がマウス初期胚の細胞分裂に及ぼす影響

本章では *Xenopus* 初期胚に M 期停止を誘導する因子として、最近報告された CSF である Emi1、Emi2 に焦点を絞った。Emi1、Emi2 はユビキチン鎖を

付加することにより M 期タンパク質群の分解を媒介して M 期脱出を制御する Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) を抑制することによって M 期停止に作用することが報告されており、マウス未受精卵にも同様の因子が存在し MII 停止に作用していることが示唆されている。本実験では Emi1、Emi2 と EGFP との融合タンパク質を作製し、1 章と同様の方法でマウス初期胚に発現させた。EGFP 蛍光により確認した Emi1 の局在は体細胞での報告と一致しており、機能していることが示唆された。また、この結果は初期胚での細胞内局在を示した初めてのものとなった。Emi1 については APC/C 抑制効果が高まるとの報告を参考に活性化型変異 Emi1 も作製し合わせて解析した。その結果、野生型 Emi1、活性化型変異 Emi1 ともに M 期停止機能は確認されなかった。一方、Emi2 にはわずかながら M 期停止能力が確認されたが、その作用は極めて微弱であり有意に発生を停止させるとは結論付けられなかった。これらの結果も、Emi1 および Emi2 の *Xenopus* 初期胚での発現が M 期停止を引き起こすという知見とは反する内容であり、初期発生へ及ぼす CSF の作用が、*Xenopus* とマウスでは全く異なっているという 1 章での結果を支持した。

第 3 章 分解抑制型 Emi2 の発現によるマウス初期胚への M 期停止誘起

第 2 章の実験では EGFP-Emi2 融合タンパク質を発現させたが、この EGFP 蛍光は 2 細胞期、4 細胞期と発生が進むにつれ、著しく減衰するという結果が得られ、マウス初期胚では Emi2 が分解されていることが示唆された。この結果より、Emi2 が M 期停止作用を持つもののごく微弱である原因が、マウス初期胚の Emi2 の強力な分解機構にあり、その機構が、初期胚の高分裂能を保障するためにマウスが持つ独自の機構であるのではないかという予想がなされた。この予想を検証するために、3 章では Emi2 に分解抑制型の変異を導入した ds-Emi2 を作製し、マウス初期胚で発現させ、M 期停止作用を検討した。

Emi2 に導入した変異は、Emi2 の分解を媒介するユビキチンリガーゼである SCF 複合体の構成因子の 1 つ、 β -TrCP による認識配列への変異である。この ds-Emi2 をマウス初期胚に発現させた結果、多くの初期胚が M 期で停止していることが判明した。また、ds-Emi2 注入胚において M 期促進因子(MPF)の構成因子である Cyclin B 蓄積量を経時的に調べた結果、Cyclin B の分解抑制が確認

された。このことは、**ds-Emi2** による初期胚の停止が、**APC/C** の抑制による **Cyclin B** 蓄積を原因とするものであり、**MPF** 活性が低下しないために **M** 期で停止することも示唆された。さらにカエルにおける定義にしたがい、マウス 2 細胞期胚の片側の割球に注入したところ、注入割球のみが **M** 期で停止していることが示された。本実験は、マウスにおいて **CSF** により初期胚を **M** 期で停止させることを明確に示した初めての実験結果であり、本実験から **CSF** とされる因子のうち、**Emi2** が唯一マウスにおいて初期胚を未受精卵と同様に停止させ得る因子であることを示唆した。**Xenopus** でも **Emi2** は初期発生を **M** 期で停止させることが報告されているが、分解抑制をする必要はなく野生型の **Emi2** でも事足りることから、マウスと比較してその分解機構が弱いと考えられる。つまりマウスでは初期発生を容易に **M** 期で停止させないために、**Emi2** を非常に強力に分解するという独自の機構を獲得していることが示唆された。さらに **ds-Emi2** 発現胚の **MAPK** が活性化していないこと、**ds-Mos** または **SDSE-MEK** と野生型 **Emi2-EGFP** の共発現によっても、**ds-Emi2** のような **M** 期停止を促進させる効果は得られなかったことから、**Emi2** は **Mos/MAPK** とは独立してマウス初期胚に **M** 期停止を引き起こすことが示唆された。

以上、本研究の結果、**Xenopus** では **MII** 停止を引き起こす **CSF** の全てが初期胚の **M** 期停止を誘起するのに対し、マウスでは **Mos/MAPK** 経路での初期発生停止はもはや起こらなくなっているという既存の認識との相違点が発見された。そして唯一 **Emi2** のみが初期胚をも **M** 期停止させる能力を持っていることが示され、マウスでは卵割を進行させるために **Emi2** の強力な分解機構を備えているという結論が導かれた。