

平成21年 4月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19780216

研究課題名 (和文) 哺乳類卵母細胞の核小体の機能解析

研究課題名 (英文) Analysis of mammalian oocyte nucleolus in meiosis and early embryonic development

研究代表者

大串 素雅子 (OGUSHI SUGAKO)

独立行政法人理化学研究所・哺乳類生殖細胞研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：50437505

研究成果の概要：卵母細胞は転写を活発に行いながら発育し、十分な大きさに達すると転写を停止する。転写の変化とともに核小体も形態を変化させ、最終的に DNA のない緊密な形態となる。顕微操作により卵母細胞からこの核小体を摘出することに成功し、受精後に形成される雌雄両前核の核小体が例外なく母親に由来し、この核小体が受精後すぐの前核形成に必須の因子であることを明らかにした。さらに徹底的な基礎的解析により今まで明らかでなかった卵母細胞核小体タンパク質をいくつか同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

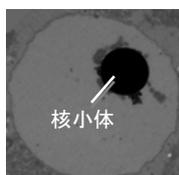
研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：卵母細胞，核小体，哺乳類，初期胚発生

1. 研究開始当初の背景

受精の際、卵子と精子は互いの遺伝情報だけでなく、受精卵の形成に必要な様々な因子や細胞内小器官を持ち込む。卵子と精子から持ち込まれる細胞小器官や物質がお互いに補い合うことによって受精卵は全能性、すなわちあらゆる種類の細胞に分化し一個体をつくりあげる能力を獲得する。卵母細胞の核には、核小体と呼ばれる明確な構造が見られる(右図)。



ブタ卵母細胞の核

体細胞では核小体はリボソーム RNA 合成・リボソーム構築を行う場だが、卵母細胞では転写が抑制されており、リボソーム RNA の合成は起こらない。さらに DNA を内部に持たず、線維性成分から成る均質で緊密な形態をしているため、卵母細胞の核小体は積極的な機能を持たないのではと考えられてきた。

2. 研究の目的

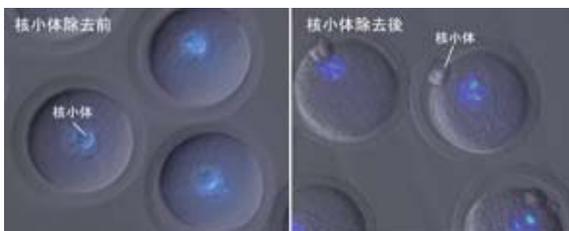
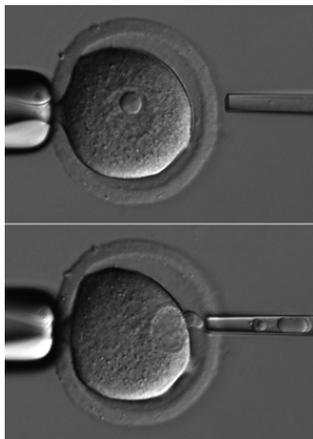
様々な動物種の体細胞でリボソーム構築に関連のないタンパク質や RNA が核小体に局

在することが報告されており、核小体の新たな機能が示唆され始めている。我々は、卵母細胞の核小体も明瞭な構造として核に存在するからには何らかの意義があるに違いないと推測し、(1) この核小体の減数分裂・初期胚発生進行における必要性を検討し、さらに(2) 今まで全く明らかにされていない卵母細胞の核小体成分を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 我々は体細胞核移植などで用いられる顕微操作技術を駆使し、哺乳類卵母細胞から核小体のみを摘出する方法(脱核小体操作)を開発した(下図)。哺乳類の卵巣では、性腺刺激ホルモンの刺激を受けて卵母細胞は減数分裂を再開し、第II減数分裂中期に達し、成熟した卵子となって卵管から排卵される。その後、精子と受精し雌性前核(卵子由来)と雄性前核(精子由来)を持つ受精卵を形成したのち卵割し、発生する。哺乳類ではこれらの過程を体外で再現できる。そこで顕微操作により核小体を取り除いたブタおよびマウスの卵母細胞を用いて体外培養を行い、減数分裂進行・受精・初期胚発生過程での核小体の機能について調べた。

脱核小体操作



(2) 最終的に直接的な成分同定解析を行う予定であるが、その解析から多量の情報を得るはずである。まずは初期胚発生に重要である核小体成分を確実にスクリーニングし、同定するために核小体の成分・機能に関わる基礎的な解析を体外培養もしくは免疫蛍光染

色法によって徹底的に行った。

4. 研究成果

(1) 核小体を取り除いた卵母細胞を体外で培養したところ、通常と同じように減数分裂が進行し、一見正常な卵子へと成熟していた。ところが、その卵子を受精させると通常であれば卵子由来の核(雌性前核)と精子由来の核(雄性前核)に核小体が見られるはずが、共に欠損していた。これは、卵母細胞由来の核小体が雌性前核のみならず、雄性前核にも核小体を供給しているという興味深い結果だった。次に、この様にしてできた受精卵が発生できるか否かを調べたところ、タンパク質合成能やDNA複製能は正常であるにもかかわらず、数回の卵割後に発生が停止してしまうことがわかった(下図)。卵母細胞から核小体を取り除き、再び戻してから受精させた場合は正常に発生することから、この異常は実験操作による卵母細胞の損傷によるものではないことが裏付けられた。

次に核小体を取り除いた卵母細胞に、体細胞やES細胞から取り出した核小体を移植すると、核小体を失った場合と同様に、偽前核中に核小体が形成されない、数回の卵割後に発生が停止する、といった異常が見られた。この結果は、卵母細胞の核小体は特有の機能を持ち、他の細胞の核小体によって代替できないことを示していた。

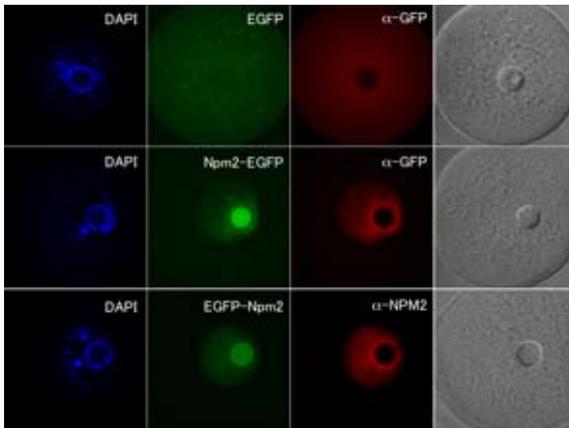
以上のことから哺乳類受精卵を構築し、初期胚発生を進行するために卵母細胞の核小体が必須であることが明らかとなった

(2) ①実際に核小体が初期胚発生のどの段階で必要なかを調べるために核小体を様々な段階の核小体のない卵母細胞(第I減数分裂前期・第II減数分裂中期・受精直後・受精数時間後)に注入し、初期胚発生能力を回復しその胚から産仔が得られるか検討した。減数分裂には核小体は必要ないが受精後すぐの前核形成に必須であることが明らかになった。

②発育完了卵母細胞で核小体が形成されずメスマウスが不妊であるという表現型を持つヌクレオプラスミンノックアウトマウスをBaylor College of MedicineのDr. M. M. Matzukから譲り受け、そのマウスを解析することでヌクレオプラスミンと卵母細胞核小体の関係を解析した。ヌクレオプラスミンは卵母細胞の核小体以外の核質に局在すると報告されている。また、ヌクレオプラスミンノックアウトマウス卵母細胞を受精・発生させると初期胚発生の進行が停止する。ノックアウトマウスの卵母細胞に野生型卵母細胞由来の核小体を注入し、受精、発生させると

核内に核小体を形成し、さらに初期胚発生能力も回復した。つまりヌクレオプラスミンノックアウトマウスの初期胚発生進行不全は卵母細胞中に核小体が形成されないことによると断定できた。

③卵母細胞の核小体に含まれる因子を徹底的に調べるために、まずヌクレオプラスミン、代表的な体細胞核小体マーカー、リボソームタンパク質、リボソーム RNA などの局在を whole-mount 免疫蛍光染色法で調べた。発育完了卵母細胞の核小体に局在するタンパク質は見られなかった。この核小体は電顕レベルで見ると非常に緊密な構造である。そのため抗体が核小体構造内部に浸透せず、タンパク質の局在が検出できないのではないかと考え、上記のタンパク質配列に EGFP をつけた mRNA を発育完了卵母細胞に injection し強制発現させた。EGFP のシグナルが核小体と核質で確認されるタンパク質をいくつか明らかにした (下図)。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Ogushi, S., Palmieri, C., Fulka, H., Saitou, M., Miyano, T., and Fulka, J. Jr., The maternal nucleolus is essential for early embryonic development in mammals. *Science*, 319, 613-616, (2008) 査読あり
 - ② Miyano, T., Ogushi, S., Bui, H.-T., Lee, J. Meiotic Resumption and Spindle Formation of Pig Oocytes. *J. Mamm. Ova Res.* 24, 92-98, (2007) 査読あり
 - ③ 大串 素雅子, 卵子由来の核小体は哺乳類の初期胚発生に必須である。実験医学, 26(9), pp 1389-1392. (2008) 査読あり
 - ④ 大串 素雅子, 卵子由来の核小体は哺乳類の初期胚発生に必須の因子だった。 *Medical Bio*, 5(3), pp 10-11. (2008) 査読あり
- [学会発表] (計7件)
- ① 大串 素雅子, The maternal nucleolus contributions to early embryonic development in mammals. 2008 BMB (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会) シンポジウム“細胞核内ドメインとその生物学的役割” 2008.12.12. 神戸, 兵庫.
 - ② 大串 素雅子, 哺乳類の受精卵の発生には卵子由来の核小体が重要～注目されていなかった卵母細胞の核小体の機能が明らかに～, 第3回生殖研究ワークショップ, 2008.8.7. 三崎, 神奈川.
 - ③ Ogushi, S., The maternal nucleolus is essential for early embryonic development in mammals. The 2nd EMBO Workshop on the nucleolus, “The nucleolus and disease”, 2008.6.24. Derby, UK.
 - ④ 大串 素雅子, 母方由来の核小体が哺乳類の初期胚発生に必須である。頭部形成研究会 2008, 2008.4.15. 南阿蘇, 熊本.
 - ⑤ 大串 素雅子, 宮野 隆, 斎藤 通紀, Josef Fulka Jr., 哺乳類卵母細胞に特異な核小体の受精卵・初期胚への貢献。2007.12.12. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 神奈川.
 - ⑥ Ogushi, S.: Maternal contribution of the nucleolus to the zygote in mammals. Indo-JSPS-CDB Joint Meeting, 2007.10.23. Kobe, Japan.
 - ⑦ 大串 素雅子, 宮野 隆, 斎藤 通紀, Josef Fulka Jr., 哺乳類卵母細胞に特異的な核小体成分の受精卵・初期胚構築への関与。2007.10.20. 第100回日本繁殖生物学会大会, 東京.
- [その他]
ホームページ等
http://www.cdb.riken.jp/jp/04_news/articles/080131_science.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大串 素雅子 (OGUSHI SUGAKO)
独立行政法人理化学研究所・哺乳類生殖
細胞研究チーム・基礎科学特別研究員
研究者番号：50437505