

## 科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成25年5月21日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658226

研究課題名(和文) 卵母細胞の核小体構築に関する研究

研究課題名(英文) Dynamics of oocyte nucleoli in mammals

研究代表者

宮野 隆 (MIYANO TAKASHI)

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：80200195

研究成果の概要(和文)：哺乳類の卵巣内の発育途上の卵母細胞には、リボソーム RNA の転写とリボソーム構築を活発に行う核小体が存在するが、卵母細胞が発育の完了に近づくと、核小体は転写活性を低下させて緊密な形態となる。同様な核小体の緊密化は転写阻害剤によって引き起こされた。一方、細胞内の蛋白質分解を行うプロテアソームに対する阻害剤で卵母細胞を処理すると、核小体の体積は増加した。卵母細胞の成熟過程で核小体は消失するが、卵母細胞の成熟を停止させた状態で核から核小体を抜き取って細胞質に移すと、核小体は細胞質中で一旦消失した後、核内に再び形成された。

研究成果の概要(英文)：During the growth stage, oocyte nucleoli are intensively engaged in ribosomal RNA (rRNA) synthesis. As the oocytes approach the final size, synthetic activity of RNAs decreases, and coincidentally nucleoli change the morphology and reduce the volume. Nucleoli of growing oocytes were compacted and reduced the size by transcription inhibitors (actinomycin D or  $\alpha$ -amanitin). On the other hand, the nucleolus volume of oocytes significantly increased by the treatment with proteasome inhibitors, MG-132 or lactacystin. During oocyte maturation, the nucleolus was disassembled into the cytoplasm. When the oocytes were arrested at the germinal vesicle stage, and the nucleolus was aspirated from the nucleus and transferred to the cytoplasm, the nucleolus disappeared and later it was reassembled in the nucleus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：動物生命科学・統合動物科学

キーワード：卵母細胞・核小体・体外培養

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣内の発育の途上にある卵母細胞には、リボソームの構築とリボソーム RNA (rRNA) の転写を活発に行う核小体が存在するが、卵母細胞が発育の完了に近づくと、転写活性は低下し、核小体は緊密な形態へと変化する

(Crozet ら, Biol Cell, 41: 35-42, 1981)。発育を完了した卵母細胞の核小体は、卵母細胞の成熟過程で消失し、受精後、前核中に再び出現する。

発育を完了した卵母細胞内の転写活性を持たない核小体の機能は、これまでまったく

知られていなかったが、申請者らはこれまで、顕微操作によって発育を完了したブタおよびマウスの卵母細胞から核小体を除去すると、核小体を持たない卵母細胞（脱核小体卵母細胞）は、第二減数分裂中期へと成熟し、受精し、雌雄両前核を形成するが、受精後の前核中に核小体が形成されないこと、また、脱核小体卵母細胞由来の受精卵は発生の途中で卵割を停止することを明らかにしている（Ogushi ら, *Science*, 319: 613-616, 2008）。この結果は、「受精卵の核小体は卵母細胞の核小体由来する」、また、クローン動物を作出する際に卵子に注入された体細胞から形成される「クローン胚の核小体も卵母細胞に由来し、母親由来の核小体がなければ胚は発生しない」との発見となった。しかし、卵母細胞の発育、成熟、受精過程で起こる核小体の形態の変化や、その消失・出現を制御する機構はほとんど分かっていない。発育途上の卵母細胞を転写阻害剤で処理すると、核小体が緊密化することは古くから知られているが（Crozet ら *Biol Cell*, 48: 25-29, 1983）、核小体の体積を制御する機構については知られていない。卵母細胞の成熟過程で核小体は消失するが、その過程の詳細も知られていない。また、成熟した第二減数分裂中期の脱核小体卵母細胞の細胞質に核小体を再移植すると核小体は消失するが（Ogushi ら, *Science*, 319: 613-616, 2008）、成熟開始を抑制した卵母細胞の細胞質に再移植された核小体の挙動については知られていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、卵母細胞の核小体の形態変化にかかわる機構を調べる。また、細胞質へと移された核小体が核内へと移動し、再構築される現象を証明する。さらに、核小体の新規な染色法を考案し、卵母細胞の成熟過程における核小体の変化を明らかにする。

## 3. 研究の方法

研究材料としては、と畜場で採取したブタの卵巣を用いた。卵巣から直径約 1 mm および 4~5 mm の卵胞を切り出し、それぞれの卵胞から直径 95~100  $\mu\text{m}$  の発育途上の卵母細胞と直径約 120  $\mu\text{m}$  の発育を完了した卵母細胞を採取し、以下の実験に用いた。直径 95~100  $\mu\text{m}$  の発育途上の卵母細胞は線維性成分と顆粒性成分からなる核小体を持ち、減数分裂を再開する能力を持たず、一方、直径約 120  $\mu\text{m}$  の卵母細胞は緊密な核小体を持ち、体外培養によって 9 割以上が第二減数分裂中期へと成熟することをこれまでの実験で確認している（Kanayama ら, *Zygote*, 10: 261-270, 2002）。

(1) ユビキチン-プロテアソーム系による核小体の体積制御：発育途上の卵母細胞を転写阻害剤の actinomycin D あるいは  $\alpha$ -amanitin を含む培養液中で培養し、核小体が緊密化することを確認した。また、処理前および処理後に卵母細胞を cytochalasin B で処理して遠心分離し、核小体を可視化し、その直径の変化を調べた。次いで、発育途上および発育を完了した卵母細胞をプロテアソーム阻害剤の MG-132 あるいは lactacystin を含む培養液中で培養し、核小体の体積の変化を調べた。

(2) 細胞質中での核小体の消失／分散：卵母細胞を cytochalasin B で処理して遠心分離し、核小体を可視化し、卵母細胞の核小体を顕微操作によって除去した。その後、脱核小体した卵母細胞の透明な部分の細胞質に核小体を注入し、核小体の消失過程を経時的に観察した。この際、dibutyl cyclic AMP (dbcAMP) で卵母細胞の減数分裂の再開を抑制し、卵核胞の崩壊を防いだ。第二減数分裂中期の卵母細胞を用いて同様な実験を行い、この核小体の消失／分散が卵母細胞の細胞周期に依存しないことを証明した。また、発育を完了した卵核胞期の卵母細胞を成熟培養後、電気刺激によって単為発生させて作出した 2 細胞期胚を用い、2 細胞期胚の核小体の特性についても検討を加えた。

(3) 核小体の新規な染色法：これまでの研究において、体細胞や発育途上の卵母細胞の核小体と反応する核小体成分に対する抗体を用いた免疫染色では、発育を完了した卵母細胞の緊密な核小体は染色されないことが知られている。核小体の動きを捕えることを目的として卵母細胞を丸ごとヘマトキシリンで染色し、核小体を可視化する方法を考案した。この染色法を用いて、卵母細胞の成熟過程における核小体の変化を調べた。

## 4. 研究成果

(1) ユビキチン-プロテアソーム系による核小体の体積制御

ブタ卵母細胞が直径 100~120  $\mu\text{m}$  へと発育する間に、卵母細胞の核小体の平均直径は  $15.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$  から  $13.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$  へと減少した。発育途上の卵母細胞を転写阻害剤の actinomycin D (0.8, 4, 8  $\mu\text{M}$ ) あるいは  $\alpha$ -amanitin (10, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) を添加した培養液中で 24 時間培養したのち、核小体の直径を計測したところ、核小体の直径はいずれも有意に減少した。一方、卵母細胞をプロテアソーム阻害剤の MG132 (10, 20  $\mu\text{M}$ ) あるいは lactacystin (100, 200  $\mu\text{M}$ ) で処理すると、核小体の直径は有意に増大した（図 1）。また、actinomycin D あるいは  $\alpha$ -amanitin 処理による

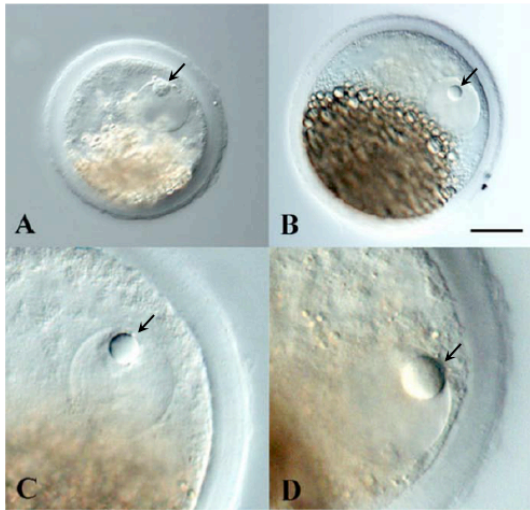


図1 遠心分離後の発育途上のブタ卵母細胞 (A) と発育を完了したブタ卵母細胞 (B; バーは 40  $\mu$ m)。発育途上のブタ卵母細胞をプロテアソーム阻害剤の MG132 で処理すると核小体の体積は増加した (D; C は対照)。

発育途上の卵母細胞の核小体の直径の減少は、MG132 によって部分的に阻害された。これらのことから、卵母細胞の核小体の体積の制御にはユビキチン-プロテアソーム系が関与することが示唆された。

## (2) 細胞質中での核小体の消失／分散

第二減数分裂中期へと成熟した卵母細胞の細胞質に核小体を顕微注入すると、核小体は注入 4 時間後にはほぼ消失した。成熟培養前の卵核胞期の卵母細胞の核小体を顕微操作によって抜き取った後、減数分裂の再開を停止させた卵核胞期の卵母細胞の細胞質に注入すると、核小体は細胞質中で一旦消失した後、卵母細胞の核内で小さな核小体が再び形成され始め、4 時間後には約 70% の卵母細胞の核内で核小体が再構築された。

2 細胞期胚は、卵母細胞と同様な緊密な形態の核小体を有するが、卵母細胞の核小体が 1 個であるのに対して、2 細胞期胚の核には複数個 (2~5 個: 82%) の核小体が含まれていた。核小体の体積を測定したところ、2 細胞期胚の 1 割球当たりの核小体の体積の合計は、卵核胞期の卵母細胞の核小体の体積の約 1/2 であり、卵母細胞の核小体の構成成分は、発生後の胚へと受け継がれると考えられた。2 細胞期胚を 4,000 $\times$ g で 10 分間、遠心分離すると核小体は 1 個となった。

遠心分離後の 2 細胞期胚から顕微操作によって抜き取った核小体を、成熟させた脱核小体卵母細胞の細胞質に注入すると、核小体は細胞質中で消失した。この卵母細胞を電気刺激によって単為発生させると、胚の核内には核小体が形成された。

## (3) 核小体の新規な染色法の開発

卵母細胞の核小体を染色するヘマトキシリン染色法を考案し、成熟過程の卵母細胞の核小体を染色した。卵核胞崩壊直前まで卵母細胞の核小体が青染されて観察されたが、その直径は卵核胞崩壊に先立って有意に減少した。

以上の結果から、卵母細胞の核小体は卵母細胞の発育にともなって体積を減少させるが、体積の制御にはユビキチン-プロテアソーム系が関与すること、卵母細胞の成熟に伴って核小体の体積はさらに減少することが明らかとなった。また、核から細胞質へと移された核小体は、卵母細胞の細胞周期にかかわらず、細胞質中で消失するが、卵母細胞に核が存在する場合は、核小体は核中へと再び戻ることが示された。

## 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 3 件)

- ① Kyogoku H, Ogushi S, Miyano T. Nucleoli from two-cell embryos support the development of enucleolated germinal vesicle oocytes in the pig. *Biology of Reproduction*, 査読有, 87 巻, 2012, 113, 1-6  
DOI:10.1095/biolreprod.112.103119
- ② Jitsukawa M, Kyogoku H, Ogushi S, Miyano T. Effects of proteasome inhibitors on the nucleolar size of porcine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有, 58 巻, 2012, 162-166  
DOI: 10.1262/jrd.11-134A
- ③ Kyogoku H, Ogushi S, Miyano T, Fulka J Jr. Nucleoli from growing oocytes inhibit the maturation of enucleolated, full-grown oocytes in the pig. *Molecular Reproduction and Development*, 査読有, 78 巻, 2011, 426-435  
DOI: 10.1002/mrd.21320

[学会発表] (計 5 件)

- ① Kyogoku H, Miyano T. Nucleolus exchange between 2-cell embryos and germinal vesicle oocytes. The 9th Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society, 2012 年 10 月 23~28 日, EDSA Shangri-La Hotel (マニラ, フィリピン)
- ② 京極博久, 大串素雅子, 宮野 隆. 2 細胞期胚の核小体に置換したブタ卵母細胞の発生. 第 105 回日本繁殖生物学会大会, 2012 年 9 月 5~8 日, 筑波大学(つくば市)
- ③ 農端理壽, 京極博久, 宮野 隆. ブタ卵母

細胞の成熟過程における核小体の直径の変化. 第 105 回日本繁殖生物学会大会, 2012 年 9 月 5~8 日, 筑波大学(つくば市)

- ④ Miyano T, Ogushi S, Kyogoku H, Fulka J Jr. Nuclei and nucleoli in pig oocytes. The 8th Annual Meeting of Asian Reproductive Biotechnology Society, 2011 年 10 月 26 日, Lijiang Waterfall Hotel (桂林, 中国)
- ⑤ Kyogoku H, Ogushi S, Miyano T, Fulka J Jr. Growing-oocyte nucleolus has the ability to inhibit meiotic progression in pig oocytes. 2011 年 10 月 27 日, Lijiang Waterfall Hotel (桂林, 中国)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮野 隆 (MIYANO TAKASHI)

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号 : 80200195