生 物 コ ー ナ

アフリカツメガエル卵成熟過程における細胞骨格制御の分子機構 卵細胞内で一方向に進行する細胞骨格再構築

私たちヒトを含め脊椎動物においては、精子と卵との融合により生じた受精卵が個体発生の出発点となる。精子と卵は生殖細胞が減数分裂を行うことにより形成されるが、その形成過程は大きく異なる。一つの一次精母細胞からは4つの精子が形成されるが、一つの一次卵母細胞からは一つの卵しか形成されない。これは、卵が減数分裂過程において卵と極体という際だった非対称分裂を行うためである。この卵の減数分裂過程を卵成熟過程と呼ぶ。ここでは、この過程で起こる紡錘体形成に至る細胞骨格成分の相互作用について、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵成熟過程に焦点を当て新たな知見を紹介し、その分子機構について考察したい。

なぜ *Xenopus* 卵母細胞なのか？

卵成熟過程における細胞骨格の果たす役割については、これまで哺乳類のマウスや棘皮動物のヒトデの卵母細胞での研究が重要な知見を提示してきた (Namgoong & Kim⁽¹⁾)。いずれにおいても、微小管系細胞骨格とアクチン系細胞骨格の相互作用が染色体の分配装置である紡錘体形成に深くかかわっていることが見いだされてきたが、その相互作用の局面はそれぞれで異なっている。マウスでは紡錘体の表層への局在化や卵細胞質全体で起こっている極性のある流れにアクチン繊維

の存在が必要であることが示され、ヒトデ卵では、核膜の崩壊の直前に形成される核内アクチン繊維のネットワークが、細胞質全体に分散してしまわないように染色体を捕捉し、微小管への受け渡しに働くという報告であった (Mori *et al.*⁽²⁾)。このように、動物種ごとに細胞骨格の働きは多様で、卵成熟という重要な生命現象のより深い理解のためには、さまざまな動物種で解析し知見を積み上げていくことが必要であると考えられる。*Xenopus* 卵母細胞は、これまでさまざまな生命現象の解析に用いられてきた。特に、細胞質をほとんど希釈することなく得られる *Xenopus* 卵抽出液は、紡錘体の形成や細胞周期のメカニズムの研究だけに留まらず、核膜再構成、核内外の物質輸送、タンパク質の合成制御機構、細胞分化の初期化などの研究にも非常に有用なモデル系を提供してきた。しかしながら、*Xenopus* 卵母細胞自体の卵成熟過程での細胞骨格間の相互作用の機構についてはほとんど研究されていなかったのである。その原因の一つには、卵が巨大で不透明なことが挙げられる。したがって今のところ、ライブイメージングの手法を卵母細胞内部の観察には用いることができない。小さく透明なウニの分裂の研究で多大な貢献をなされた故岡 勝磨先生は、「カエル卵？ あれは炭団だよ」と仰ったと聞く (炭団 (タドン) とは炭の粉を固めて作られる固形燃料で、昭和30年代生まれには馴染みが深い)。一面

言い得て妙ではあるが、巨大な卵ならではのシステムがきっと隠れているに違いないと考え、研究を進めていくことにした。単純素朴な考えだが、物質の拡散距離は時間の平方根に比例するので、巨大な卵であればあるほど、ある現象が効率よく進行するためには方向性をもった調節タンパク質の移動が必要となるはずである。

Xenopus 卵成熟過程の進行

まずは図1で *Xenopus* の卵成熟過程を概観しよう。卵巣内の生殖細胞は一次卵母細胞になったところで細胞周期の進行を停止する。この時期は第一減数分裂前期で、体細胞分裂でいえばG2期に相当する。この時期に多くの動物では受精後の発生のために必要な物質をその細胞内に蓄積し成長する。十分に成長した卵母細胞を卵巣から単離してプロゲステロン (progesterone) を加えた生理的塩溶液中でインキュベートすると、卵母細胞は減数分裂を再開し卵成熟過程に入る。卵成熟の再開により卵母細胞は第一減数分裂中期へと進行し始めるが、まず核膜の崩壊 (NEBD: nuclear envelope breakdown) が誘起される。NEBDが始まると動物極頂点付近の表層に成熟斑と呼ばれる白斑が生じる。これにより卵成熟を開始したことが卵母細胞の外観から判断できる。その後、後述するように Microtubule-organizing center and

◇◇◇ コ ラ ム ◇◇◇

卵成熟過程の分子機構に関しては、日本人の研究者の貢献が大きい。細胞周期研究の端緒となった卵成熟の研究は1971年の増井博士によるカエル卵でのMaturation-promoting factor (MPF) とCytostatic factor (CSF) の提唱から始まった。その後、分裂酵母 (*S. pombe*) の温度感受性細胞周期変異株 (*cdc* 変異体) を用いた研究と合流し、MPFはCdc2 (Cdk1) とcyclin Bの複合体で、真核生物のM期進行を司る普遍的なタンパク質キナーゼであることが明らかになった。MPFが一連の標的タンパク質をリン酸化することで、減数分裂でも体細胞分裂においても分裂期が開始され維持される。一方、CSFは原がん遺伝子c-Mosタンパク質の合成が引き金となるMAP (microtubule-associated proteinsが元々の意味で近年はmitogen-activated proteinの略とする) kinase経路がその実体であること、そして最終的に、cyclin Bをユビキチン化して分解へと導くユビキチン化酵素APC (anaphase-promoting complex)/cyclosomeの活性を抑制するErp1/Emi2という因子をリン酸化して活性化することで、MPF活性の低下を防ぎ分裂期を維持していることが明らかにされた。これらの研究では、東京工業大学の岸本博士と九州大学の佐方博士の研究グループの貢

献が極めて大きい。特に、Erp1/Emi2の働きを明らかにした佐方博士の研究グループの2011年の論文 (*Dev. Cell*, **21**, 506-519, 2011) は、その膨大かつ緻密な実験と論理展開に感動を覚えるもので一読すべきである。また、ヒトデ卵のMPFの発見者でもある岸本博士の研究グループの2012年の論文 (*Nat. commun.*, DOI: 10.1038/ncomms2062) は、増井博士が提唱したMPF活性の実体とはCdc2/Cyclin Bだけではなく、それにGreatwall kinaseが加わったものと看破したものである。MPFイコールCdc2/Cyclin Bでは説明できなかった普通は顧みられることのない現象を見過ごすことなく見つめ続け、40年来の問題に決着をつけたものであり、研究者としてのあり方に感銘を覚える。研究とは何かを考えるうえで大いに参考になる論文で、これも一読を薦めたい。こうした基礎研究は、生命現象を司る分子機構を明らかにしたいという研究者の情熱に根差すもので、たとえば医療のような社会的な応用を目指してのものではない。しかし、MPFやCSFのような減数分裂進行の核となる因子が明らかになることにより、卵内の構造変化がどのように制御されているのか、といったわれわれの研究も含め、新たな研究が展開されるわけである。そしてそのような研究が展開していくなかで、いわゆる社会的に役立つ応用研究の芽が育まれていくと考えられる。

図1 ■ *Xenopus* 卵母細胞の卵成熟過程を模式的に示す

Progesterone 添加後およそ6時間で成熟斑の形成が確認されるが、この時間経過は卵母細胞によってかなりの幅があり、早いものでは3時間で始まる場合もある。図では第一減数分裂中期紡錘体形成は省略してある。図中卵核胞の写真は、単離した卵核胞を Alexa-488 標識 phalloidin (アクチン繊維が染まる) と抗lamin B抗体で蛍光染色したもので、MTOC-TMAの写真は成熟斑形成直後の卵母細胞の凍結切片の抗tubulin抗体による染色像である。

transient microtubule array (MTOC-TMA) と呼ばれる構造が染色体を捉え動物極へと移動していく。これは形を変えて表層直下で第一減数分裂中期

紡錘体となり、後期、終期へと染色体の分配が進行し、僅かな細胞質とともに一方の染色体のセットを含む第一極体が放出される。卵母細胞の染色体は

核膜に包まれることはなく、引き続き第二減数分裂中期紡錘体へと組み込まれていく。そして第二減数分裂中期紡錘体は細胞膜直下にアンカーされ、再

び細胞周期は停止する。生体ではこの第二減数分裂中期で停止した状態で排卵され受精を待つことになる。そしてこの状態の卵がいわゆる未受精卵である。以上のような減数分裂の再開には maturation-promoting factor (MPF) が、第二減数分裂中期での再停止には Cytostatic factor (CSF) がそれぞれ働いている (コラム参照)。

卵成熟過程における細胞内構造の変化

卵母細胞内には巨大な核が存在し、特別に卵核胞とも呼ばれている。*Xenopus* では卵母細胞の直径はおよそ 1.2mm であるが、核の直径は 0.4mm もある。このような巨大な核をもつという事は動物の卵母細胞に共通の現象で、そもそも卵母細胞は一般的な体細胞に比べると極めて大きい細胞であるが、その大きさに比例して核の直径も大きくなっている。核膜は、中間径繊維のカテゴリーに属するラミン (lamin) と呼ばれるタンパク質が集合してできた繊維構造により裏打ちされ、そして *Xenopus* の場合、核内にはアクチン繊維の密なメッシュ構造が存在している (図2, AおよびB)。このように未成熟卵母細胞の核内にアクチン繊維が密に存在しているのは、今のところ両生類の卵母細胞の特徴ではかの動物では報告されていない。アクチンの一次構造中には核外移行シグナル配列が存在し、核外輸送を担う exportin

6というタンパク質によりフリーのアクチン分子は本来核から積極的に排除される運命にある。ところが、*Xenopus* 卵母細胞には exportin 6が存在しないためアクチンは核内にとどまり、アクチン繊維の密なメッシュ構造が形成可能なのである。本来存在しない exportin 6を卵母細胞内で人為的に発現させると核内アクチン繊維は消失し、核は非常に壊れやすくなってしまうことが報告されている (Bohnsack *et al.*⁽³⁾)。

さて、プロゲステロン添加により卵成熟を誘起させるとどのような変化が起こるであろうか? 図2Aに示すように順を追って見ていこう。NEBDが起こる直前には核直下の植物極側細胞質にアクチン繊維の集積が始まる。そして、その部位に微小管も集積してくる。やがて微小管の集積が強まり、そこから核の方向へも微小管の伸長が起こる。これがMTOC-TMAである。この微小管の核方向への伸長が始まる時には、核膜の崩壊が植物極側から開始している (図2, C)。このような方向性のある核膜の崩壊過程は、*Xenopus* 卵母細胞で初めて観察された。核膜の崩壊に伴い微小管は核内へと伸長していくが、この微小管が存在する領域からはアクチン繊維が消失している。つまり、核内においては微小管と核内アクチン繊維は重ならず相補的な局在を示す (図2, D)。こうした核膜の消失からMTOC-TMAの形成の過程で、核の体積は減少していく。つまり、球状の核内アクチン繊維の

メッシュは収縮性の構造なのである。さらに、MTOC-TMAは動物極方向へ移動し、動物極側の核膜も崩壊し、核内アクチン繊維は植物極側からさらに消失していくが、MTOC-TMAの基部に存在しているアクチン繊維束は残り続ける。また、MTOC-TMAもコンパクトな形態に変化して行き、核内アクチン繊維が完全に消失すると、MTOC-TMAは染色体とともに紡錘体へとその形態を変えていく (図2, E)。

アクチン繊維形成の動的な振る舞いとラミン・微小管との相互作用

さて、問題はこのような進行していく構造形成がどのように制御されているかである。アクチン繊維が担う構造変化のためには、既存の繊維を壊し、必要な場所に新たに再構築することが求められるわけだが、そのようなアクチン繊維形成のターンオーバーを担う因子としてADF (actin-depolymerizing factor)/cofilinが知られている (図3, A)。ADF/cofilinは分子量19kDaほどの小さなタンパク質であるが、酵母からヒトまで真核生物に存在する生存に必須のタンパク質で、その生化学的な機能はアクチン分子と1対1で結合してアクチン繊維を切断・脱重合することである (Kanellos & Frame⁽⁴⁾)。脱重合したアクチンは再び重合可能なアクチンに再生され、Arp2/3 (actin-related protein 2 and 3) complexなど

図2 ■ A. 卵成熟過程における細胞骨格構造の変化を模式的に示す。B. 卵成熟開始初期の卵母細胞の凍結切片の Alexa-488 標識 phalloidin と抗 lamin B 抗体で蛍光二重染色したもの。核の植物極側細胞質に細胞質アクチン繊維の集積が見られる (矢印)。C. 卵核崩壊時の卵母細胞の凍結切片の抗 lamin B 抗体による蛍光染色像。Lamin 繊維の分散が植物極から開始していることがわかる。D. MTOC-TMA 形成時の卵母細胞の凍結切片を rhodamine-phalloidin と抗 tubulin 抗体で蛍光二重染色したもの。核内アクチン繊維と MTOC-TMA が相補的なパターンを示していることが明らかである。MTOC 基部は微小管とアクチン繊維が共局在しているため黄色の染色像となっている。E. 卵母細胞表層直下に形成された第二減数分裂中期の紡錘体の DAPI (DNA を染色) と抗 tubulin 抗体による蛍光染色像

のアクチン重合核形成因子の働きにより新たなアクチン繊維の構築へと組み込まれていく。われわれはまず、卵母細胞内のアクチン繊維形成のダイナミクスを抑制するために、アクチン繊維に結合し繊維を安定化してしまうキノコ毒の一種であるファロイジン (phalloidin) を卵母細胞に注入してからプロゲステロン処理を行った。その結果は予期せぬものであった (図3, B)。MPF 活性や c-Mos は存在するので卵成熟は生化学的には進行しているは間違いないのだが、いつまで経っても核が残存していたのである (Okada *et al.*⁽⁵⁾)。そして、核は収縮して体積は減少しているが核膜を裏打ちするラミ

ン繊維は分散せず残ったままであった (Yamagishi & Abe⁽⁶⁾)。これまでは、MPF がラミンをリン酸化することでラミン繊維は分散し、その結果 NEBD が起こるとされてきた。しかし、アクチン繊維が安定化してしまうとラミン繊維の分散が抑制されてしまうことが示唆されたわけである。近年、LINC (linker of the nucleoskeleton and cytoskeleton) complex と呼ばれる核膜を貫通して細胞質側のアクチン繊維と核膜下のラミン繊維をつなぐタンパク質複合体の存在が明らかにされている。また、ラミン自体がアクチン繊維と結合するという報告もあり、現在こうしたタンパク質との相互作用も視野

に入れ解析を進めている。

一方、卵母細胞内の ADF/cofilin は全体のおよそ 80% がリン酸化され、不活性な状態で存在するが、卵成熟の進行に伴って脱リン酸化されていくことを見だしていた (Iwase *et al.*⁽⁷⁾)。そこで、リン酸化された ADF/cofilin を脱リン酸化して活性化する ADF/cofilin に特異的な脱リン酸化酵素である Slingshot (SSH) に特異的に結合する抗体を卵母細胞に注入して機能阻害を行った (図3, C)。その結果、NEBD は起こるものの MTOC-TMA の形成がほとんど起こらず、核内アクチン繊維の崩壊が著しく抑制されることが明らかとなった (Yamagishi & Abe⁽⁶⁾)。

図3 ■ A. ADF/cofilinおよびWASH, Arp2/3 complexによるアクチン繊維形成の動的制御機構の模式図。ADF/cofilinはLIM-kinaseによりリン酸化され不活性型となるが、Slingshot phosphataseにより脱リン酸化されると活性型となり既存のアクチン繊維を切断・脱重合する。ADF/cofilinと結合したモノマーのアクチンは他の因子との相互作用により速やかにADF/cofilinから解離し重合可能なアクチンとなる。次いでWASHなどのアクチン重合核形成促進因子がArp2/3 complexを活性化し、新たなアクチン繊維の形成が促進される。これらの機構が必要な場所で行われることにより、連続したアクチン繊維の集合・脱集合がダイナミックに引き起こされる。B. Phalloidinを注入した卵母細胞では、卵成熟を誘導しても核(GV)が崩壊しない。controlは同時期の注入していない卵母細胞で完全に核の崩壊が起こっている。C. Slingshotに対する抗体を注入した卵母細胞で、卵成熟を誘導してもMTOC-TMAの形成が阻害され核内アクチン繊維が残存し続ける。D. 微小管形成阻害剤nocodazole処理を行った卵母細胞では、MTOC-TMAの形成が起こらず、核内アクチン繊維の消失が阻害される

核内アクチン繊維はメッシュの密度は減少しているが収縮し球状のまま残存していた。この結果から、核内アクチン繊維の植物極側からの消失にはMTOC-TMAの存在が必要ではないかと考え、今度は卵母細胞を微小管の重合阻害剤であるノコダゾール(nocodazole)で処理して成熟を誘起した。すると、NEBDは正常に起こるがMTOC-TMAの形成は阻害され、核内アクチン繊維の植物極側からの消失もまた抑制されることが確かめられた

(図3, D)。やはり核内アクチン繊維の植物極側からの消失には、MTOC-TMAの存在が必要であると考えられる。

MTOC-TMAの極性の形成と維持

MTOC-TMAという構造は*Xenopus*卵母細胞に特異的な構造である。マウスやヒトのような直径0.2mm位の小型の卵母細胞では見られない構造で、恐らくは卵母細胞の大きさゆえ

に必要な構造であると考えられる。これまで述べてきたように*Xenopus*卵母細胞では、核の植物極側から動物極側に向けて一方向に、つまり極性をもって構造変化が進行していく。これは最終的に紡錘体を形成するためにとっても効率的な現象であると思われる。染色体自身は核内アクチン繊維のメッシュの外に出ることはなく、また、MTOC-TMAの動物極方向への移動につれて、その基部に位置するようになる。つまり、MTOC-TMAに依存し

てアクチンメッシュが植物極側から消失していくため、染色体は間違いなく微小管と相互作用できるように保たれ、やがて紡錘体へと組み込まれていくことが可能となる。さて、そうするとMTOCからどのような仕組みで微小管繊維束（TMA）は必ず核の方向へのみ伸長することができるのだろうか？

われわれは独自にMTOC-TMAの形成に関与するタンパク質としてArp2/3 complex活性化因子であるWASH（Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) and suppressor of cyclic AMP receptor (SCAR) homolog）を見いだした。このタンパク質はアクチン繊維と微小管の両者に結合することができる。WASHのアンチセンスオ

リゴDNA注入によるノックダウンや、機能ドメインの欠損変異体注入などの解析から、WASHがMTOC-TMAの整列に寄与していることが明らかになった（Yamagishi & Abe⁽⁸⁾）。しかし、WASHはMTOC-TMAのアクチン繊維や微小管とは直接結合しておらず、周辺の細胞質でのアクチン繊維形成を制御することでMTOC-TMAの集合に関与すると考えられる。今後さらに解析を進め、巨大な卵母細胞の中で、極性をもって進行する一連の細胞骨格成分の相互作用の全貌を明らかにし、紡錘体形成に至る卵成熟過程の分子機構の普遍性と多様性の理解を深めていきたいと考えている。

1) S. Namgoong & N. Kim: *Cell Cycle*, **15**, 1830 (2016).

- 2) M. Mori, N. Monnier, N. Daigle, M. Bathe, J. Ellenberg & P. Lénárt: *Curr. Biol.*, **21**, 606 (2011).
- 3) M. T. Bohnsack, T. Stüven, C. Kuhn, V. C. Cordes & D. A. Görlich: *Nat. Cell Biol.*, **8**, 257 (2006).
- 4) G. Kanellos & M. C. Frame: *J. Cell Sci.*, **129**, 3211 (2016).
- 5) I. Okada, S. Fujiki, S. Iwase & H. Abe: *Cytoskeleton* (Hoboken), **69**, 312 (2012).
- 6) Y. Yamagishi & H. Abe: *Mol. Biol. Cell*, **26**, 4387 (2015).
- 7) S. Iwase, R. Sato, P. J. De Bock, K. Gevaert, S. Fujiki, T. Tawada, M. Kuchitsu, Y. Yamagishi, S. Ono & H. Abe: *Mol. Biol. Cell*, **24**, 1933 (2013).
- 8) Y. Yamagishi & H. Abe: *Cytoskeleton* (Hoboken), **75**, 131 (2018).

（阿部洋志^{*1}，山岸由佳^{*2}，^{*1}千葉大学大学院理学研究院先進理化学専攻生物学コース，^{*2}千葉大学大学院融合科学研究科ナノサイエンス専攻ナノバイオロジーコース）

プロフィール

阿部 洋志 (Hiroshi ABE)

＜略歴＞1985年千葉大学理学部生物学科卒業／1990年同大学大学院自然科学研究科博士課程修了／同年同大学理学部助手／1996年同大学理学部助教授／2007年同大学大学院融合科学研究科准教授／2017年同大学理学研究院准教授，現在に至る＜研究テーマと抱負＞卵成熟過程における細胞骨格の動的制御機構，核内アクチン繊維ダイナミクスの役割＜趣味＞虫採り（甲虫・カメムシ・直翅類），山登り，山野徘徊

山岸 由佳 (Yuka YAMAGISHI)

＜略歴＞2013年千葉大学理学部生物学科卒業／2018年同大学大学院融合科学研究科博士課程修了

Copyright © 2019 公益社団法人日本農芸化学会
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.57.256