

甲南大学 博士学位論文

ホヤ 1 細胞期における母性決定因子輸送機構の解明

甲南大学大学院

フロンティアサイエンス研究科 生命化学専攻

後藤 俊志

2022 年 2 月

目次

第 1 章	要旨	5
第 2 章	背景	7
	2-1. 卵形成	7
	2-1-1. 母性効果	7
	2-1-2. 卵成熟過程	7
	2-2. 受精と卵の活性化	9
	2-2-1. 受精によるセカンドメッセンジャーの産生	9
	2-2-2. 多精拒否	11
	2-2-3. 翻訳制御	12
	2-2-4. 減数分裂の再開	12
	2-3. 動物卵における体軸決定機構	14
	2-3-1. 細胞骨格の概略	15
	2-3-2. 細胞骨格依存的な胚軸決定メカニズム	16
	2-4. ホヤの初期発生	18
	2-4-1. ホヤにおける卵の活性化とシグナル伝達	18
	2-4-2. ホヤの前後軸形成	19
	2-4-3. 細胞骨格依存的な細胞質および母性決定因子の移動	20
	2-4-4. 異なる局在様式を示す母性決定因子群	21
	2-5. 研究目的	23
第 3 章	ホヤ卵における微小管可視化条件の最適化	25
	3-1. 序論	25
	3-2. 実験操作	25
	3-2-1. 実験動物	25
	3-2-2. 免疫蛍光染色	25
	3-2-3. 画像解析	26
	3-3. 実験結果	26
	3-3-1. ホヤ卵における微小管観察条件の最適化	26
	3-3-2. ホヤ 1 細胞期における新規微小管構造の発見	29

3-3-3.	1 細胞期における新規微小管構造と myoplasm の 時空間的解析	32
3-4.	考察	34
第 4 章	ホヤ 1 細胞期における微小管構造の制御機構	36
4-1.	序論	36
4-2.	実験操作	36
4-2-1.	実験動物	36
4-2-2.	顕微注入法	37
4-2-3.	薬剤添加実験	37
4-2-4.	卵の賦活化	37
4-2-5.	免疫蛍光染色	38
4-2-6.	画像解析	38
4-3.	実験結果	39
4-3-1.	新規微小管構造の挙動と減数分裂進行の相関解析	39
4-3-2.	各細胞周期における新規微小管構造の微小管 ダイナミクスの解析	41
4-3-3.	第 1 細胞質再配置における微小管構造の 制御機構の解析	44
4-3-4.	第 2 細胞質再配置における微小管構造の 制御機構の解析	47
4-4.	考察	53
第 5 章	細胞質再配置における myoplasm を構成する細胞小器官および 母性 mRNA の関連性	58
5-1.	序論	58
5-2.	実験操作	59
5-2-1.	実験動物	59
5-2-2.	顕微注入法	59
5-2-3.	小胞体およびミトコンドリアの同時染色	59
5-2-4.	小胞体および微小管の同時染色	60

5-2-5.	Whole-mount Fluorescence <i>in situ</i> hybridization	60
5-2-6.	免疫蛍光染色と Fluorescence <i>in situ</i> hybridization の同時染色	61
5-2-7.	単離表層における免疫蛍光染色と Fluorescence <i>in situ</i> hybridization の同時染色	62
5-2-8.	Focus ion beam-scanning electron microscopy (FIB-SEM) 観察	63
5-2-9.	共焦点顕微鏡観察および画像解析	63
5-3.	実験結果	64
5-3-1.	1 細胞期における ER およびミトコンドリアの 時空間的解析	64
5-3-2.	第 2 細胞質再配置における ER と表層微小管構造の 時空間的解析	68
5-3-3.	1 細胞期における ER と母性 mRNA の時空間的解析	70
5-3-4.	卵割期における ER と母性 mRNA の時空間的解析	75
5-4.	考察	77
第 6 章	ホヤ 1 細胞期におけるアクチン繊維の役割	81
6-1.	序論	81
6-2.	実験操作	81
6-2-1.	実験動物	81
6-2-2.	薬剤添加実験	81
6-2-3.	アクチン繊維の観察	82
6-2-4.	免疫蛍光染色	82
6-2-5.	Whole-mount Fluorescence <i>in situ</i> hybridization	82
6-2-6.	免疫蛍光染色と Fluorescence <i>in situ</i> hybridization の同時染色	83
6-2-7.	顕微鏡観察および画像解析	83
6-3.	実験結果	84
6-3-1.	1 細胞期におけるアクチン繊維の時空間的解析	84
6-3-2.	CytB 処理による微小管構造への影響を解析	85

6-3-3. CytB 処理による myoplasm の移動への影響を解析	87
6-3-4. 1 細胞期における CytB 処理が体軸形成へ与える 影響を解析	91
6-4. 考察	94
第 7 章 結果のまとめ	96
第 8 章 総論	100
8-1. Microtubule domain	100
8-2. 細胞質再配置における Microtubule domain の機能	101
8-3. CAMP の機能	102
8-4. ホヤ卵における Translocational machinery の存在	103
8-5. Translocational Machinery の制御系	104
8-6. 胚軸決定メカニズムの種間共通性	106
8-7. 母性 mRNA の発現制御	108
8-8. 本研究で得られた知見が他分野へもたらす影響の可能性	111
8-9. 本研究で開発された可視化技術が他分野へもたらす影響 の可能性	111
謝辞	113
参考文献	114
業績リスト	128

第1章 要旨

動物胚の形態形成は、胚の前後や背腹の向きを決定する体軸形成が端緒となる。この体軸形成には、胚内における特定の母性決定因子（タンパク質、mRNA）が偏在することで生じる非対称性が必須である。胚に非対称性が生じるメカニズムは生物固有のものであるが、多くの動物で細胞骨格に依存していることが知られている。従って、動物の形態形成を理解するためには、細胞骨格依存的な物質輸送によって胚に非対称性が生じるメカニズムを理解することが強く求められる。

ホヤ未受精卵では、明確な境界を持った2つのオルガネラドメイン（ミトコンドリアおよびER）やその領域に存在する母性 mRNA により構成される myoplasm と呼ばれる細胞質領域が卵表層下で放射相称に存在し、受精後、1細胞期の際に後極へと移動することで非対称化することが知られている。細胞質再配置と呼ばれるこの現象は前後軸形成や細胞分化に必須であることから、発生のもっとも初期に見られる運命決定機構とされている。また、巨大な細胞である卵の中で細胞質の塊が1細胞期という短期間で移動することから、新規の細胞内物質輸送メカニズムとしてそのメカニズムの解明は注目される。しかし、“アクチン依存的な第1段階と微小管依存的な第2段階により myoplasm は後極へと移動する”といった細胞質再配置の概論的なメカニズムの理解はされているものの、移動に関わるこれら細胞骨格の構造やその制御機構、母性 mRNA の翻訳制御など解明されていない分子メカニズムが多く残されている。そこで私は、細胞質再配置の分子メカニズムを明らかにするため、可視化技術の改良を中心とした研究戦略により、細胞骨格や myoplasm を構成するオルガネラ、母性 mRNA の時空間的な情報や相互作用をより精細な視点で解析した。

まず、細胞質再配置の駆動力を生み出す細胞骨格構造を明らかにするために、微小管観察手法の最適化を行なった。この手法を用いた観察から、第2段階において後極表層で形成される発達したレーン様の微小管構造 Cortical Array of Microtubules in Posterior-vegetal region (CAMP)やメッシュワーク状の微小管が高密度に集積した Deeply Extended subcortical microtubule Meshwork (DEM)や Transiently Accumulated microtubule Fragments (TAF)を発見した。特に、CAMPの挙動は第2段階における myoplasm の挙動と非常によく相関しており、後極への移動の駆動力を生み出す構造として期待されるものである。

次に、発見した微小管構造の経時変化を詳細に分類することで、微小管構造の形成と消失が減数分裂と強い相関を持っていることを明らかにした。この結果から、細胞質再配置における微小管構造の制御が減数分裂の再開を含む卵の

賦活化と関係していることが予想されたため、各種阻害剤の添加実験によるシグナル経路の解析を行なった。まず、受精直後の Ca^{2+} シグナルや第 1 段階におけるアクチン繊維の植物極での局在が DEM や TAF の形成を制御していることを明らかにした。さらに、CAMP は細胞周期調節因子である Cyclin dependent kinase (CDK) および Mitogen activating protein kinase (MAPK) による制御を受けていることを明らかにした。従って、受精を引き金とする種々のシグナル伝達が卵の賦活化を制御すると共に、細胞質再配置において微小管構造の形成と消失を制御するペースメーカーとなっていることが考えられる。

さらに、複数分子を同時に観察することが可能な染色法を開発することで、CAMP と myoplasm を構成するオルガネラや母性 mRNA の関係を解析したところ、CAMP は myoplasm の ER 領域内に形成され、それらの挙動は強い類似性を示すことを明らかにした。この結果は、ER の後極への移動には CAMP が関係していることを示唆するものである。また、第 1 段階終了以降に myoplasm 内で ER の微細構造や母性 mRNA の局在が大きく変化することも明らかにした。ER は翻訳の場となるオルガネラであり、また mRNA の局在様式は翻訳制御と密接に関係することから、これらの結果は母性 mRNA の翻訳制御の理解に重要な知見である。

また、アクチン観察手法の最適化により、第 1 段階で働く植物極のアクチン繊維の局在が第 2 段階開始時まで維持されていることを発見し、阻害剤による実験からこの局在が第 2 段階を制御していることを明らかにした。この結果は、アクチン繊維の新たな機能を明らかにしたものであり、myoplasm がアクチン繊維依存的な第 1 段階から微小管依存的な第 2 段階へと切り替わる遷移過程で、この 2 つの細胞骨格間で何らかの相互作用が存在していることを示唆している。

以上の結果は、卵という巨大な細胞において、受精に伴うシグナル伝達が適切なタイミングで細胞骨格を制御し、オルガネラや mRNA がそれぞれ適切な細胞骨格を巧妙に乗り換えながら適切な場所へと移動する複雑でかつ洗練された物質輸送が存在していることを示している。一方で、物質輸送は体細胞においても普遍的に見られる現象であり、ホヤ卵内における細胞質再配置のより詳細な分子メカニズムを明らかにすることで、形態形成に関する新しい理解を得られるだけでなく、体細胞の物質輸送における未知のメカニズム解明に貢献することも期待される。

第2章 背景

2-1. 卵形成

2-1-1. 母性効果

母性効果は、卵形成過程で蓄積された母親のゲノムを由来とする遺伝子産物（母性因子）が、発生過程で何らかの影響を及ぼす現象である。いくつかの種では、母性因子の局在により胚軸が決定されることなどが報告されており、母性因子は発生現象の重要な局面では母性決定因子とも称され、その実体と局在化メカニズムを明らかにすることが、形態形成を理解する上で必須のものとなっている（Miller et al., 1999; Lyczak et al., 2002; Tao et al., 2005; Prodon et al., 2007; Nance and Zallen, 2011; Tran et al., 2012）。また、細胞の分化決定にも大きく寄与し、特に生殖細胞への分化決定に関する着目度は大きい（Lyczak et al., 2002; Shirai-Kurabayashi et al., 2006; Nance and Zallen, 2011）。有性生殖を行う動物の生殖細胞は、胚発生の初期に分化決定される始原生殖細胞（Primordial Germ Cells: PGC）をその起源とする（Johnson and Alberio, 2015）。従って、種の永続性が担保されるためには、PGC の維持が確実に行われることが必要不可欠となる。一方で、種間で見られる PGC の特性や分化決定に至る過程の違いは、生物の多様性や進化の解明への糸口となる。PGC への分化決定様式は動物固有でありながらも以下の二種類に大別される。1) ショウジョウバエやカエルのように母性決定因子群を取り込んだ細胞が PGC へと分化する様式（Dansereau and Lasko, 2008 ; Johnson and Alberio, 2015）。2) マウスをはじめとする哺乳動物が、原始外胚葉（Epiblast）の分泌する BMP4 などのサイトカインにより PGC が分化誘導される様式（Saitou and Yamaji, 2012）。特に前者では、母性 mRNA や母性タンパク質を決定因子とすることや、1細胞期の卵内ですでに多様な分子の働きにより決定因子を正確に偏在化させる卵内の動きがみられるため、母性効果の影響を大きく受けていると考えられる。以上より、母性効果に関する知見の集積は発生学だけでなく進化学を含めた多様な研究領域を成熟させることが期待される。本章では、このような背景から母性効果に関する知見、特にホヤに着目して論述する。

2-1-2. 卵成熟過程

PGC は生殖細胞系列の始原細胞であり、雌へと分化決定された場合は卵母細胞（Oocyte）の元となる卵原細胞（Oogonia）へ、雄の場合では精原細胞

(Spermatogonia) へと分化する (Spiller et al., 2017)。本稿では母性効果に着目していることから、まず卵原細胞から卵母細胞、卵細胞へと成熟する過程に関して論述する。卵原細胞は体細胞分裂 (Mitosis) をおこなっており、卵巣内で盛んに増殖する (Spiller et al., 2017; Fig.2-1)。この増殖期を終えた卵原細胞は減数分裂 (Meiosis) を開始し、卵母細胞となる。減数分裂は1回の DNA 合成の後に2回の連続した分裂が進行することで、自身の染色体数を $2n$ から n に減数させる分裂機構である。1回目の減数分裂の前期 (Prophase I) において、その進行は一時的に停止し、卵母細胞は成長期へと移行する (Ferrell, 1999)。この成長期では、卵黄形成と共に卵母細胞の核である卵核胞 (Germinal Vesicle: GV) が形成され、卵母細胞は巨大な細胞へと成長する (Ferrell, 1999)。十分に成長した卵母細胞は、ホルモン等の刺激を受けて減数分裂が再開され、卵核胞の崩壊 (Germinal Vesicle Breakdown: GVBD) が生じ、凝集したクロマチンとその他 GV material と呼ばれる因子群が卵細胞質中に拡散する (Iwashita et al., 1999; Fig.2-1)。GVBD を起こした核は、中前期 (Prometaphase I)、中期 (Metaphase I)、後期 (Anaphase I)、終期 (Telophase I) と進行し、その後 $2n$ の染色体を第一極体 (1st Polar body: 1st PB) として細胞外へと放出する。その後、2回目の減数分裂が始まり Telophase II を迎え、さらに第二極体 (2nd Polar body: 2nd PB) を放出して、核相が n の接合子となる (Marston and Amon, 2004; Fig.2-1)。ただし、卵として精子との受精が可能になるタイミングは生物種によって異なり、例えばホヤ、ヒトデは Metaphase I (Moriwaki et al., 2013; Levasseur et al., 2013)、カエル、哺乳類は Metaphase II (Tripathi et al., 2010; Sato, 2014)、ウニでは減数分裂が終了した直後の G1 期で (Aze et al., 2010)、それぞれ停止していることが知られている。以上が卵母細胞から成熟卵 (未受精卵) に成るまでの過程であり、卵成熟過程と呼ばれる。

2-2. 受精と卵の活性化

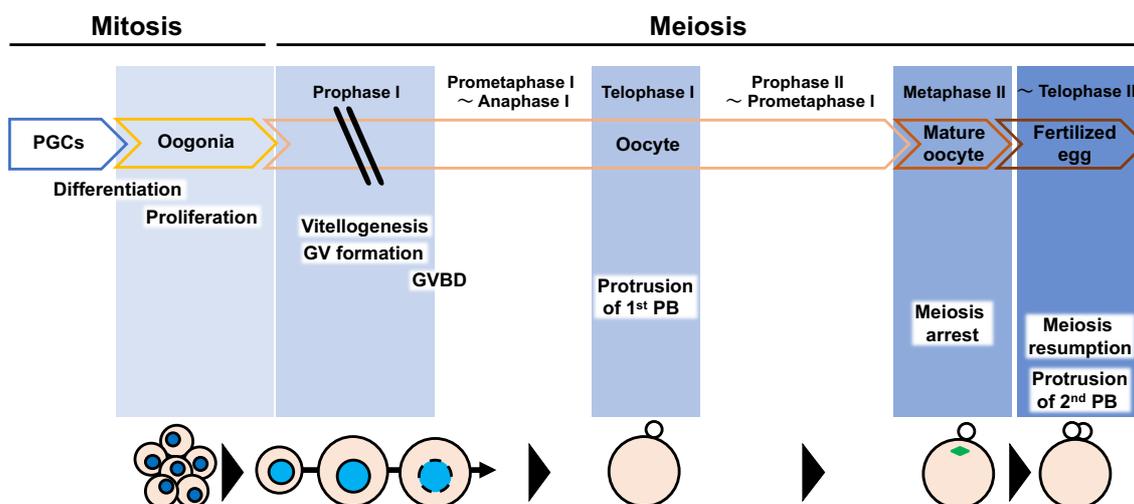


Figure 2-1. 卵成熟過程の模式図

2-1-2 で述べたように成熟卵は、それぞれの動物種で固有の減数分裂周期のステージで停止して休止状態を維持している。受精は、休止状態の卵を活性化させる引き金となり、その際に発生の開始に必要な不可欠である様々な変化を誘導する。この変化は卵の賦活化 (egg activation) と呼ばれ、受精の刺激により多様なシグナル分子の活性が変化することで制御される。賦活化により起こるイベントの代表的なものとして、減数分裂の再開や細胞内カルシウムイオンの上昇、多精拒否などが挙げられる (Horner and Wolfner, 2008)。

2-2-1. 受精によるセカンドメッセンジャーの産生

受精は、精子側のリガンドが卵細胞膜に存在する精子レセプターに受容されることで始まるが、種特異性や自家不和合性などの受精の特殊性のため、その詳細は動物種により多様である。ここでは、マウスを例に以下に詳細を例示する。マウス卵表面は糖タンパク質のマトリックスである透明帯に覆れている。精子はまず、この卵透明帯の糖タンパク質である ZP3 (zona pellucida 3) を認識することで精子の先体に含まれる透明帯を分解する酵素群が放出される (Tokmakov et al., 2014; Georgadaki et al., 2016; Fig.2-2)。この先体反応 (Acrosome reaction) により、精子は透明帯を通過し、卵膜と接触することが可能となる (Georgadaki et al.,

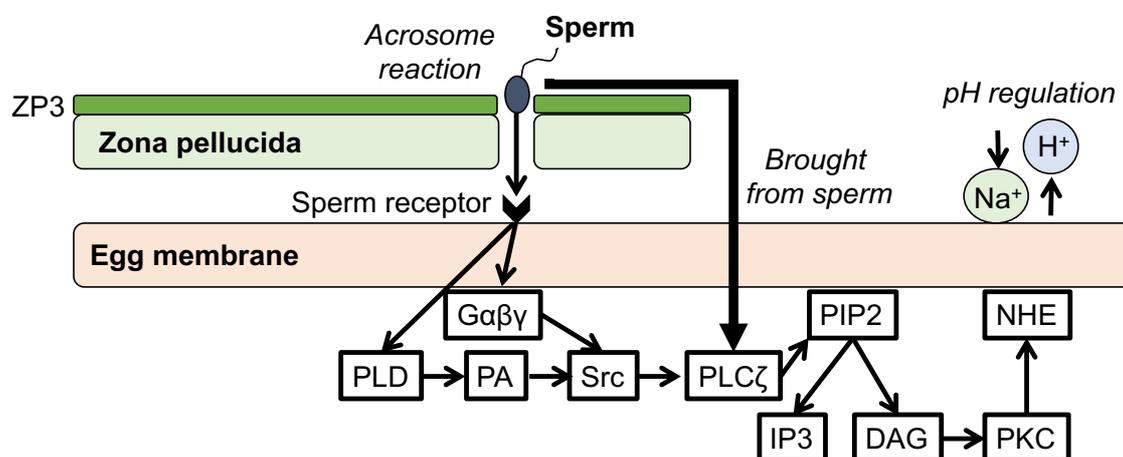


Figure 2-2. 受精からセカンドメッセンジャー産生までのシグナル伝達経路

2016)。その後、精子細胞膜上のリガンドが卵膜上のレセプターに受容される。哺乳類においてはそれぞれ精子側リガンドとして Izumo、卵側レセプターとして Juno が候補として報告されている (Bianchi et al., 2014)。しかし、哺乳類以外の種におけるリガントとレセプターに関しては未だ不明な点が多い。レセプターとリガンドの結合が受精のシグナルとして下流へと伝わると、卵内では発生の

開始に必要な変化が生じる。卵膜に存在する精子受容体の直下で G-protein 共役型レセプター ($G\alpha\beta\gamma$)や Phospholipase D (PLD)と Phosphatidic acid (PA)を介して、チロシンキナーゼである Src を活性化させる(Tokmakov et al., 2014; Fig.2-2)。その後、Src は Phospholipase C zeta (PLC ζ) をリン酸化する(Tokmakov et al., 2014; Fig.2-2)。PLC ζ はカエルなどを除き多くの動物において精子特異的に発現しており、受精を経て精子より卵に持ち込まれることが報告されている (Kashir et al., 2013)。PLC ζ はその後、細胞膜構成成分である phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2)を Inositol trisphosphate (IP3)と Diacylglycerol (DAG)に加水分解する (Parrington et al., 2007; Tokmakov et al., 2014; Fig.2-2)。IP3 は、ER 上に存在する IP3 receptor (IP3R)に結合することで、ER 内に貯蔵されていた細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) を細胞質内へ放出させる (Yoshida et al., 1998; Stricker, 1999; Dumollard et al., 2004; Fig.2-3)。多くの生物の卵ではこのように IP3 が主要な因子となり細胞質内 Ca^{2+} 濃度が上昇する。しかし、一部の生物(ウニ、ヒトデ)では、cyclic ADP-ribose (cADPR)が同じく ER 上に存在するカルシウムイオンチャネル Ryanodine receptor (RyR)に作用することで Ca^{2+} の放出を誘発することが報告されている (Stricker, 1999)。また、 Ca^{2+} 濃度上昇の様式は生物種によって多様であり、精子の進入点より Ca^{2+} 濃度の上昇が始まり、その後卵の反対側へと波状に広がる Ca^{2+} ウェーブや、その直後に見られる Ca^{2+} 濃度が数分程度の間隔で上下する Ca^{2+} オシレーションなどが知られている (Stricker, 1999)。卵内で濃度上昇した

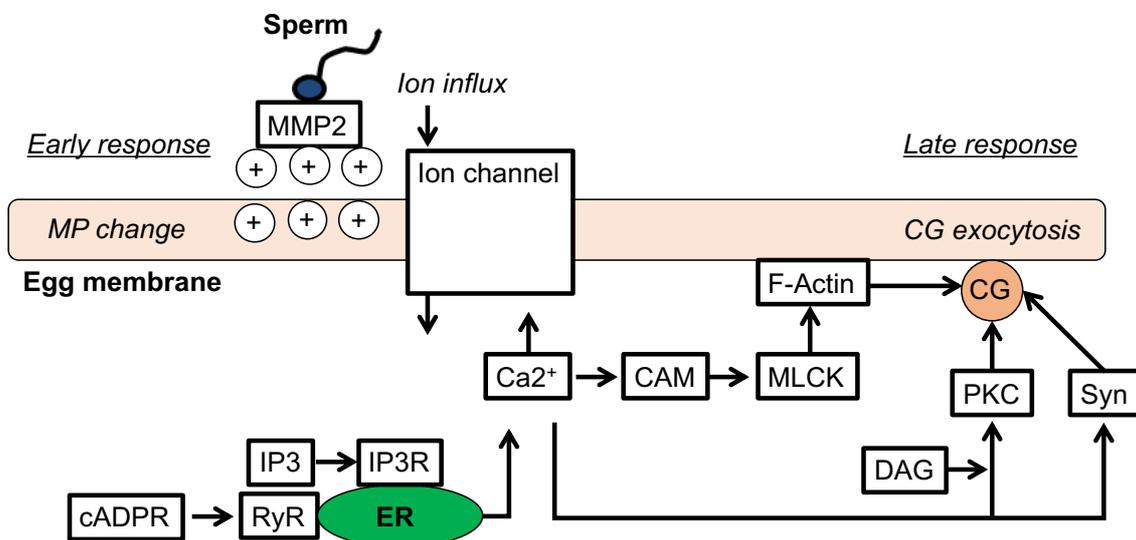


Figure 2-3. 多精拒否における早い反応と遅い反応の制御機構

Ca^{2+} はその後、カルシウム結合タンパク質の活性化を介して、後述する多精拒否や減数分裂の再開などを制御する (Ducibella and Fissore, 2007)。また、PIP2の加水分解により生成したDAGも、卵の賦活化を制御するシグナル伝達に作用する。

つまり、DAG や Ca^{2+} は卵膜近傍で行われる受精の反応を卵内に波及させるセカンドメッセンジャーであり、これらの細胞質内での挙動は卵の賦活化において非常に重要である。

2-2-2. 多精拒否

卵の活性化における代表例として減数分裂の再開と共に多精拒否が挙げられる。多精拒否は複数の精子が進入する多精状態を回避する機構である。これには、2つのメカニズムが働いており早い多精拒否と遅い多精拒否が知られている。早い多精拒否は精子による先体反応後数秒で生じる膜電位の変化により達成される (Iwao et al., 2014; Fig.2-3)。一方遅い多精拒否は、受精後に卵表層粒 (Cortical granule: CG) が細胞膜と融合し崩壊することで内容物が囲卵腔内に放出され、受精膜が形成され、またその受精膜が硬い構造へと変化するなど複数の要因により引き起こされる。

早い反応における細胞膜電位の変化は、 Ca^{2+} によって引き起こされる。細胞膜はリン脂質二重層により構成されているため、膜を介した細胞外からのイオン流入は起こらない。しかし、 Na^+/K^+ ポンプを始めとする輸送タンパク質の働きにより、細胞内は細胞外よりも Na^+ が少なく K^+ 多い状態に保たれているなどのイオンの濃度勾配を生じ、膜電位は負に分極する (静止膜電位; Wozniak and Carlson, 2020)。しかし受精後、細胞膜に存在するイオンチャネルが開口し、特定のイオンが流入することで膜電位 (Membrane potential: MP) は正を示す (脱分極; Wozniak and Carlson, 2020)。この受精後の細胞膜の脱分極をもたらすメカニズムは、生物種によって多様である。ウニや哺乳類では Ca^{2+} に対して感受性を持つイオンチャネルの開口による Na^+ や K^+ の流入が細胞膜の脱分極を引き起こすが、カエル卵では Cl^- チャネルに Ca^{2+} が作用することでチャネルの開口が誘導され、卵周囲の Cl^- が卵内に流入することで卵表面の正電荷が強まることにより引き起こされる (Wozniak and Carlson, 2020)。では、卵の膜電位が変化することでなぜ卵と精子の融合が行われるのか? このメカニズムに関しては未だ不明な点が多い (Jaffe, 2018)。近年カエルにおいては、精子は卵周囲に存在するゼリー層を分解するために、先体に matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) を有しているが、この MMP-2 のある特定のアミノ酸配列が正に帯電しているため、膜電位が正に帯電している卵細胞膜と精子先体との接触は阻害されることが報告されている (Iwao et al., 2014)。このように、受精後、イオンのやり取りにより瞬時に多精拒否が行われるため、これは早い多精拒否反応として知られている (Fig. 2-3)。

遅い反応における表層粒の崩壊とは、表層粒の膜と細胞膜とが融合し、表層粒の内容物が囲卵腔内に放出されることであり、表層粒と細胞膜が接触する必要

がある。この接触は、細胞膜の裏打ちとして配向するアクチン繊維が脱重合することにより細胞膜内面がサイトゾルへと露出することで可能となる (Becker and Hart, 1999; Fig.2-3)。この過程ではまず、CaM 依存的なキナーゼである Myosin light chain kinase (MLCK)が Ca^{2+} 濃度の上昇により活性化され、アクチン依存的なモータータンパク質である Myosin II を制御する (Ducibella and Fissore, 2007)。この Myosin II によってアクチン繊維が卵表層から細胞質側に向かって重合し、これにより生じたアクチン繊維に乏しい表層領域で表層粒が細胞膜へとアクセスすることが可能となる (Becker and Hart, 1999; Ducibella and Fissore, 2007)。さらに表層粒の細胞膜へのアクセスは、 Ca^{2+} シグナルにより別経路で制御される protein kinase C (PKC)や Synaptotagmin I (Syt I)が関係していることも明らかにされている (Eliyahu et al., 2005; Leguia et al., 2006; Fig.2-3)。このように遅い多精拒否の反応は Ca^{2+} シグナルを通じて制御されている。

2-2-3. 翻訳制御

受精の刺激を受け、卵内で生じる変化の一つとして細胞内 pH の上昇が挙げられる。この pH の上昇は受精後のタンパク質合成に必要な変化である。pH の変化は、DAG が PKC を活性化することにより制御されている (Grandin and Charbonneau, 1991)。PKC は DAG により活性化された後、細胞膜上に存在する Na^+/H^+ exchanger (NHE) をリン酸化することで細胞内の H^+ を細胞外へ輸送させると同時に、細胞内に Na^+ を流入させる (Grandin and Charbonneau, 1991; Rangel-Mata et al., 2007; Fig.2-3)。これにより、卵内の pH が上昇することで発生の進行に必要なタンパク質の合成が開始される (Winkler et al., 1980)。

2-2-4. 減数分裂の再開

2-1-2 で論述したように未受精卵では、減数分裂が動物種に特有の細胞周期ステージで停止している (Whitaker, 1996; Hoshino et al., 2010)。例えば、カエル、哺乳類の未受精卵は M 期で停止しており、これは M-phase promoting factor (MPF) である CDK1 (Cyclin Dependent Kinase 1)/Cyclin B の複合体が高い活性を維持しているためである (Tripathi et al., 2010; Sato, 2014)。MPF 活性の維持は、Cyclin B の E3 ユビキチンリガーゼである Anaphase promoting complex/Cyclosome (APC/C) が抑制され、MPF の分解が抑えられることによるものである (Levasseur et al., 2013; Tokmakov et al., 2014)。APC/C の活性は、Mos/MEK/ERK1/2 pathway の下流分子である Ribosomal S6 Kinase (RSK)が Emi1/2 や Bub1 を制御することで抑制される (Tokmakov et al., 2014)。また、RSK は APC/C を活性化させる Myt1 や

Wee1 を抑制することも報告されている (Tokmakov et al., 2014)。次に、雄の核と融合するために、卵内で維持されていた MPF 活性は下がり、減数分裂が再開する必要がある。MPF の不活性化は主に二つの制御によって行われる。一つ目が Ca^{2+} シグナルによる APC/C の活性化である。前章で述べたように、受精後に Ca^{2+} 濃度は上昇し、これにより Ca^{2+} シグナルが活性化されることで下流分子は制御される (Ducibella and Fissore, 2007; Levasseur et al., 2013; Tokmakov et al., 2014)。活性化される下流分子の 1 つとして Calmodulin dependent kinase 2 (CaMK2) が挙げられる (Ducibella and Fissore, 2007; Tokmakov et al., 2014)。CaMK2 は APC/C を抑制する Emi1/2 を負に制御することで APC/C を活性化する (Ducibella and Fissore, 2008; Tokmakov et al., 2014)。また近年、Protein phosphatase 2 A (PP2A) や Ca^{2+} シグナルにより活性化される Calcineurin (CN) が APC/C の活性化に寄与することも報告されている (Levasseur et al., 2013)。これらの機構を介して活性化された APC/C は Cyclin B の分解を誘導するため、MPF 活性が低下し、減数分裂が再開する。二つ目が、Feedback 調節が崩れることによる相乗的な APC/C の活性化である。Mos/MEK/ERK1/2 pathway は MPF を positive Feedback 調節によって制御していることが報告されている (Levasseur et al., 2013)。また、Cell Division Cycle 25C (Cdc25C) を介した polo like kinase 1 (Plk1) による MPF の positive Feedback 調節も報告されている (Ferrell, 1999)。しかし、 Ca^{2+} シグナルにより Cyclin B の分解が始まると、これらの 2 つの Feedback 調節 (Fig. 2-4) が崩れるため Myt1 や Wee1 の活性が上昇する (Tokmakov et al., 2014; Kishimoto, 2015)。以上より、MPF の活性が Ca^{2+} を起点とする複数の経路により抑制されることで減数分裂の再開が促進される。

2-3. 動物卵における体軸決定機構

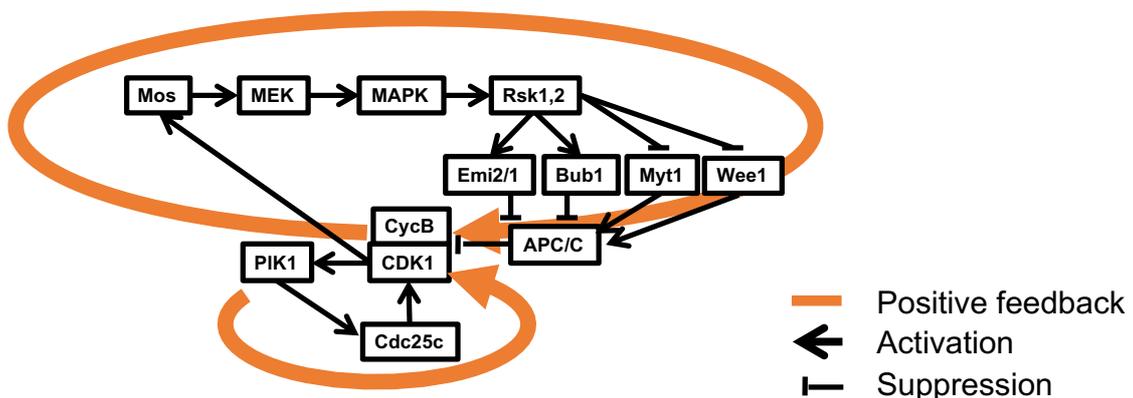


Figure 2-4. MPF 活性維持を担う Feedback 調節機構

CDK1/Cyclin B (MPF) の活性は Mos/MEK/ERK1/2 pathway による positive Feedback 調節と PIK1 による positive Feedback 調節によって高い状態を維持されている。

動物胚の形態形成は、胚の背腹や左右の向きを決定する体軸形成に端を発する。この体軸形成には、胚内における特定の決定因子（タンパク質、mRNA）あるいは細胞群が不均一に局在することで生じる非対称性（極性）が必須である。従って、動物の形態形成を理解するためには、胚に極性が生じるメカニズムを理解することが重要である。胚の体軸決定には、生物固有の決定因子が関与しており、さらにそれを移動させ局在化させるメカニズムもそれぞれの生物に特徴的であることが知られている (Fig. 2-5)。例えば、線虫では1細胞期に PAR タンパ

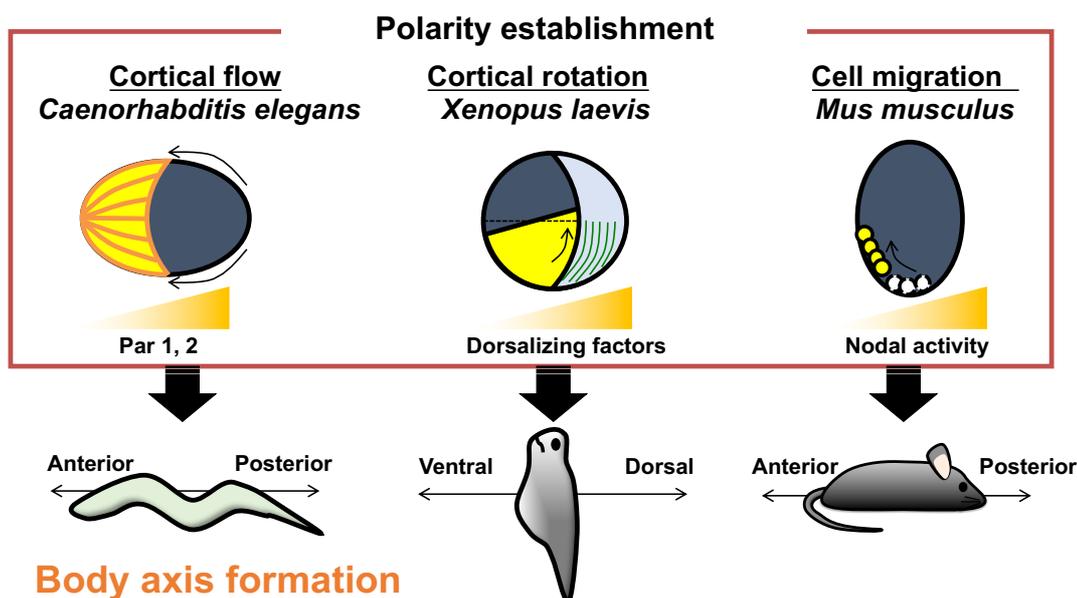


Figure 2-5. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)、*Xenopus laevis* (*X. laevis*)、*Mus musculus* (*M. musculus*)における体軸形成

各動物卵における体軸形成機構の模式図を示した。*C. elegans* の1細胞期では、Actin 繊維が精子進入点から逆側に向かって再構成され、それに沿った細胞質流動が生じる (Cortical flow; Nance and Zallen, 2011)。これにより Par 1、Par 2 タンパク質の局在に非対称性が生じ、前後軸が形成される (Nance and Zallen, 2011)。*X. laevis* の1細胞期では植物半球表層に発達したレーン様の微小管構造が形成される (Elinson and Rowling, 1988)。この微小管構造が駆動力を生み出し表層が約 30° 回転する (Cortical rotation; Elinson and Rowling, 1988)。この際、微小管構造により背側形成因子 (Dorsalizing factors : Dishevelled、*wnt-11*、GBP) が輸送されることで背腹軸が形成される (Miller et al., 1999; Tao et al., 2005)。*Mus musculus* では原条期胚において Nodal を発現する Distal visceral endoderm (DVE) cell が移動することで、DVE cell が存在していた領域に新たに Lefty1 を発現する Anterior visceral endoderm (AVE) cell が形成される (Takaoka et al., 2017)。Lefty1 は Nodal を抑制する。さらに、この AVE cell が前極予定領域に移動することで Nodal の発現に勾配が生じ、前後軸が形成される (Takaoka et al., 2017)。

タンパク質群の局在パターンが、アクチンの再構成にともない変化することで胚の前後軸が決定される (Nance and Zallen, 2011)。また、カエルでは1細胞期に *wnt-11* mRNA や Dishevelled タンパク質がレーン様の微小管構造によって輸送されるこ

とにより背腹軸が形成される (Miller et al., 1999; Tao et al., 2005)。マウスでは原条期胚において、Nodal を抑制する Lefty1 を発現する細胞群 (Anterior visceral endoderm cell) が前極予定領域に移動することで前後軸が形成される (Takaoka et al., 2017)。このように、生物固有の多様な決定因子とその局在様式が知られており、その局在化は細胞骨格依存的であることが明らかにされている。従って、形態形成メカニズムやその多様性を解明するためには、決定因子の違いとその局在を制御する細胞骨格の調節機構の 2 点が重要な要素となる。

2-3-1. 細胞骨格の概略

細胞骨格は細胞内に存在する繊維状のタンパク質複合体であり、細胞の移動や形態、細胞内物質輸送など多岐にわたる機能を有する。細胞骨格は、微小管 (microtubule) と中間系フィラメント (intermediate filaments)、アクチン繊維 (actin filament) の 3 つに大別される (Pollard and Goldman, 2018)。微小管は、 α -、 β -チューブリンのヘテロダイマーから構成されており、このヘテロダイマーが連続した直鎖状の構造であるプロトフィラメントを形成する。さらに、プロトフィラメントが 13 本管状の束になることにより 25 nm 程度の口径の繊維状構造である微小管が形成される (Goodson and Jonasson, 2018)。微小管には極性が存在し、ヘテロダイマーの重合速度が早い側をプラス端、遅い側をマイナス端とする (Goodson and Jonasson, 2018)。これらの末端には特異的な分子が存在しており、微小管の重合と脱重合を制御する。マイナス端では、 γ -チューブリンの輪状構造である γ -tubulin ring complex が結合し、さらに中心体にアンカリングされることで微小管の重合、脱重合が制御されることが知られている (Akhmanova and Miche, 2019)。一方で、プラス端では EB1 をはじめとするプラス端集積因子群 (microtubule-plus-end-tracking protein: +TIPs) により重合・脱重合が制御される (Akhmanova and Michel, 2010)。このような微小管の伸長と短縮は非常に動的なものであり微小管ダイナミクスと呼ばれ、その機能は多岐にわたる。微小管の機能として、細胞質分裂で働く放射状の微小管構造である星状体や、神経細胞の軸索における小胞輸送に見られるような微小管が配列したレール様構造が挙げられる (Lasser et al., 2018; Vukušić et al., 2019)。微小管はこれらの機能を発現するために、駆動力を生み出すモータータンパク質の足場となる。モータータンパク質は ATP の加水分解によりエネルギーを得て微小管上を移動し、また、移動の方向性から Kinesin (プラス端へ移動) と Dynein (マイナス端へ移動) に分類される (Woehlke and Manfred, 2010)。

中間系フィラメントは、10 nm 程度の径を持つ細胞骨格であり、細胞強度の保持や細胞小器官の局在維持など様々な役割を担う (Sanghvi-Shah and Gregory,

2017)。また、中間系フィラメントは総称であり、6つのクラスにそれぞれ分類される六十種類以上の分子が存在する (Sanghvi-Shah and Gregory, 2017)。例として、Keratin や Neurofilament、Nestin、Vimentin などが挙げられる (Sanghvi-Shah and Gregory, 2017)。また、中間系フィラメントは組織特異的に発現することが知られており、細胞の分化マーカーに用いられることも多い (Sharma et al., 2019)。モータータンパク質の足場となり駆動力を生み出す他の細胞骨格とは異なり、機械刺激に対する堅牢性を維持するための機能を果たしている (Sanghvi-Shah and Gregory, 2017)。また、他の細胞骨格と異なり重合には ATP を使用せず、イオン強度や pH に応じて重合する分子特異的な重合様式を有する (Pollard and Goldman, 2018)。

アクチン繊維は G-アクチンが ATP の加水分解をエネルギーに重合し、10 nm 以下の径の繊維を構成する (Blanchoin et al., 2014)。アクチン繊維は、アクチン重合因子に依存して異なる構造を形成し、その構造に応じて細胞形態や細胞運動は調節される (Blanchoin et al., 2014)。また、アクチン繊維は、シグナルの調節にも関与することが明らかにされ、分化や増殖など多岐にわたる生命現象の制御に関与していることが示されている (Blanchoin et al., 2014)。これらの機能の制御には、微小管と同様にモータータンパク質 (Myosin) による駆動力が関与している (Blanchoin et al., 2014)。

2-3-2. 細胞骨格依存的な胚軸決定メカニズム

前章で述べたように、1細胞期に細胞骨格依存的な体軸決定メカニズムを持つ動物は多く報告されている。本章ではその中でも様々な知見が集積しているアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) に着目して論述する。*Xenopus* の未受精卵は、細胞質、表層、および Share zone と呼ばれる表層と細胞質の境目に存在する卵黄を含まない層に大別される (Gerhart et al., 1989; Weaver and Kimelman, 2004; Fig.2-6)。減数分裂装置が存在する動物極は明確であり、動物半球は卵黄顆粒が比較的少なくミトコンドリアなどのオルガネラに富んだ細胞質および黒色の色素顆粒を含む表層から構成される一方、植物半球は卵黄顆粒に富んだ細胞質および色素顆粒を含まない表層から構成されており (Gerhart et al., 1989)、明確な動植軸とそれに沿った非対称性が存在している。この動植軸は、将来の前後軸にほぼ対応する。

Xenopus では減数分裂が終了した間期 (G₂ 期) において、植物極の share zone で微小管が集積し、将来の背側に向かって高度に配向することで発達したレール様微小管構造を形成する (Elinson and Rowing, 1988; Houlston and Elinson, 1992; Elinson and Ninomiya, 2003; Fig.2-6)。このレール様構造とモータータンパ

ク質から成る微小管系を駆動力とし、植物極表層および Shear zone は動物極に向かって約 30 度回転する (Gerhart et al., 1989; Weaver and Kimelman, 2004)。表層回転と呼ばれるこの現象により、灰色三日月環の形成および背側形成因子 (*wnt11* mRNA、Dishevelled protein、GSK3 binding protein) が輸送されることで背側が形成される (Gerhart et al., 1989; Weaver and Kimelman, 2004)。また、メダカやゼブラフィシュのような硬骨魚類でも同様の現象が報告されている (Abraham et al., 1995; Jesuthasan and Strähle, 1997; Tran et al., 2012)。ゼブラフィシュにおいて植物極に発達したレール様の微小管構造が形成され、*Xenopus* の表層回転と同様の現象を示すと同時に背側の決定因子である *wnt-11* が輸送される (Tran et al., 2012)。従って、これらの 1 細胞期に形成されるレール様微小管構造は、母性因子の輸送による体軸形成に必須な構造である。

では、このレール様微小管構造の形成はどのような分子メカニズムにより制

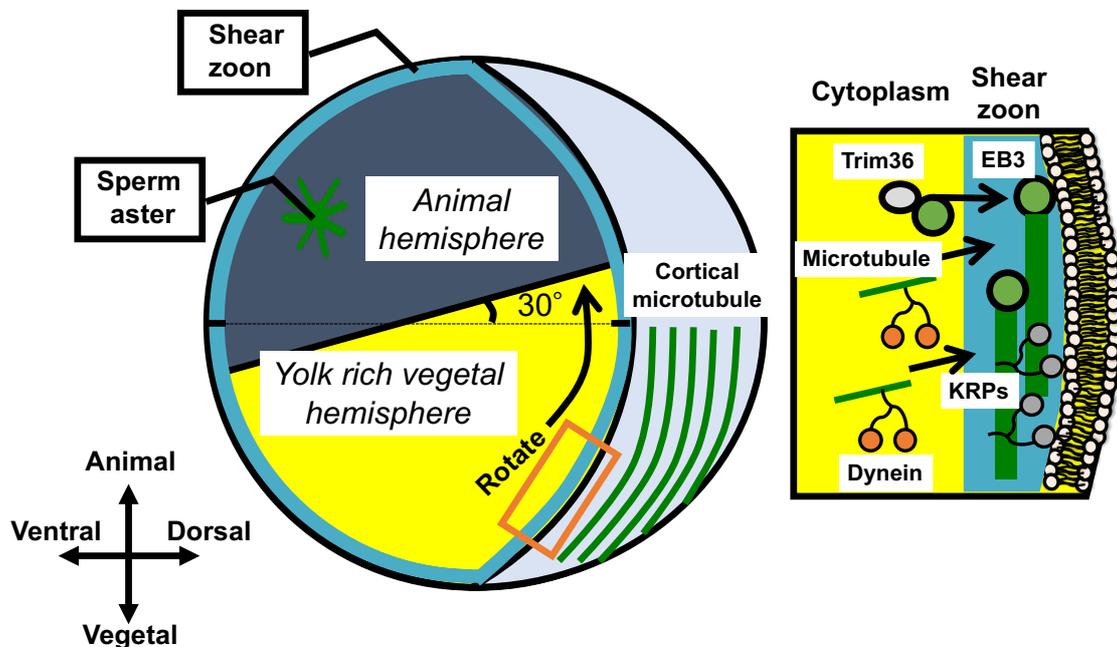


Figure 2-6. *Xenopus* の表層回転

Xenopus における表層回転の模式図を示した。赤四角は表層微小管構造形成領域の一部を示し、拡大図を右図に示した。拡大図には、微小管関連分子が表層微小管構造を形成するメカニズムを示している。tripartite motif containing 36 (Trim36) は微小管プラス端結合タンパク質である End binding protein 3 (EB3) を Shear zone に局在させる (Cuykendall and Houston, 2009; Olson et al., 2015)。微小管依存的なモータータンパク質である Dynein が細胞質より Shear zone に微小管を運搬し、同じく微小管依存的なモータータンパク質である kinesin related proteins (KRPs) が微小管を配向させる (Marrari et al., 2000, 2004)。

御されるのであろう。plus-end directed motor protein である Kinesin Related Proteins (KRPs) が微小管の配向性の制御や表層が回転する際の駆動力を生み出す (Marrari et al., 2000; Fig.2-6)。同じくモータータンパク質である minus-end

directed motor protein dynein は細胞質から share zone への微小管の供給を行う (Marrari et al., 2004)。また、cortical rotation 直前に tripartite motif containing 36 (Cuykendall and Houston, 2009) により、End binding protein 3 (EB3)を含む微小管のプラス端の発達や Share zone への集積が行われることが報告されている (Cuykendall and Houston, 2009; Olson et al., 2015)。このように、レール様表層微小管構造の形成分子メカニズムは明らかになりつつあるが、不明な点も多く残されており、特に微小管を制御する上流分子に関しての報告はされていない。

2-4. ホヤの初期発生

ホヤの成体は、被嚢に覆われたシンプルな形態であるが、幼生はオタマジャクシ様の形態をとり、脊索を有していることから脊索動物門尾索動物亜門に分類される。また、ライフサイクルが早いことや、ゲノムプロジェクトが終了していることなどから (Dehal et al., 2002)、発生学分野でモデル生物として古くから用いられている。

2-4-1. ホヤにおける卵の活性化とシグナル伝達

卵の活性化機構についてはホヤ卵においても研究が進んでおり、減数分裂や Ca^{2+} オシレーションを中心に様々な知見が報告されている (Fig. 2-7)。前述のように、ホヤの未受精卵では Metaphase I で停止しており、Mos/MEK/ERK1/2 pathway の活性 (MAPK 活性) や MPF 活性が feedback 調節により高い状態を維持している (Sensui et al., 2012; Levasseur et al., 2013)。受精により、まず Ca^{2+} ウェーブによる Ca^{2+} 濃度の一過的に大きな上昇を示した直後に約 10 分間、 Ca^{2+} オシレーションがみられ (Ca^{2+} オシレーション series 1: Russo et al., 1996; Yoshida et al., 1998)。これらの Ca^{2+} の上昇は IP_3 の生成により ER から放出されることで生じる (Yoshida et al., 1998)。そして、この Ca^{2+} オシレーションにより CN を介した Cyclin B の分解が進行し、MPF 活性が抑制されることで減数分裂が再開する (Levasseur et al., 2013)。またこの際、PP2A により MPF 活性が抑制されることも報告されている (Levasseur et al., 2013)。さらに、 Ca^{2+} オシレーション series 1 により、活性化されたアクチン重合因子 RhoA 依存的に植物極へのアクチン繊維の集積が誘導されることが報告されている (Yoshida et al., 2003)。このようにホヤ卵では、 Ca^{2+} シグナルにより減数分裂の再開やアクチン繊維の再構成が誘導されることが明らかにされている。また、受精後約 15 分から約 10 分間、再び IP_3 を介した Ca^{2+} オシレーションが引き起こる (Ca^{2+} オシレーション series 2: Russo et al., 1996; Yoshida et al., 1998)。そして、同様のタイミングで MPF 活性の

再上昇および MAPK 活性の低下が誘導される (Russo et al., 1996)。この MPF 活性の再上昇により第二減数分裂期へと移行し、さらに再度 MPF 活性が抑制されることで減数分裂が終了する (Russo et al., 1996)。以上のように、ホヤ卵でも Ca^{2+} シグナルや MPF 活性、MAPK 活性の顕著な変動により卵の活性化が制御されていることが報告されている。

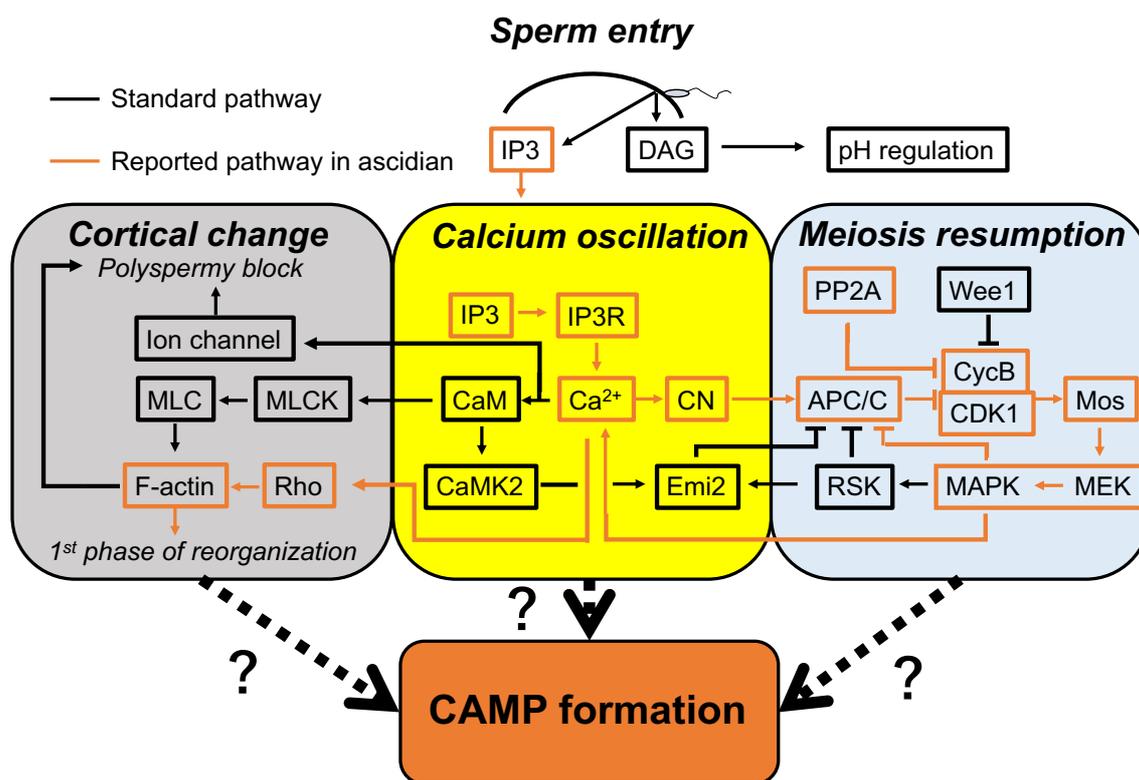


Figure 2-7. 卵の活性化を制御するシグナル伝達経路

卵の活性化とそれらを制御するシグナル伝達経路の模式図を示した。黒線と赤線はそれぞれ種々の動物卵で報告されている経路、およびホヤ卵において報告されている経路を示している。

2-4-2. ホヤの前後軸形成

ホヤの卵では、1細胞期に細胞質再配置と呼ばれる特徴的な細胞質の移動を示した後に、8細胞期までは等割が行われるが、16細胞期以降、植物半球の最も後極に位置する2つの割球でのみ3回の連続する不等卵割が生じる。ホヤの初期発生におけるこれらの現象は、1905年にE. G. Conklinによって記載されている (Conklin, 1905)。また、Conklinは、卵内の細胞質において特徴的な色素顆粒から区分される5つの領域が存在することを示した。この内の一つであるmyoplasmは、受精後1細胞期に大規模な移動(細胞質再配置)を示し、後極領

域に再配置されることが記載されている (Conklin, 1905; Fig. 2-8)。この myoplasm の再配置により卵内では極性が生じることで前後軸形成が行われる (Sardet et al., 1989, 2007; Roegiers et al., 1999)。また、再配置された myoplasm は卵割が進行するに従って、特定の割球へと分配される (Prodon et al., 2007)。その後、myoplasm を受け継いだ割球は筋肉組織を構成する細胞へと分化する (Nishida and Sawada, 2001, Prodon et al., 2007)。この myoplasm には決定因子である母性 mRNA が含まれており (Nishida and Sawada, 2001)、ホヤの初期発生では、1 細胞期に行われる細胞質再配置によって決定因子が卵内の正確な場所に配置され、invariant な卵割パターンによって特定の割球に受け継がれることで各割球の予定運命が決定されることからモザイク的な発生様式を示す。

2-4-3. 細胞骨格依存的な細胞質および母性決定因子の移動

前項で述べたように、細胞質再配置はホヤの形態形成の始まりとも言える現象である。従って、細胞質再配置を理解することは、ホヤの形態形成を理解することにおいて必要不可欠である。ホヤの未受精卵では、卵成熟過程で形成された減数分裂装置が卵の表層に配置されている (Prodon et al., 2006; Fig. 2-8)。この際、減数分裂装置が配置された側が動物極、逆側が植物極となり動植物軸が形成される。myoplasm は動物極付近のごく一部を除く表層領域全体において、放射相称に存在する。myoplasm はミトコンドリアに富んだ細胞質領域であり、また、細胞骨格ドメインとも呼ばれ、中間系フィラメントから構成される 2 つの要素 (Lamina 構造, Lattice 構造) から成り立つ (Jeffery, 1995)。myoplasm のより表層領域には、粗面小胞体である cortical endoplasmic reticulum (cER) やアクチンのネットワークが存在している (Sardet et al., 1992)。この cER には母性 mRNA や ribosome を含む翻訳に関わる分子が局在していることが報告されている (Sardet et al., 2003; Prodon et al., 2005; Paix et al., 2011)。myoplasm に存在する母性 mRNA は軸形成や細胞分化に必須であるため、ホヤの形態形成メカニズムを明らかにするために、その翻訳や局在の制御メカニズムを理解することが強く求められる。

細胞質再配置は細胞骨格依存的に二段階で行われる。ホヤの受精では、動物半球より精子が進入する。受精直後には、アクチン繊維が植物極に向かって集積することにより卵全体が変形する (Cortical contraction: Sawada and Schatten, 1989; Chiba et al., 1999; Roegiers et al., 1999)。このアクチン繊維の集積により、Myoplasm や cER、動物半球より侵入した精子由来の核は植物極へと集められる (第 1 細胞質再配置: Sawada and Schatten, 1989; Chiba et al., 1999; Roegiers et al., 1999)。受精から 20 分程度で、植物極では精子により核と共に卵内に持ち込まれた中心体

から発達した星状体様微小管構造である精子星状体が形成される (Sawada and Schatten, 1988)。その後、精子星状体は核と共に将来の後極へと卵表層に沿って移動する (Sardet et al., 1989)。受精後 30 分で、精子星状体は将来の後極へと到達し、減数分裂期から体細胞分裂期へと移行のため前核化や中心体の複製が行われる (Roegiers et al., 1999)。その後、受精後 30 分から 45 分の間に精子星状体および雄性前核は、卵の表層から中心へと進入し、減数分裂の終了した雌性前核と融合する (Sardet et al., 1989)。myoplasm の後極表層への移動は、精子星状体の移動が駆動力となっているとされている (第 2 細胞質再配置: Sawada and Schatten, 1989; Chiba et al., 1999; Roegiers et al., 1999)。その後、受精から約 50 分で体細胞分裂装置が形成され、myoplasm は後極表層において典型的な三日月様のドメインを形成する (Roegiers et al., 1999; Fig. 2-8)。この様に細胞質再配置の全体像は先行研究により概論的に明らかにされているが、myoplasm の移動に関わる明確な構造やその制御機構など解明されていない点が多く残されている。

2-4-4. 異なる局在様式を示す母性決定因子群

ホヤの 1 細胞期では、myoplasm が後極へと再配置された領域は Posterior-Vegetal Cytoplasm and Cortex (PVC) と呼ばれ、その領域には母性決定因子が含まれることが明らかにされている (Nishida, 1994, 1997; Prodon et al., 2007; Fig. 2-8)。この PVC に含まれる母性決定因子の実態の 1 つとして、遠心卵を用いた解析により posterior end mark (pem) mRNA が初めて同定された (Yoshida et al., 1996)。さらにその後、PVC には筋肉の分化誘導因子である *macho-1* mRNA が含まれることが示された (Nishida and Sawada, 2001)。これらの PVC に含まれる母性 mRNA は postplasmic/PEM RNAs と呼ばれており、現在ではゲノム解析や *in situ* screening などによる網羅的解析により、約 40 種類の mRNA が同定されている (Prodon et al., 2007)。postplasmic/PEM RNAs の特徴の 1 つとして、8 細胞期に存在する B4.1 と指定される割球に分配されることが挙げられる。この割球は胚の後極植物極に位置し、その後の卵割で不等卵割が行われる割球である。B4.1 には、cER や postplasmic/PEM RNAs、微小管およびキネシンから構成される Centrosome Attracting Body (CAB) と呼ばれる構造が形成される (Nishikata et al., 1999; Sardet et al., 2005; Fig. 2-8)。その後の卵割で、この CAB は胚の後極に位置しながら三回の不等卵割に寄与する。CAB に含まれる postplasmic/PEM RNAs の多くは最終的に幼生の B8.11 と B8.12 あるいは B8.11 のみに分配される (Prodon et al., 2007)。B8.11 細胞は体細胞へと分化する一方で、B8.12 細胞は生殖系列細胞であり生殖細胞へと分化する (Sardet et al., 2005; Prodon et al., 2007)。postplasmic/PEM RNAs の機能についてはいくつかの遺伝子において報告されている。例えば、

pem-1 は幼生における背側前方のボディープランニングや細胞分化、卵割様式の制御など多様な機能を有していることが報告されている (Yoshida et al., 1996; Negishi et al., 2007; Shirae-Kurabayashi et al., 2011)。一方で、*macho-1* は zinc-finger 型転写制御因子であり、Tbx-6b, c の発現制御を行うことで筋細胞への分化を誘導することが報告されている (Nishida, 2005)。*vasa* は生殖系列である B8.12 の細胞に分配された後に翻訳され、卵巣へと取り込まれていくことから生殖細胞の分化に寄与することが示唆されている (Shirae-Kurabayashi et al., 2006; Fig. 2-8)。このようにいくつかの遺伝子において機能が明らかとなり、発生過程に必須であることが報告されているが、postplasmic/PEM RNAs の大部分の遺伝子において、未だその機能は明らかにされていない。

postplasmic/PEM RNAs は、1 細胞期における局在パターンから Type I と Type II に分類される (Sasakura et al., 2000; Fig. 2-8)。Type I の代表例として *pem-1* や *macho-1* が挙げられ、Type II では *vasa* や *pet-1* が挙げられる。卵成熟過程で転写された postplasmic/PEM RNAs のうち Type I は、未受精卵中において cER と共に卵表層に局在する一方で、Type II は明確な局在を示さず顆粒状で存在していることが報告されている (Sasakura et al., 2000; Prodon et al., 2008)。受精後にこれらはそれぞれ、Type I では cER と共に細胞質再配置と同様の移動様式を示しながら後極へと移動し (Sasakura et al., 2000; Sardet et al., 2003)、Type II は第 2 細胞

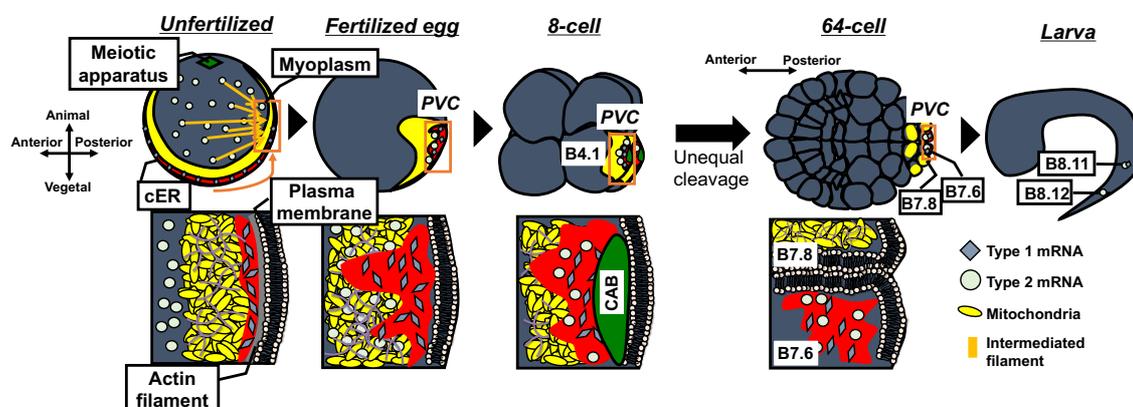


Figure 2-8. ホヤの初期発生過程における myoplasm の移動と postplasmic/PEM RNAs の局在

myoplasm の挙動を模式的に示した。赤四角内における myoplasm を構成する細胞小器官や postplasmic/PEM RNA の局在を拡大して示した。ホヤの未受精卵では myoplasm や cortical endoplasmic reticulum (cER)、Type 1 postplasmic/PEM RNA が放射相称に存在している。一方、Type 2 postplasmic/PEM RNA は細胞質に均一に存在している。受精後にこれらは後極へと移動し Posterior-Vegetal Cytoplasm and Cortex (PVC)を形成する。8-cell 期に PVC を含む割球では Centrosome attracting body (CAB) が形成され 64-cell 期までに三回の不等分裂が行われる。

質再配置中に後極へと集積する (Sasakura et al., 2000)。その後、卵割が進行する

と、これらは myoplasm と同様に B4.1 へと分配され、cER や他の分子と共に CAB を形成する。しかし、近年 Type II に関しても Type I と同様に未受精卵で表層に局在し、第 1 細胞質再配置後に徐々に植物極へと集積することも報告されている (Shirae-kurabayashi et al., 2006; Paix et al., 2009)。従って、母性 mRNA の後極への移動メカニズムは未だ不明な点が多く残されている。

2-5. 研究目的

ホヤ卵 1 細胞期では、これまでの記述のように myoplasm や postplasmic/ PEM RNAs が細胞骨格依存的に局在化する細胞質再配置が行われている。この現象により、胚軸形成や細胞分化 (生殖細胞や筋肉細胞) が誘導されることから、細胞質再配置はホヤの発生に必須な現象である。硬骨魚類やカエルなど他の動物卵でも類似した現象が見られることを論じたが、これらの卵で報告されているような細胞質や母性決定因子の偏在化に寄与する明確な細胞骨格構造はホヤでは記載されていない。その要因の 1 つとして、ホヤ卵において細胞骨格の観察条件が最適化されていないことが挙げられる。例えば Chiba らは、第 2 細胞質再配置において PVC の表層に微小管の染色を記載しているが、その染色像は不明瞭であり、再現性に乏しいものであった (Chiba et al., 1999)。そこで、第 3 章では、ホヤ卵における微小管観察条件の最適化を行うことで、細胞質再配置に関わる構造を解明することを目的とした研究を行った。一方で、細胞質や母性決定因子の局在化に寄与する明確な微小管構造が報告されているゼブラフィッシュ (Tran et al., 2012) やカエル (Weaver and Kimelman, 2004) の卵においても、その形成メカニズムは未だ明らかにされていない。前述のように 1 細胞期では、受精を引き金に減数分裂の再開や Ca^{2+} ウェーブなど様々な卵の活性化が見られる。この卵の活性化は、細胞周期調節因子や Ca^{2+} シグナルなどの活性が顕著に変化することにより制御されるが、細胞質や母性決定因子の偏在化との関連は不明である。そこで、第 4 章では、受精後のシグナル分子の活性変化と細胞質再配置との関係を明らかにすることを目的とした。第 5 章では、細胞骨格や myoplasm を構成するオルガネラおよび postplasmic/ PEM RNAs の時空間情報を高精細に取得し、それらの挙動や関係を精査することを目的とした。これまで可視化技術の限界から、これらを複数同時に可視化し、高精細でかつ三次元的に記載された例はなく、分子メカニズム解明に向けたアプローチが困難な現状である。そこで、染色技術を改良することにより複数の分子を同時に可視化し、高精細でかつ三次元的に観察することが可能な染色法の開発を行った。次に、この開発した技術利用し、これまで未知であった細胞質再配置の分子メカニズムへアプローチすることを目的とした。ホヤの細胞質再配置はこれまでの研究から、“アクチン依存

的な第1段階と微小管依存的な第2段階により myoplasm の後極への移動が完了する”という概論的な理解に留まっている。したがって、第1細胞質再配置から第2細胞質再配置への移行のメカニズムやアクチン繊維の役割に関しては不明な点が多い。そこで第6章では、第5章で開発した可視化技術により、微小管構造の形成およびオルガネラ、postplasmic/PEM RNAs などの局在化に関するアクチン繊維の役割を明らかにすることで、細胞質再配置における細胞骨格の役割を精査することを目的とした。以上のように、細胞質再配置の分子メカニズムを解明することでホヤの形態形成メカニズムの理解が飛躍的に進むことが期待される。また他の生物の胚軸決定において、母性決定因子を輸送する構造や制御メカニズムの共通性あるいは多様性を明らかにすることで、種間共通性を理解する上で重要な知見を得ることが出来ると考えられる。

第3章 ホヤ卵における微小管可視化条件の最適化

3-1. 序論

ホヤ卵 1 細胞期における微小管の挙動を明らかにするためには、微小管観察の条件検討を行うことが必要不可欠である。2-5 で述べたようにホヤ卵の表層で見られる微小管は不明瞭な記載しかなく、カエルやゼブラフィッシュのような明確な構造は記載されていない。そこで本章では、ホヤ卵における最適な表層の微小管観察の条件を検討し、1 細胞期における微小管の挙動を明確に記載することを目的とした。微小管観察の条件検討において、尿素を主成分とする生体標本の透明化剤である Scale 試薬 (Hama et al., 2011) をベースとし、固定から免疫染色までの全過程を見直し、ホヤ卵での微小管構造を可視化する手法の最適化を行った。また、この手法を用いて、継時的に固定した標本を観察することで 1 細胞期における微小管の挙動を明確に記載した。さらに、微小管と myoplasm の両方を同時観察することにより細胞質再配置における微小管の役割を推測した。

3-2. 実験操作

3-2-1. 実験動物

ホヤ成体 (*Ciona intestinalis*) は、National Bio-Resource Project (MEXT, Japan) より提供されたものを使用した。ホヤ成体から採卵後、コリオンを除去し (Ishii et al., 2012, 2014)、フィルター濾過を行った 18°C の海水中で発生させた。この条件下で発生した胚は、受精後 30 分 (minutes post-fertilization: mpf) で第二細胞質再配置、60 mpf で第一卵割を開始する。受精には、別個体から採精した精子を 1N NaOH で pH を約 11 にすることで活性化させ、海水中で受精させた。

3-2-2. 免疫蛍光染色

目的のステージまで発生させた胚を 100% MeOH を用いて室温で一時間固定を行った。その後、標本は 100% EtOH に置換し、-20°C で保存した。染色時、標本は 0.05% Tween 20 を含む phosphate-buffered saline (PBST) を用いて洗い、Triton X-100 濃度とグリセロール濃度を改良した Scale 試薬 G1T0 (4 mol/L 尿素 [MP Biomedicals, USA]、1% グリセロール) で 4°C、90 分間処理を行った。Scale 処理を行った胚を再び PBST で洗い、一次抗体として anti- α -tubulin mouse

monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, USA; 1:100 希釈)、 anti-MnSOD rabbit antisera (StressMarq Biosciences, Canada; 1:40 希釈) を添加した。 anti- α -tubulin antibody は微小管を、 anti-MnSOD antibody はミトコンドリアを標識する抗体としてそれぞれ用いた (Ishii et al., 2012)。 二次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Molecular Probes, USA; 1:1000 希釈)、 Alexa Fluor 532-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Molecular Probes; 1:1000 希釈) を用いて蛍光標識を行った。 抗体の希釈溶液は全て Blocking one (Nacalai Tesque, Japan) を用いた。 その後、 サリチル酸メチル (Nacalai Tesque, Japan) で標本の透明化処理を行い、 スライドガラスにマウントした。 観察は、 共焦点顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss, Germany) を用いた。

3-2-3 画像解析

観察した標本は、 イメージングソフトウェア ZEN (Carl Zeiss) を用いて画像化し、 光学切片、 立体再構成した 3D モデルをそれぞれ取得した。 その後の解析は、 画像解析ソフトウェア Image J Fiji (Schindelin et al., 2012) を用いた。 解析手順として、 まず極体、 次に myoplasm の位置を参考に、 動物極を上にした正中断面を作成した。 その画像内で、 精子星状体の中心座標および myoplasm と表層微小管構造の重心座標を算出した。 精子星状体の中心座標は中心体の位置とした。 myoplasm の座標は卵中心に対する 10 度毎のラインプロファイリングを行い、 myoplasm の範囲を二値化し、 そこから面積中心を算出した。 表層微小管構造は、 その領域の緯度範囲の中央を座標として取り扱った。

3-3. 実験結果

3-3-1. ホヤ卵における微小管観察条件の最適化

まず、 ホヤ卵における微小管観察条件の最適化のため、 Scale 試薬の改良を行った。 Scale 試薬は固定標本の透明化剤として開発されており、 主成分である尿素がタンパク質を変性させることで脂質の除去や水和環境を作ることで生体試料を透明化する。 そのため有機溶媒を用いた透明化試薬などに比べ、 標本へのダメージが少ないことを特徴とする (Hama et al., 2011)。 そこで、 オリジナルの Scale 試薬 ScaleA2 (4 mol/L 尿素、 10% グリセロール、 0.1% Triton X-100) の各組成濃度を変えることで最適な条件の検討を行った (Table 3-1)。 この際、 尿素はタンパク質を変性する役割を担っており Scale 試薬において最も重要な成分であるため、 オリジナルの組成である 4 M で濃度を固定した。 一方で、 グリセロー

ル、Triton X-100 は生体組織への浸透性や浸透圧を調節するものであり、組織ではなく卵を用いた本実験においては改良の余地があると考えられるため、これらの濃度検討を行った。本研究では、明確な微小管繊維の記載を目的としているため、最も微小管繊維が発達しているステージである第一卵割直前に固定した卵 (60 mpf) を用いて、改良 Scale 試薬の効果を評価した。

Modified ScaleA2	Urea [†]	Triton X-100 [†] (%)	Glycerol [†] (%)
Original	4.0 mol/L	0.1	10.0
G10T2	4.0 mol/L	2.0	10.0
G1T0	4.0 mol/L	0.0	1.0
G1T0.7	4.0 mol/L	0.7	1.0
G1T2	4.0 mol/L	2.0	1.0
G1T5	4.0 mol/L	5.0	1.0
G1T15	4.0 mol/L	15.0	1.0

[†]Urea, Triton X-100 (w/v), and glycerol (w/v) were dissolved in distilled water.

Table 3-1. 改良 Scale 試薬の組成表 [from Ishii et al., 2017]

Scale 試薬の透明化試薬としての効果は、これまで利用してきたサリチル酸メチルの効果のほうが高いことがわかった。一方で、免疫染色の前処理剤として使用すると、染色結果を変化させることがわかった (Data not shown)。上述のよ

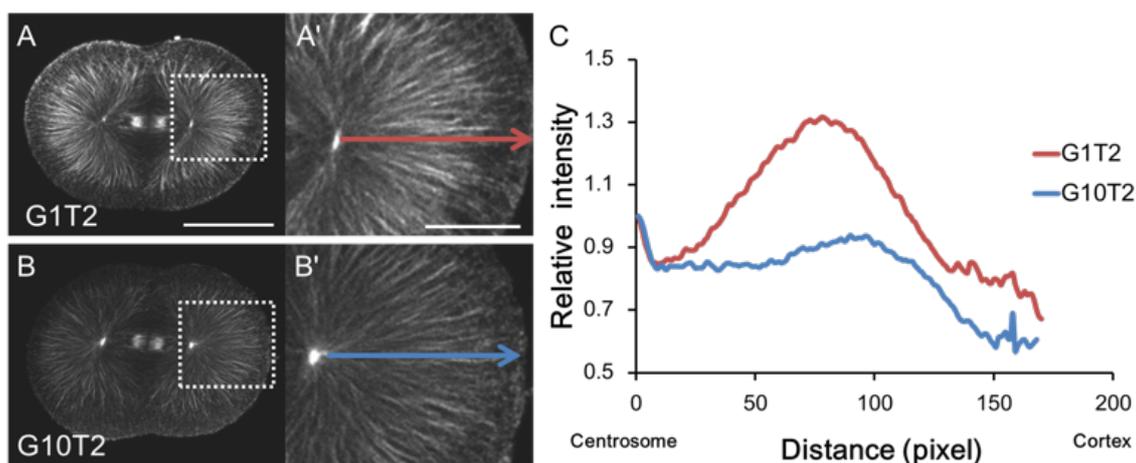


Figure 3-1. 改良 Scale 試薬のグリセロール濃度の検討

(A, B) 60 mpf の標本に対して改良 Scale 試薬を添加し、微小管を染色した共焦点顕微鏡像。(A', B') A, B, の点線囲みの拡大図。(C) A', B' の矢印のように中心体から表層まで 100 ピクセルの幅の蛍光強度を計測した後、中心体付近の蛍光強度に対する相対値に変換することで蛍光強度の定量化を行った。スケールバーはそれぞれ A, B で 50 μm 、A'、B' で 20 μm 。[from Ishii et al., 2017]

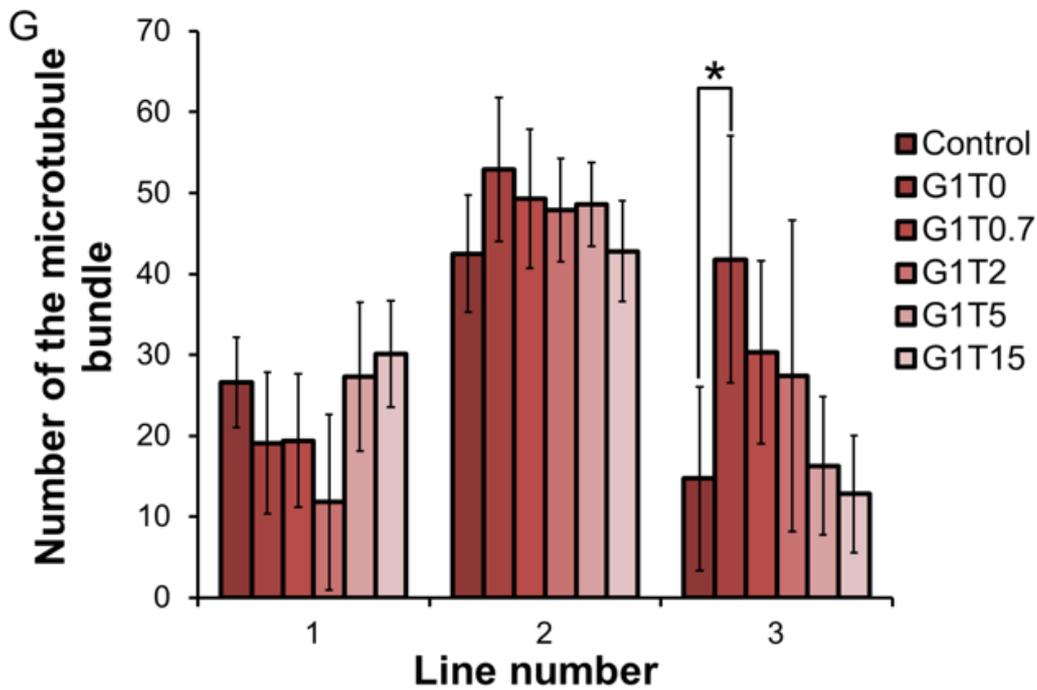
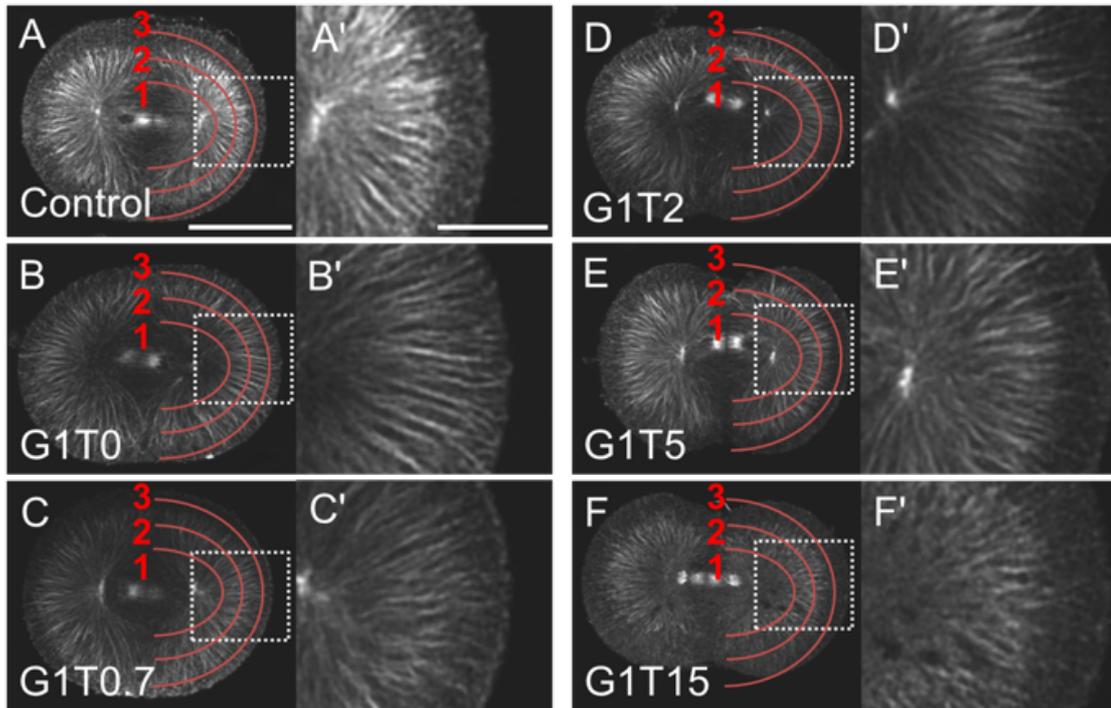


Figure 3-2. 改良 Scale 試薬の Triton X-100 濃度の検討

(A-F) 60 mpf の標本に対して改良 Scale 試薬を添加し、微小管を染色した共焦点顕微鏡像。(A'-F') A-F の点線囲みの拡大図。(G) A-F のように中心体から表層までの領域に 3 つのラインを描画し、それぞれのライン上の蛍光強度を計測した。得られた蛍光強度スペクトルのピークを 1 本の微小管繊維として計測し、グラフに示した。Error bars は SD を表す (n=3)。グラフ上の*は $p < 0.001$ で有意差のあることを表す。スケールバーはそれぞれ A-F で $50 \mu\text{m}$ 、A'-F'で $20 \mu\text{m}$ 。 [from Ishii et al., 2017]

うに *Scale* 試薬は本来、標本の透明化を目的とした試薬であり、免疫染色等を行なった後、観察の直前に用いられることが多い。しかし、*Scale* 試薬は尿素およびグリセロールを含み、抗体の抗原へのアクセシビリティの向上が期待されることから、本研究では免疫染色の抗原賦活化を目的とした前処理剤として利用することも検討した。そこで本研究では、*Scale* 試薬で前処理を行った標本で微小管の免疫染色を行い、その染色結果が最良となるよう *Scale* 試薬の改良を行った。

グリセロールの濃度検討を行うために、高濃度のグリセロールを含む G10T2 (4 mol/L 尿素、10% グリセロール、2.0% Triton X-100)、低濃度のグリセロールを含む G1T2 (4 mol/L 尿素、1.0% グリセロール、2.0% Triton X-100) を調整した (Table 3-1)。60 mpf で固定した標本を *Scale* 試薬によって前処理し、微小管染色を行った結果、G1T2 では中心体を起点に非常に発達した星状体の微小管繊維が表層付近まで達しているのが明確に観察された (Fig. 3-1A)。一方で、G10T2 では微小管繊維の蛍光強度の減少が見られた (Fig. 3-1B)。それぞれの蛍光強度の差を定量するために Fig. 3-1A'、B' のようにライン上の輝度を算出したところ、G10T2 における蛍光強度の減少を明確に示すことができた (Fig. 3-1C)。これらの結果から、グリセロールを低濃度の 1% とし、Triton X-100 の濃度検討を行った。

Triton X-100 の濃度が 0% から 15% までの異なる *Scale* 試薬 (Table 3-1) によって前処理を行った結果、Triton X-100 の濃度が減少するに従い、表層付近の明瞭な微小管繊維が観察できるようになった (Fig. 3-2A-F、A'-F')。そこで、Fig. 3-2A-F のように中心体から細胞表層までの領域において、3 つのライン (Line 1-3) 上の輝度を測定した。この測定値からライン上の微小管繊維の本数を計測した結果、表層領域を示す Line 3 において、Triton X-100 が 0% である G1T0 が最も微小管繊維を明瞭に観察できることが示された (Fig. 3-2G)。従って、G1T0 (4 mol/L 尿素、1.0% グリセロール) がホヤ卵微小管の免疫染色において最適な前処理剤であると提案することができる。

3-3-2. ホヤ 1 細胞期における新規微小管構造の発見

ホヤ卵の細胞質再配置における微小管の記載は、現在のところ精子星状体と後極側表層の不明瞭な微小管の局在のみである (Chiba et al., 1999; Roegiers et al., 1999; Ishii et al., 2014)。そこで、第二細胞質再配置における微小管構造の記載を行うために、45 mpf で固定した標本の微小管観察を行ったところ、通常免疫染色をおこなった卵 (Control) では後極側表層に不明瞭な微小管の局在のみが観察されるが (Fig. 3-3A: 矢尻)、改良 *Scale* 試薬 G1T0 で前処理した標本では、同

様の領域に太い微小管が平行に何本も並んだレール様構造が見られた (Fig. 3-3B: 矢尻)。このような微小管構造の存在について報告されていなかったことから、この新規構造を CAMP (cortical array of microtubules in posterior vegetal region) と名付けた。

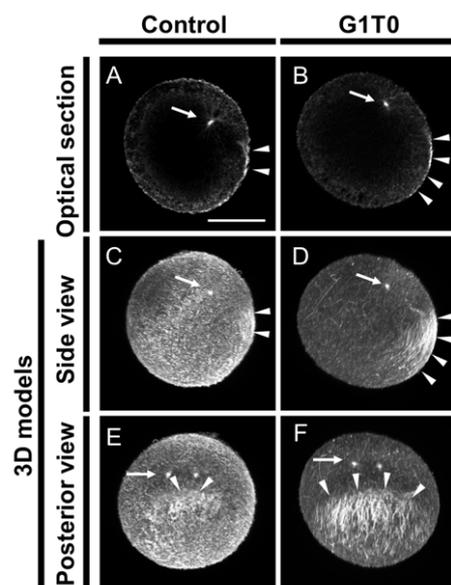


Figure 3-3. 改良 Scale 試薬 G1T0 を添加した 45 mpf の標本の微小管染色後の共焦点顕微鏡像

(A,B) 光学切片を正中断面で示した。図の上が動物極、左が前極に対応する。(C-F) A, B を立体再構成した 3D モデル図。(C,D) 側面からの図で上が動物極、左が前極に対応する。(E,F) 後極側から見た図。上が動物極。矢印は精子星状体、矢尻は表層の微小管を示している。スケールバーは、50 μm 。[from Ishii et al., 2017]

次に、1 細胞期における微小管の挙動を明らかにするため、未受精卵および受精後の卵を継時的に固定し、G1T0 による前処理を行い、微小管染色を行った。未受精卵において、動物極に存在する減数分裂中期の分裂装置に加え、表層領域から細胞質側に向かって 15-20 μm の深さにかけて微小管が局在していることを発見した (Fig. 3-4A, G, M, M')。この微小管は、卵表層下の比較的深いところで全周にわたって存在しており、拡大画像 (Fig. 3-4M') からメッシュワーク様の構造であることが観察された。本研究で発見した未受精卵におけるメッシュワーク様構造を、Deeply Extended subcortical microtubule Meshwork (DEM) と名付けた。一方 15 mpf の卵において、精子星状体 (矢尻) が植物極付近で表層に貼り付くように発達しており、また、微小管フラグメントが植物極に集積していることが観察された (Fig. 3-4B, H, N, N')。このフラグメントは 30 mpf では観察されず、短期間に形成、消失する構造である。本研究で発見した 15 mpf におけるこの微小管フラグメントの集積を、Transiently Accumulated microtubule Fragments

(TAF)と名付けた。30 mpfでは、赤道面付近に存在する精子星状体は大きく発達している (Fig. 3-4C, I, O, O')。一方で、植物極に集積していた TAF は消失し、植物極表層領域に微小管の微細なバンドル構造が形成され始めていた。45 mpfではこの微小管バンドルは発達した構造となり CAMP を形成していることが観察された (Fig. 3-4D, J, P, P')。CAMP は、動植方向に配向したレーン様の微小管バンドルが植物極から後極に至るまでの植物半球後ろ側の表層で存在していることが確認された。一方で、精子星状体は表層から離れ、すでに卵の中心へと進入しており、CAMP との明確な微小管の繋がりは確認することができなかった。50 mpfでは、CAMP の領域が後極表層で縮小することが観察された (Fig. 3-4E, K, Q, Q')。この際、微小管バンドルは45 mpfと比べて正中線に向けてより短く直線的に配向する。また、卵の中心では、分裂装置が形成されていた。60 mpfでは、CAMP は消失し、第一卵割の分裂装置が形成されていた (Fig. 3-4F, L, R, R')。G1T0 を用いた継時的な微小管観察により、微小管メッシュワークや CAMP を含む1細胞期における新規の微小管構造の挙動を明確に記載することができた。

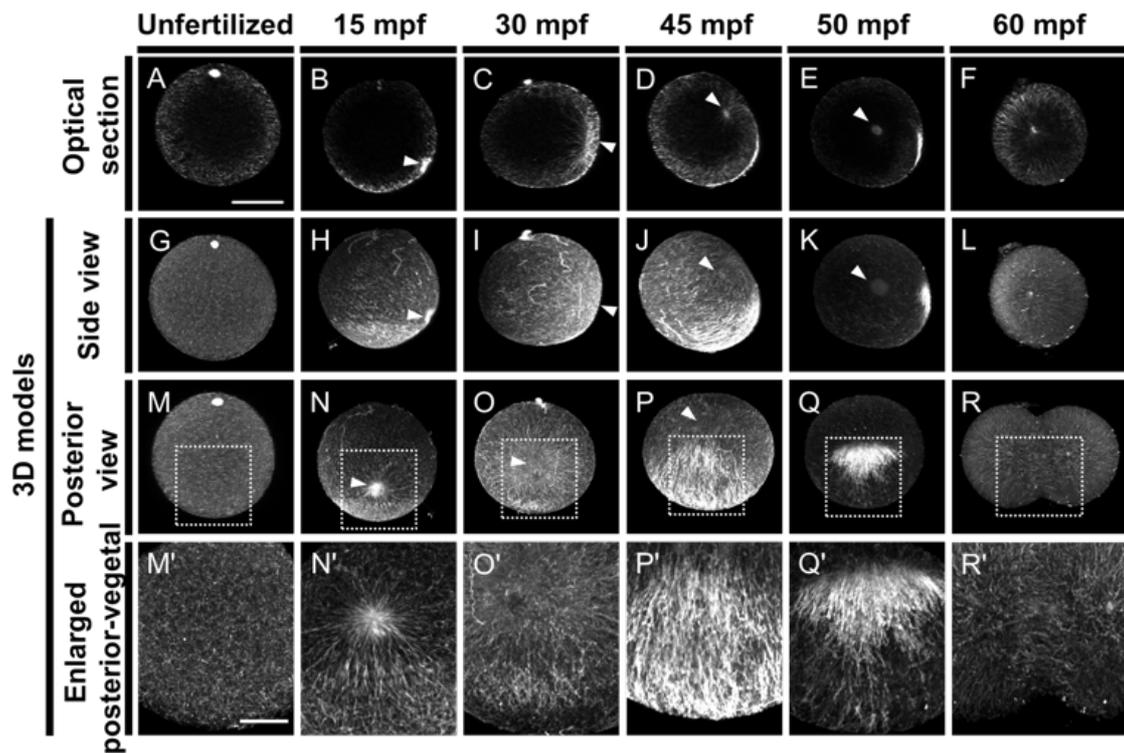


Figure 3-4. 1 経時的に固定した細胞期 (0 mpf - 60 mpf) の胚を免疫染色の前に改良 Scale 試薬 G1T0 で処理した微小管の共焦点顕微鏡像

(A-F) 正中断面の光学切片。図の上が動物極、左が前極にそれぞれ対応する。(G-R) A-F を立体再構成した 3D モデル図。(G-L) 側面からの図で上が動物極、左が前極。(M-R) 後極側から見た図。上が動物極。(M'-R') M-R の点線囲みの拡大図。矢尻は精子星状体を示している。スケールバーはそれぞれ A-R は 50 μm 、M'-R' は 20 μm 。[from Ishii et al., 2017]

3-3-3.1 細胞期における新規微小管構造と myoplasm の時空間的な解析

ホヤ卵 1 細胞期における微小管の挙動が明らかになったことで、これまで不明な点が多い myoplasm の移動メカニズムが明らかになることを期待し、微小管と myoplasm の移動の関連について解析を行った。3-3-2 と同様に経時的に固定を行い、微小管と myoplasm 両方の二重免疫染色を行うことにより新規微小管構造と myoplasm との関係を明らかにするべく観察を行った。未受精卵では、先行研究と同様に myoplasm が動物極（減数分裂装置近傍）を除き卵全体の表層直下に存在していた (Fig. 3-5A, G, M)。DEM は myoplasm の存在する表層領域にはみられず、卵の内側に比較的幅広く存在していた。15 mpf では、先行研究と同様に第 1 細胞質再配置によって myoplasm および精子星状体が植物半球の表層に存在していることを確認した (Fig. 3-5B, H, N)。それらと TAF の関係をみてみると、TAF は myoplasm と共に植物極表層に局在するが、精子星状体近傍で、myoplasm の広がりよりも狭い範囲で集積していることが確認された。30 mpf では、精子星状体（矢尻）はすでに赤道面まで移動しているが、myoplasm は植物半球に留まったままであった (Fig. 3-5C, I, O)。一方、この時期から形成されはじめる表層の微小管バンドルは、myoplasm の広がりの中央部付近に形成されていた。45 mpf では、myoplasm は将来の後極へと移動しているが、典型的な三日月様のドメインはまだ形成されていなかった (Fig. 3-5D, J, P)。この際、CAMP は後極植物極表層において myoplasm よりもわずかに広い領域で myoplasm を覆うような形で存在していることが観察された。50 mpf で myoplasm は、後極側に集積して三日月様のドメインを形成するが (Fig. 3-5E, K, Q)、この際、CAMP は myoplasm の表層領域で収束しており、myoplasm の移動と対応する。一方で、精子星状体はすでに 45 mpf から 50 mpf で卵の中心に進入しているため、myoplasm の移動と一致していないことが示唆された。60 mpf では、myoplasm が各割球へと分配されていることが確認された (Fig. 3-5F, L, R)。以上の観察結果より、30 mpf から 50 mpf において myoplasm と精子星状体は異なる挙動を示すことが示唆された。

次に、第二細胞質再配置における myoplasm、精子星状体、CAMP の挙動を定量的に解析した。30 mpf から 50 mpf におけるそれぞれの構造の中心を卵の正中断面上にプロットしたグラフからは、CAMP の移動が myoplasm の移動と対応する一方で、精子星状体はすでに卵の中心に存在していた (Fig. 3-5S)。さらに、各中心を動植軸に対する角度として、時間に対するグラフに変換することで、CAMP と myoplasm は 45 mpf から 50 mpf の間に、同様の領域、つまり植物極半球後ろ側で、同程度の角度変化を示して移動していることが示された (Fig. 3-5T)。

この CAMP の変化と myoplasm の移動は、第二細胞質再配置を植物半球から後極への移動と、卵内部へと移動して三日月様のドメインを形成する二段階に分けることができるという Roegiers ら (1999) の知見と時間的によく一致している。これらの解析から、myoplasm の三日月様ドメインの形成に、CAMP が寄与している可能性が示唆された。

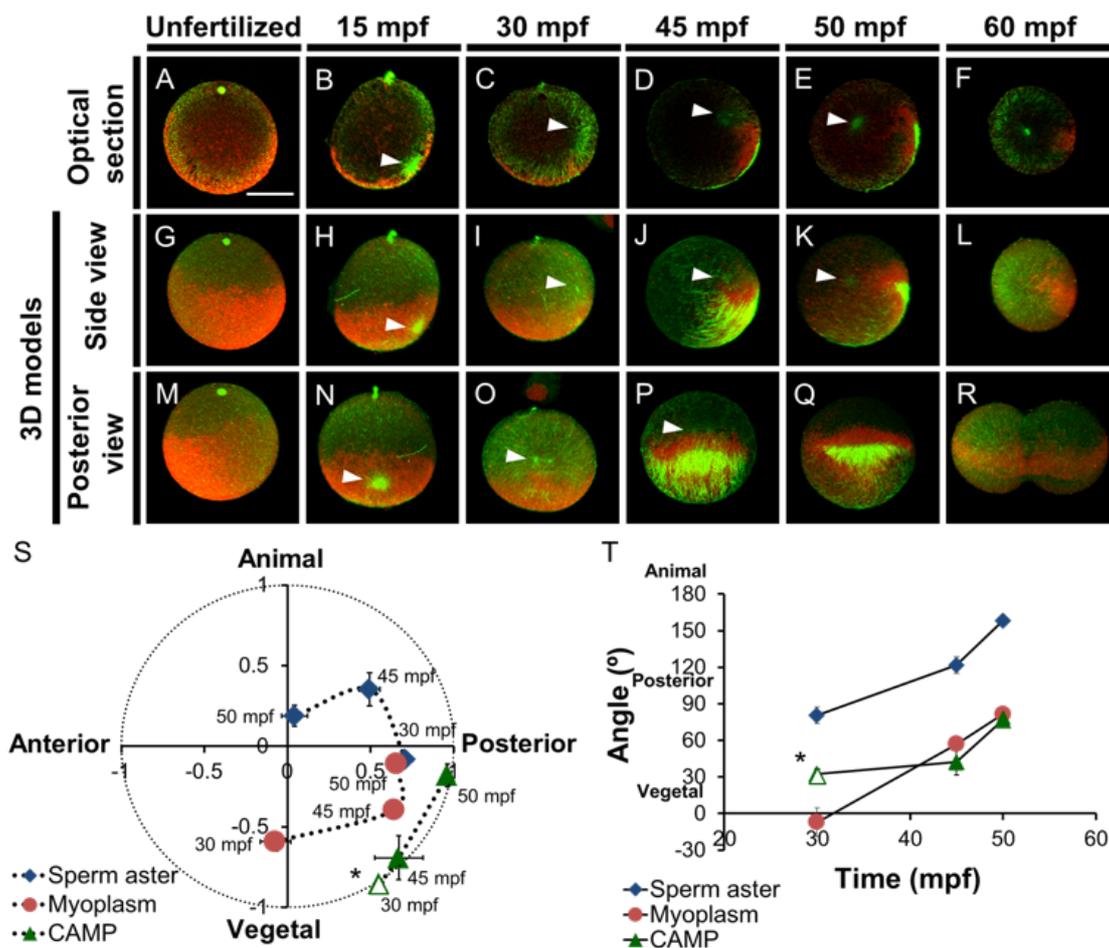


Figure 3-5. 経時的に固定した 1 細胞期 (0 mpf - 60 mpf) の胚を改良 Scale 試薬 G1T0 で前処理した微小管と myoplasm の二重染色後の共焦点顕微鏡像

(A-F) 光学切片を正中断面で示した。図の上が動物極、左が前極にそれぞれ対応する。(G-R) A-F を立体再構成した 3D モデル図。(G-L) 側面からの図で上が動物極、左が前極。(M-R) 後極側から見た図。上が動物極。(S) 精子星状体、myoplasm、表層微小管の中心座標を 30-50 mpf でプロットしたグラフを作成した。*30 mpf では CAMP は形成されていないため、繊維状の表層微小管を計測した。Error bars は SD を表す (n=3)。(T) S のグラフから原点を中心にしたプロットの角度に変換した。矢尻は精子星状体を示している。Error bars は SD を表す (n=3)。スケールバーは 50 μ m。[from Ishii et al., 2017]

3-4. 考察

本研究ではこれまで不明瞭であった 1 細胞期における微小管の挙動が、観察条件を最適化することによって明らかとなった。本研究で用いた改良 Scale 試薬 GIT0 は、特に表層領域の微小管繊維を明瞭にすることに適している。これまでに報告されている後極表層の不明瞭な微小管の局在と CAMP の局在は、時空間的に一致しており、これまでの微小管の局在の実体は CAMP であることを示している。前章で記述したように微小管はチューブリンドイマーやプロトフィラメントを経て形成される。そのため、このような結果を得ることができた要因として、GIT0 の効果により、微小管周囲に存在する余分なチューブリンドイマーやプロトフィラメントなどの染色性を落とすことで、微小管の染色を顕在化させていると考えられる。その一方で、細い微小管バンドルなどの染色も弱まっている可能性があり、そのため、これまで指摘されていた星状体と後極表層の不明瞭な微小管との連続性が観察されなかったのかもしれない。今後さらに、チューブリンの 1 分子解析などの詳細な記載が望まれる。その一方、GIT0 による太い微小管バンドルの明確化は、微小管が寄与する不等卵割などの重要な初期発生イベントの観察にも応用が期待される。

本研究で 1 細胞期における微小管の挙動を明らかにすることで、CAMP を含む 3 つの明確な新規微小管構造を観察することに成功した (Fig. 3-6)。1 つ目は、未受精卵における微小管メッシュワーク DEM である。DEM は減数分裂装置を除く卵表層から中心に向かって 15-20 μm の深さに均一に存在する。受精後に DEM はある期間までに消失する。したがって、未受精卵あるいは第 1 細胞質再配置において myoplasm の移動や局在に重要な役割を担っていることが考えられる。2 つ目の構造である TAF は第 2 細胞質再配置終了後 (15 mpf) に植物極に集積する微小管フラグメントである。TAF は第 2 細胞質再配置の開始時 (30 mpf) に消失していることが観察されており、第 1 から第 2 細胞質再配置へと移行する間に形成されるため、細胞質再配置との関連は不明である。しかし 30 mpf は、植物極表層に微小管バンドルが形成され始め、また精子星状体が著しく発達する時期である。従って、30 mpf 以降に形成される微小管構造における構造形成に参与する因子として期待される。

3 つ目は、第二細胞質再配置で形成される CAMP である。微小管バンドルが 30 mpf で形成され始め、45 mpf で最も発達し CAMP となる。さらに 50 mpf で後極の正中線領域ではより太いバンドルが高度に配列する。高度に中心線に向かって配向しながらその領域を縮小させ、60 mpf では消失する。このように、1 細胞期に一時的に形成されるレール様の発達した表層微小管構造は、上述のカエルやゼブラフィッシュの卵における平行に配列された微小管構造と類似して

いる。またカエル卵では、この表層微小管構造は細胞質の局在パターンを変化させるだけでなく、背側の決定因子である Dishevelled の輸送を行うことが報告されている (Weaver & Kimelman 2004)。同様にゼブラフィッシュでも、背側決定因子である Wnt8a mRNA との共局在が確認されている (Tran et al., 2012)。ホヤの胚軸決定性因子を含む Type I postplasmic/ PEM RNA の後極への局在は、微小管に依存的であることが報告されている (Sasakura et al., 2000; Tanaka et al., 2004)。したがって、1細胞期における表層微小管構造による胚軸決定機構は、比較的幅広い種で保存されているシステムであることが期待される。

これまでの報告では、myoplasm の将来の後極への移動は、精子星状体の移動に追従するものと考えられてきたが、本研究で、微小管構造として精子星状体の他に CAMP が存在していることを明らかにした。本研究で用いた種と別種のホヤである *Phallusia mammillata* では、これまでの報告で myoplasm は第二細胞質再配置において、25 mpf から 40 mpf における後極への移動 (Slow translocation) と、40 mpf から 45 mpf における移動 (Fast translocation) の二段階の移動を示していることが報告されている (Sardet et al., 1989; Roegiers et al., 1999)。本研究で観察された myoplasm の移動に一致した CAMP の収縮は *Phallusia mammillata* で見られる Fast translocation とよく対応しており、Fast translocation に CAMP が関与する可能性が期待される。従って、第二細胞質再配置では、精子星状体に加え CAMP を含めた卵内の微小管構造全体が myoplasm の移動を支えていることが提案される。

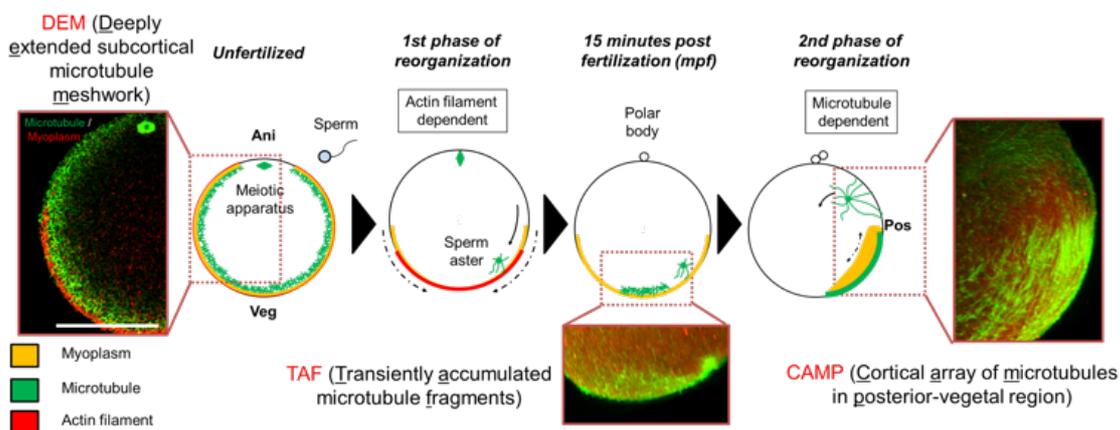


Figure 3-6.ホヤ卵 1細胞期における新規微小管構造

ホヤの 1細胞期に見られる細胞質再配置の模式図および各時期に形成される新規微小管構造を示した。赤枠内は新規微小管構造の共焦点顕微鏡画像である。各画像において微小管(緑)および myoplasm (赤)の染色像を示している。Scale bar = 50 μm 。[from Goto et al., 2019]

第4章 ホヤ1細胞期における微小管構造の制御機構の解析

4-1. 序論

前章で発見したホヤ卵における新規微小管構造 (DEM、TAF、CAMP) は1細胞期という比較的短時間に形成、消失する一過的な構造である (Ishii et al., 2017)。そこで本章では、同じく1細胞期で顕著な変動を示す卵の賦活化に寄与するシグナル分子に着目し、新規微小管構造との関連を解析することで制御機構を解明することを目的とした。前述のように、受精を引き金に多様なシグナル分子の活性が変化し、発生の開始に必要な卵の賦活化を制御する。これらのシグナル分子は卵および体細胞において、下流で微小管を制御していることも報告されている。代表例としてまず、Ca²⁺シグナルが挙げられる。神経細胞ではカルシウム依存的な conventional Protein Kinase C (cPKC)が微小管関連タンパク質である Tau のリン酸化を制御し、微小管の安定性を制御する (Callender and Newton, 2017)。また、マウスの未受精卵においてカルシウム結合タンパク質である Calmodulin が減数分裂装置に存在していることも報告されている (Li et al., 2016)。一方、マウスの未受精卵において ERK1/2 の基質となるタンパク質 MAPK interacting and Spindle-stabilizing Protein (MISS)が同定されており、減数分裂装置の安定化の役割を担っていることが報告されている (Lefebvre et al., 2002)。さらに、多数の微小管関連分子やモータータンパク質がサイクリン依存性キナーゼ類 (Cyclin dependent kinase: CDK) により制御されていることも報告されている (Errico et al., 2010)。従って、卵の賦活化に必要なシグナル分子は、これまでに述べてきた卵内の変化に加え、卵内の微小管の制御にも重要であることが示唆される。そこで、本章では発生の開始に必要なシグナル伝達分子が新規微小管構造の制御にも寄与していることを期待し、研究を行った。

4-2. 実験操作

4-2-1. 実験動物

ホヤ成体 (*Ciona intestinalis*) は、National Bio-Resource Project より提供されたものを使用した。ホヤ成体から採卵後、コリオンを除去 (Ishii et al., 2012, 2014) し、フィルター濾過を行った 18°Cの海水中で発生させた。この条件下で発生した卵は、受精後 30 mpf で第二細胞質再配置、60 mpf で第一卵割を開始する。受精には、別個体から採精した精子を 1N NaOH で pH を約 11 にすることで活性化

させ、海水中で受精させた。

4-2-2. 顕微注入法

顕微注入に用いたマイクロガラスピペットおよびマイクロガラスピペットに試料を充填するガラスピペットはガラス管 (Microcaps, Drummond Sci. USA) をから作製した。マイクロガラスピペットは微小ガラス針作製装置 (Sutter Instrument, Novato, USA) を用いて作製した。作製したガラスピペットおよびマイクロガラスピペット作製に用いたガラス管は乾熱滅菌後使用した。試料である Heparin (Nacalai tesque, Japan) を蒸留水に 3 mg/ml または 25 mg/ml で溶解させた。調整試料をマイクロガラスピペットに充填後、実体顕微鏡 (Stemi 2000-c, Carl Zeiss, Germany) に固定したマイクロマニピュレーター (Model MN-151, Narishige, Japan) に装着した。コリオンを除去した未受精卵を 1.5% Agar gel 上に整列させ、注入した試料の直径が卵の直径の 1/5 程度になるよう空気圧により注入した。Heparin は IP3R の antagonist として働き、ホヤの卵では Ca^{2+} オシレーション series 2 の阻害が報告されている (McDougall and Sardet, 1995)。

4-2-3. 薬剤添加実験

MEK 阻害剤 U0126 (Sigma-Aldrich, USA)、CDK 阻害剤 Roscovitine (Merck Millipore, Germany)、タンパク質合成阻害剤 Cycloheximide (Sigma-Aldrich, USA)、アクチン重合阻害剤 Cytochalasin B (Sigma-Aldrich, USA)、ダイニンの ATPase 阻害剤 Ciliobrevin D (Sigma-Aldrich, USA) を用いた。Ciliobrevin D、U0126、Roscovitine、Cytochalasin B は DMSO に溶解させ、それぞれ終濃度が 30 μ M、1 μ M、20 μ M、2 μ g/ml になるように添加した。Cycloheximide はエタノールに溶解し、終濃度が 0.4 mg/ml または 1 mg/ml になるように添加した。各阻害剤におけるコントロールとして DMSO またはエタノールを阻害剤処理群の同じ溶媒の濃度になるように添加した。

4-2-4. 卵の賦活化

卵の賦活化は Calcium ionophore A23187 (Sigma-Aldrich, USA) を DMSO に溶解させ、終濃度 8 μ M になるように未受精卵に添加した。Calcium ionophore は膜透過性のカルシウムイオンキャリアであり、外部のカルシウムイオンを細胞内に流入させる。Swada および Schatten の報告 (1988) では、ホヤ卵に対して 5 分間の処理で第 1 細胞質再配置、極体の放出が観察されている (Swada and Schatten,

1988)。

4-2-5. 免疫蛍光染色

目的のステージまで発生させた胚を 100% MeOH を用いて室温で 1 時間固定を行った。その後、標本は 100% EtOH に置換後-20°Cで保存した。染色時、標本は 0.05% Tween 20 を含む PBST を用いて洗い、改良 Scale 試薬 G1T0 (4 M 尿素 [MP Biomedicals, USA]、1% グリセロール) で 4°C、90 分間処理を行った。Scale 処理を行った胚を再び PBST で洗い、一次抗体として anti- α -tubulin mouse monoclonal antibody (1:100)、anti-MnSOD rabbit antisera (1:40) を添加した。これらはそれぞれ anti- α -tubulin antibody は微小管、anti-MnSOD antibody は Myoplasm (Ishii et al., 2012) を標識する抗体として用いた。二次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1:1000)、Alexa Fluor 532-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:1000) を用いて蛍光標識を行った。抗体の希釈溶液は全て Blocking one を用いた。また、5 μ g/ml DAPI により、染色体を蛍光標識した。

4-2-6. 画像解析

種々の染色を行った全載標本は EtOH の上昇系列 (35%、70%、100%) により脱水後、サリチル酸メチルで透明化処理を行い、ホールスライドガラスにマウントした。試料の観察は共焦点顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss, Germany) を用いて行った。取得した画像は、イメージングソフトウェア ZEN Black edition および Blue edition (Carl Zeiss) を用いて画像化し、光学切片、立体再構成した 3D 画像をそれぞれ取得した。光学切片は正中断面 (画像の上側が動物極、右側が後極) で作製し、一方 3D 画像は矢状断面から立体再構成し、side view (画像の上側が動物極、右側が後極) および posterior view (画像の上側が動物極)、vegetal view (画像の右側が後ろ側)を作成した。また、ZEN Blue edition を用いて断面 3D 画像を作成した。画像解析は画像解析ソフトウェア Image J Fiji (Schindelin et al., 2012) を用いて実施した。Fiji を用いた画像解析の工程は各図において模式図および説明を記述した。

4-3. 実験結果

4-3-1. 新規微小管構造の挙動と減数分裂進行の相関解析

第3章で発見した3つの新規微小管構造に関して解析を行うにあたり、これらの構造が1細胞期の中で急速にかつ大きな変化（DEM: 10 mpf以内に消失、TAF: 15 mpfで形成され30 mpfまでに消失、CAMP: 30-50 mpfで形成され、大きく形態を変化させる）を示すための正確な発生時間に関する基準が必要不可欠である。これまでの研究では、媒精から何分後かを示すminutes post fertilization (mpf)を基準に観察を行ってきた（Ishii et al., 2017）。しかし、媒精から実際に受精が成立するまでに要する時間には卵の間で差が生じるため、mpfを基準にしてしまうとバラツキを含んだ解析を行うことになる。本研究の微小管構造の制御メカニズムや機能を解明するという目的を達成するためには、時間に代わるより正確な基準が求められる。そこで、時間に代わる基準として細胞周期に着目した。ホヤの卵では受精後、正確に第1減数分裂、第2減数分裂、間期を経て体細胞分裂期（第1卵割）へと移行する。この細胞周期に対応する核の挙動をもとにしたステージ分類を基準とすることで受精成立のタイミングがずれた卵でも、標準化することが可能であると考えられる。

はじめに、各時間（mpf）における細胞周期の割合を定量した。この定量から、各時間において複数の細胞周期ステージが混在していることが示された（Fig. 4-1A, B, B'）。また、減数分裂を終了し、体細胞分裂へと移行する間期の間では雌性前核の状態が時間により大きく異なることが観察された（Fig. 4-1A）。そこで、本研究ではこの間期をPronuclear stageと呼び、また、雌性前核の挙動から前核形成期（Pronucleus formation: PNfo）、前核移動期（Pronucleus migration: PNm）、前核融合期（Pronucleus fusion: PNfu）に区分した（Fig. 4-1A）。次に、各細胞周期ステージにおける新規微小管構造の形成割合を定量した（Fig. 4-1C）。その結果、各微小管構造は細胞周期の進行と明確な相関が見られた。未受精卵に存在するメッシュワーク構造DEMはAnaphase I (Ana I)からTelophase I (Telo I)までに消失し、植物極の微小管フラグメントの集積TAFはProphase II (Pro II)からPrometaphase II (Prometa II)の間、ごく短時間形成される。一方、レール様の表層微小管構造CAMPはPNmから第一卵割におけるMetaphase (Meta 1)において形成される。以上より、新規微小管構造の挙動は細胞周期の進行と強い相関を示し、また、これまでの基準であるmpfに代わり、細胞周期の進行を指標に標準化することで正確な解析を行えることが示唆された。

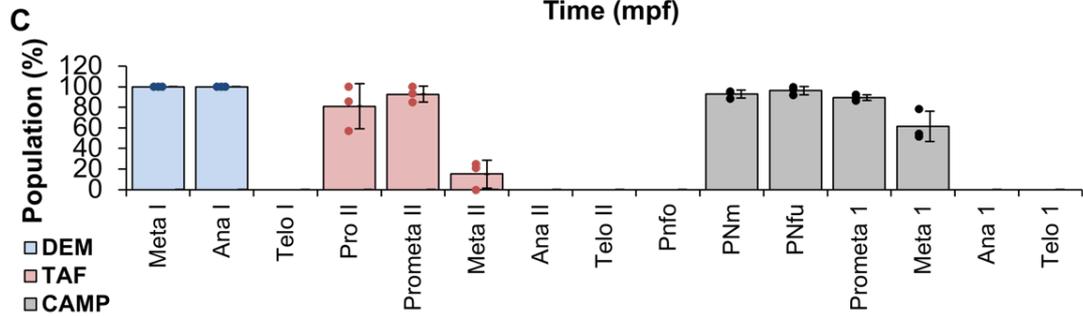
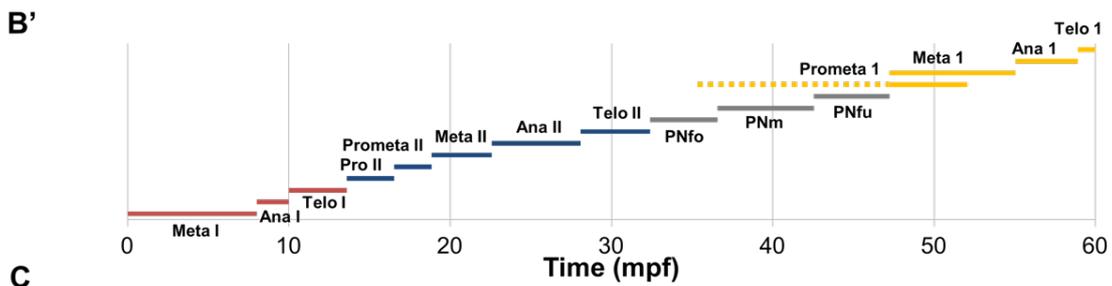
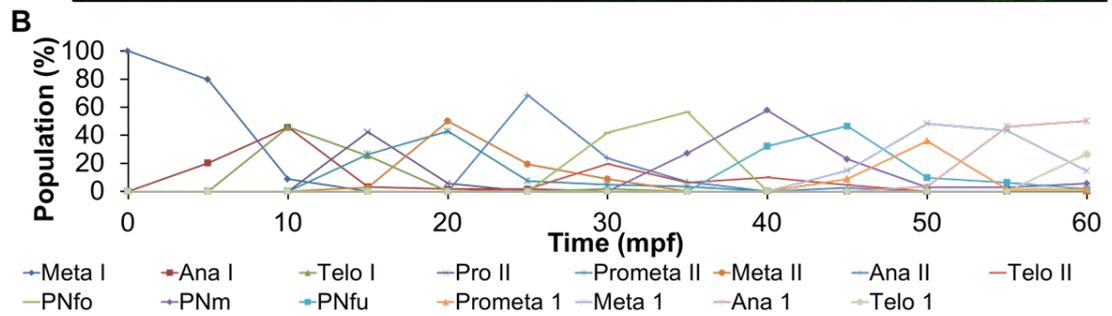
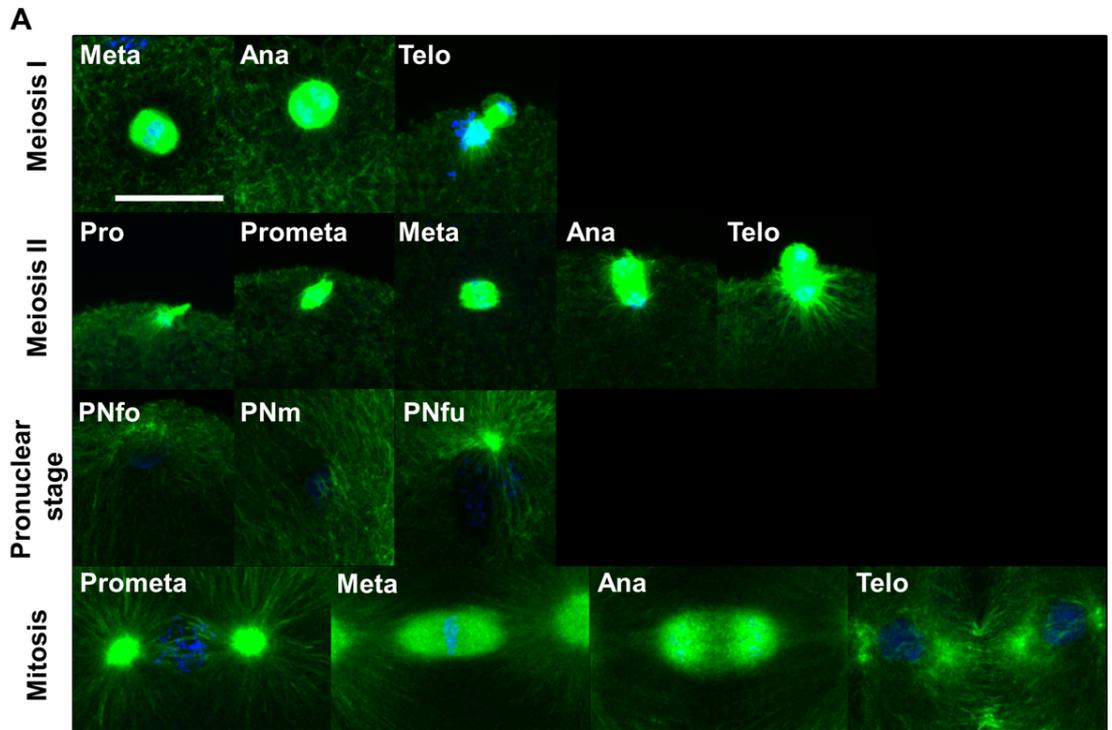


Figure 4-1. ホヤにおける減数分裂の進行と新規微小管構造の相関

(A) ホヤ卵の未受精卵および受精卵を5分毎に受精後60分までアルコール固定を行い、anti- α -tubulin mouse monoclonal antibodyで微小管(緑)とDAPIで染色体(青)を染色した。図は染色した試料の共焦点顕微鏡で撮影した減数分裂装置の拡大3D画像を示している。減数分裂期はProphase (Pro)、Prometaphase (Prometa)、Metaphase (Meta)、Anaphase (Ana)、Telophase (Telo)を経て進行し、間期 (Pronuclear stage)では雌性前核の挙動からPronuclear formation (PNfo)、Pronuclear migration (PNm)、Pronuclear fusion (PNfu)に区分することができる。Scale bar=20 μ m。(B,B') 受精後0分 (0 minutes post fertilization:mpf)から60 mpfまで5分毎に固定したサンプルにおいて細胞周期各ステージの割合を算出した。割合は独立した3回の実験において各時間につき60個以上の卵を計測することで求めた。また、Bのグラフにおける各プロットのピークから細胞周期の時間変化をB'に示した。Prometa 1における黄色点線は精子由来の中心体複製期を示す。(C) 各細胞周期における新規微小管構造の形成率を算出した。割合は独立した3回の実験において各細胞周期につき30個以上の卵を計測することで求めた。Dot plot と Bar graph はそれぞれ各実験における形成率と実験間の平均値を示している。Error bars はSDを表す (n=3)。[from Goto et al., 2019]

4-3-2. 各細胞周期における新規微小管構造の微小管ダイナミクスの解析

第2章で記述したように、細胞内では微小管が重合、脱重合を繰り返すことで微小管構造の形成、消失や形態変化を示す微小管ダイナミクスが働いている。微小管構造の形態は自身の機能や制御メカニズムと密に関係しており、微小管ダイナミクスを明らかにすることは微小管構造の特性を明らかにする上で重要である。そこで、新規微小管構造の微小管ダイナミクスを明らかにするために、細胞周期を基準とした解析を行った。

まず、メッシュワーク構造DEMに関して解析を行ったところ、未受精卵では明確なメッシュワーク構造を示す一方で、Telo IにおいてDEMは観察されなかった (Fig. 4-2B)。さらに、表層領域における微小管繊維の本数を計測する方法により定量した結果、Telo Iでは有意に微小管繊維が減少していることが示された (Fig. 4-2A, C, C', D)。しかし、本来DEMが形成される領域には比較的明るい不明瞭な微小管の染色が認められた (Fig. 4-2B)。従って、DEMはTelo Iまでに崩壊し、チューブリンモノマーあるいは微小なフラグメントとして存在していることが示唆される。次にTAFに関して解析を行った。Telo Iにおける植物半球では、第1細胞質再配置により移動した精子由来の中心体が精子星状体を形成しており、Pro IIからPrometa IIにかけて精子星状体近傍にTAFが形成される (Fig. 4-2E)。その後、Meta IIからAna IIにおいてTAFが消失する一方で、精子星状体は急速に発達し始めることが観察された (Fig. 4-2E)。さらに、各細胞周期における星状体微小管の長さを定量した結果、Ana IIでは有意に増加していることが示された (Fig. 4-2F, G)。従って、この期間にTAFの形成および消失、精子星状体の発達が行われることから、Pro IIからMeta IIにおける植物半球では

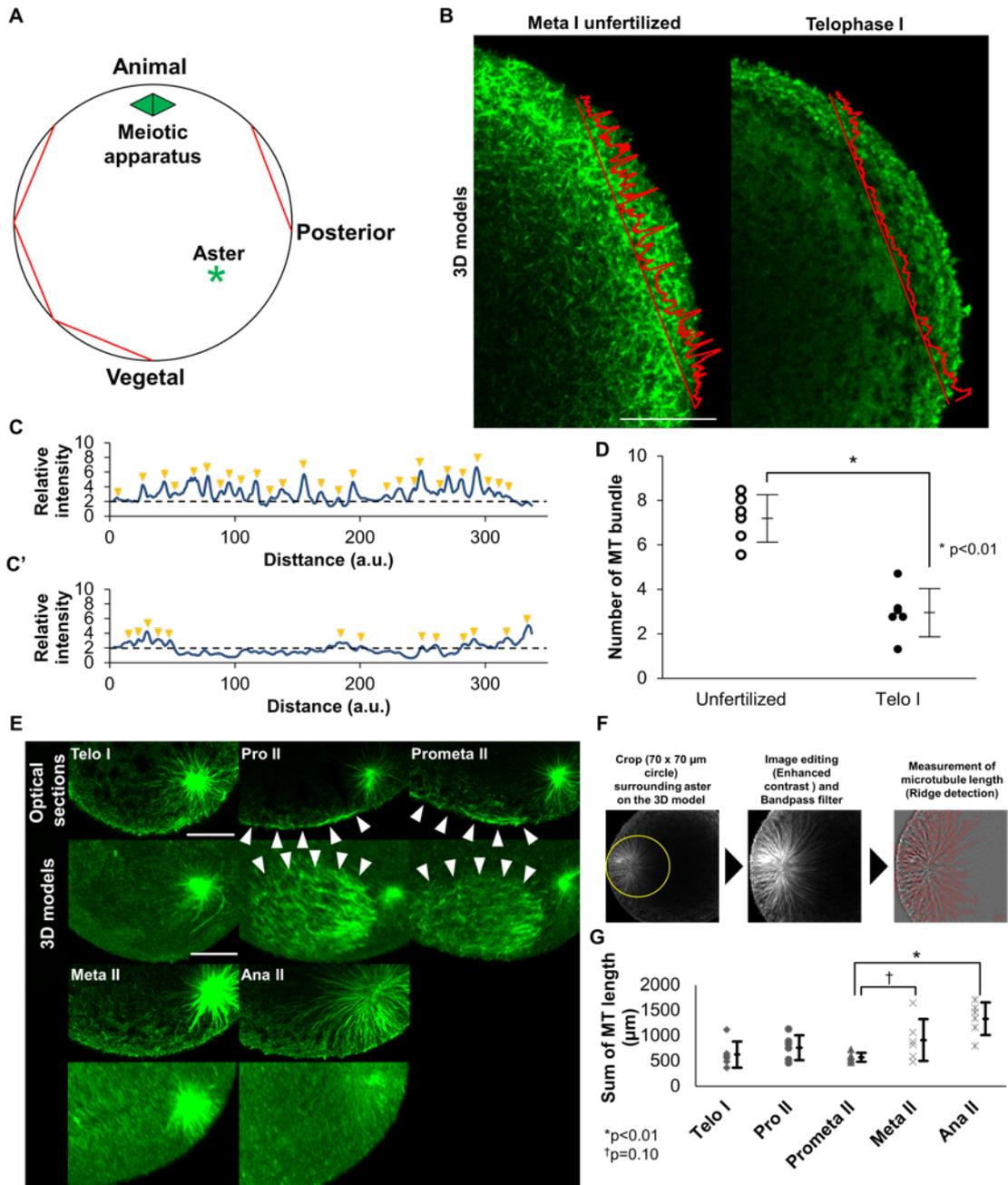


Figure 4-2. DEM および TAF の細胞周期ごとの挙動

(A) DEM における微小管繊維の解析方法の模式図を示した。画像解析はすべて Excel または ImageJ Fiji を用いて実施した。八角形の赤線上(減数分裂装置、および精子星状体が形成される位置を除く)の蛍光強度を測定した。蛍光強度は正中断面の上下スタック五枚分で解析した。(B) アルコール固定を行った試料を抗 α Tubulin 抗体で微小管 (緑) を染色した。図は共焦点顕微鏡で撮影した DEM の拡大 3D 画像を示している。赤線は蛍光強度の測定位置および蛍光強度の波形の一例を示している。Scale bar = 20 μ m。(C,C') B における蛍光強度を卵全体の蛍光強度の中央値で相対値化した後、ノイズを緩和するために数値の移動平均値を算出した (Relative intensity)。その後、relative intensity = 2 を閾値としてピークの数を実測した。黄色矢尻はピークを示す。(D) A-C の手法で計測したピーク数を Dot plot で示した。各 Plot は卵一個あたりの平均値を示しており (4 ライン x 5 スタック)、合計 6 個の卵で計測した。Error bars は SD を表す (n = 6)。また、2 標本間において t 検定を実施することで有意差を求めた (n = 120、*p < 0.01)。(E) アルコール固定を行った試料を抗 α Tubulin 抗体で微小管 (緑) で染色した。図は染色した試料を共焦点顕微鏡で撮影した TAF の拡大画像を示している (上段: 光学切片、下段: Vegetal view)。矢尻は TAF を示す。Scale bar = 20 μ m。(F) 星状体微小管における微小管繊維の長さを解析する方法の模式図を示した。精子星状体が含まれる 6 枚のスタック画像を作成し、精子星状体を直径 70 μ m の円で抽出した。抽出した画像はコントラストの編集および Bandpass filter を用いることで星状体微小管を分節化した。ImageJ Fiji の Plugin より Ridge detection (Steger, 1998) を用いることで分節化された星状体微小管の長さの合計を実測した。(G) F の手法で計測した星状体微小管の長さの合計を Dot plot で示した。各 Plot は卵一個あたりの平均値を示しており、合計 6 個の卵で計測した。Error bars は SD を表す (n = 6)。また、2 標本間において t 検定を実施することで有意差を求めた (n = 120、*p < 0.01、† p = 0.07)。[from Goto et al., 2019]

微小管ダイナミクスが活発化していることが示唆された。

最後に CAMP に関して解析を行った。CAMP は pronuclear stage から体細胞分裂期に形成される微小管構造である。形成の直前である PNfo では発達した精子星状体が植物半球に存在する (Fig. 4-3)。この際、星状体微小管が表層に接触している様子が観察された。PNm で精子星状体は後極へと到達する。この際、植物極表層で点状の集積や太い繊維となるバンドル構造を形成し、ネットワークを構築していることが観察された。PNfo で精子星状体が表層から卵の中心へと進入する。この際、後極植物極表層では CAMP に相当する発達したレーン様の微小管構造が形成される。詳細な観察から CAMP の領域は植物後極表層の広い領域にわたるものの、特に赤道付近の正中線領域に強い集積を示していることが示された。その後最初の体細胞分裂期 Prometa 1 に入ると、卵の中心付近で体細胞分裂装置が形成しはじめる。この際、CAMP の正中線領域では一部の微小管バンドルが乱雑に纏れ、縮小しはじめていることが観察された。紡錘体が形成され分裂装置が完成する Meta 1 では、CAMP の領域は顕著に縮小し、正中線領域で短いバンドルが高度に配向していることが観察された。以上の結果より、新規微小管構造の挙動詳細が明らかとなり、また、それらは細胞周期の進行に従い

変化していることが示唆された。

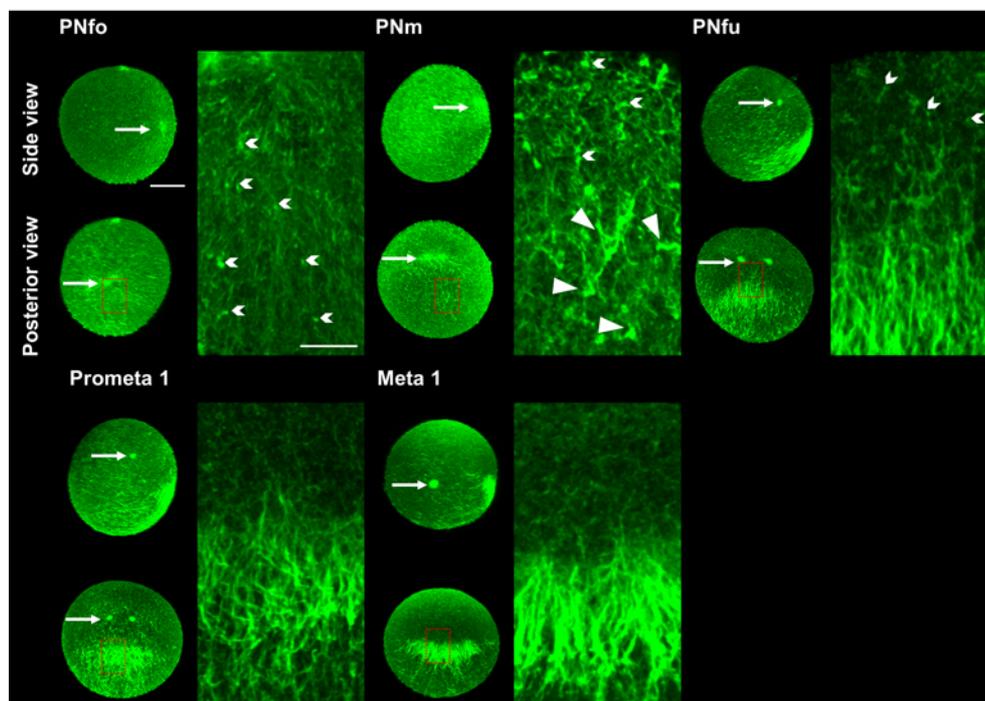


Figure 4-3. Pronuclear stage における CAMP および精子星状体の挙動

アルコール固定胚に対して抗 α Tubulin 抗体で微小管 (緑)を染色した試料の共焦点顕微鏡画像を示した。左上段図は Side view、下段図は Posterior view、右図は Posterior view における赤四角部分の拡大図をそれぞれ示している。20 μ m (右図)。[from Goto et al., 2019]

4-3-3. 第 1 細胞質再配置における微小管構造の制御機構の解析

次に、卵の賦活化に寄与するシグナル分子が新規微小管構造の制御に関与しているかを確認するために細胞周期を基準に解析を行った。まず、DEM が消失するメカニズムに関して解析した。DEM の変化が示される Meta I から Telo I では Ca^{2+} オシレーション series 1 や MPF 活性の低下が見られる (Russo et al., 1996, 2009; Fig. 4-4)。また、MAPK 活性は高い状態が維持されている。そこで、未受精卵を用いてこれらの状態を模倣し、DEM の変化を解析した。まず、 Ca^{2+} オシレーションを模倣するために、未受精卵に対してカルシウムイオンを細胞内へと流入させる calcium ionophore A23187 (CaI) を添加する実験 (賦活化) を実施した。未処理卵では DEM が確認された一方で、賦活化から 10 分で DEM は崩壊していることが観察された (Fig. 4-5A)。また、CaI の処理により卵内の Ca^{2+} 濃度は増加すると同時に、MPF や MAPK 活性が低下することが報告されている (Russo et al., 1996, 2009)。そこで、MPF や MAPK 活性の低下が DEM の崩壊に

寄与するかを確認するために、CDK 阻害剤 である Roscovitine (Meijer et al., 1997) および MEK 阻害剤である U0126 (Favata et al., 1998)を未受精卵に添加することで解析を行った (Fig. 4-5A)。その結果、どちらの阻害剤でも DEM の崩壊は誘導されなかった。従って、DEM の崩壊は Ca^{2+} 濃度の上昇に伴う Ca^{2+} シグナルによって誘導されていることが示唆される。

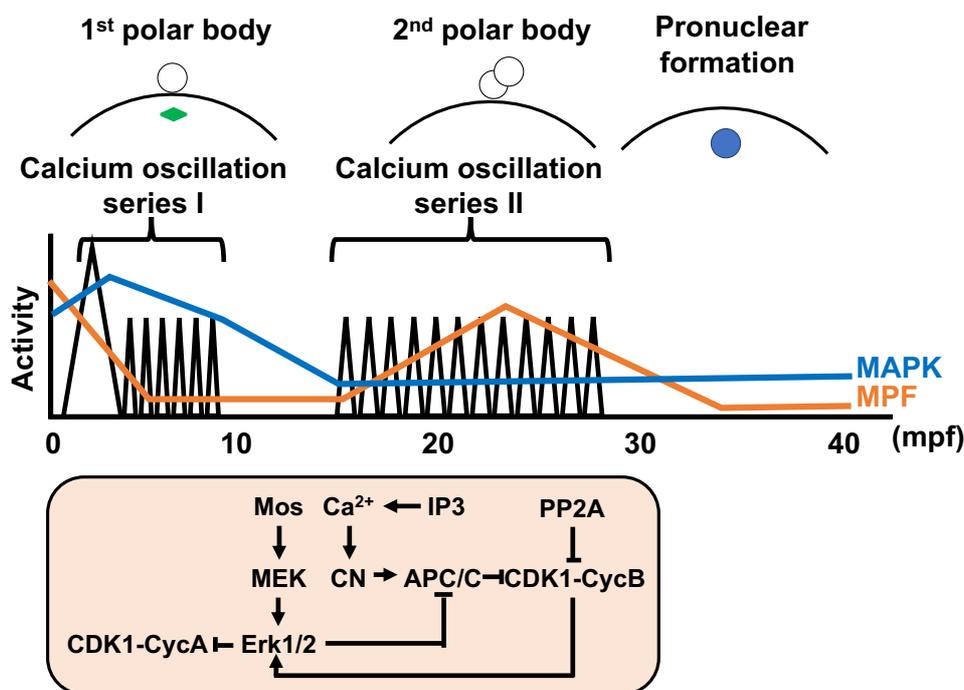


Figure 4-4. ホヤで報告されている卵の賦活化と制御に寄与するシグナル分子の活性およびシグナル伝達経路

次に、TAFの形成制御メカニズムに関して解析を行った。TAFは植物極表層に形成される微小管構造である (Fig. 4-5E)。そこで、同様に植物極表層で局在を示すアクチン繊維との関わりに着目した。アクチン繊維は Ca^{2+} シグナルの変化依存的に、受精後すぐに植物極で集積する (Sawada and Schatten 1989; Yoshida et al., 2003)。これにより卵表層が植物極に向かって収縮するCortical contractionが誘導される (Roegiers et al., 1999; Chiba et al., 1999)。そこで、アクチン重合阻害剤であるCytochalasin B (CytB)を用いてCortical contractionを阻害した際の微小管の挙動を解析したところ、TAFの形成が阻害された (Fig. 4-5B, C)。逆に、賦活化卵においてはTAFの形成が観察された (Fig. 4-5D)。したがって、TAFの形成は Ca^{2+} シグナルにより誘導されるCortical contractionで植物極へと集積した何らかの因子によって制御されているか、または微小管とアクチン繊維の細胞骨格間相互作用により制御されている可能性が示唆された。

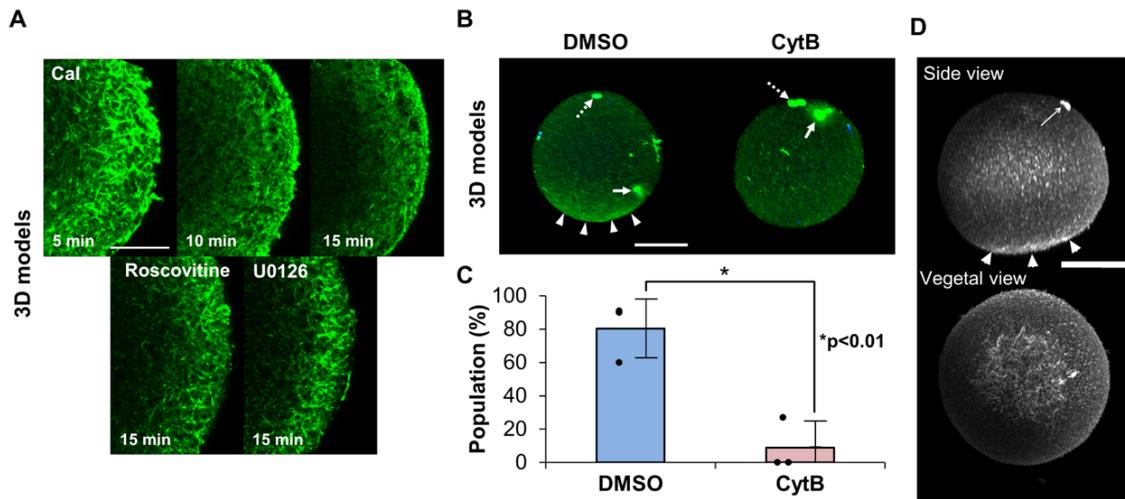


Figure 4-5. 減数分裂期における卵の賦活化に寄与するシグナル分子と微小管構造の挙動

(A) 未受精卵に対して Calcium ionophore A23187 (CaI, 8 μ M) および、roscovitine (20 μ M)、U0126 (1 μ M) で 15 分間の処理を行った。各時間でアルコール固定を行い、抗 α Tubulin 抗体で微小管 (緑) を染色した試料の共焦点顕微鏡画像を示した。各画像は正中断面の 3D 画像を示している。Scale bar = 20 μ m。(B) 未受精卵に対して cytochalasin B (CytB, 2 μ g/ml) またはコントロールとして DMSO で 10 分間処理を行った後に受精させ、受精後 20 分でアルコール固定を行った。図は、アルコール固定胚に対して抗 α Tubulin 抗体で微小管 (緑) と DAPI で染色体 (青) を染色した試料の共焦点顕微鏡画像 (3D 画像: Posterior view) を示している。矢印および点矢印、矢尻はそれぞれ精子星状体、減数分裂装置、TAF を示している。Scale bar = 50 μ m。(C) CytB または DMSO で処理した卵における TAF の形成率を算出した。形成率は独立した三回の実験において 90 個以上の卵を計測することで求めた。Dot plot と Bar graph はそれぞれ各実験における形成率とその平均値を示している。Error bars は SD を表す (n = 3)。また、2 標本間において t 検定を実施することで有意差を求めた (*p < 0.01)。(D) CaI で 15 分間処理した未受精卵をアルコール固定し、抗 α Tubulin 抗体で微小管を染色した試料の共焦点顕微鏡画像を示している。画像はそれぞれ上段が Side view、下段が Vegetal view を示している。矢印および矢尻はそれぞれ減数分裂装置、TAF を示している。Scale bar = 50 μ m。[from Goto et al., 2019]

4-3-4. 第2細胞質再配置における微小管構造の制御機構の解析

最後に CAMP の制御と卵の賦活化に寄与するシグナル分子に関して解析を行った。CAMP は減数分裂が終了した後に始まる pronuclear stage から体細胞分裂期にかけて形成される微小管構造である (Fig. 4-3)。そこでまず、減数分裂期に見られるシグナル分子の変化が CAMP 形成に関与しているかを解析した。まず、 Ca^{2+} シグナルに関して賦活化卵を用いた解析を行った。前述のように、賦活化実験は卵の Ca^{2+} 濃度の上昇を模倣することができる (Sawada and Shatten, 1988)。先行研究において、ホヤの未受精卵に対して同じく CaI を 4 分間処理にした実験では二回の減数分裂や前核形成が受精卵とほぼ同じタイミングで行われることが報告されている (Dumollard et al., 2011)。一方で、二回目の減数分裂の際に、MPF 活性が受精卵に比べて 20 分遅れて上昇することも示されている (Dumollard et al., 2011)。また、IP3 を顕微注入することで Ca^{2+} 濃度を上昇させる賦活化実験では、IP3 を少なくとも 20 分以上のインターバルを挟み二回顕微注入しなければ、二回の減数分裂が終了しないことが報告されている (Yoshida et al., 1998)。さらに、Non-metabolic IP3R agonist である adenophostin B を顕微注入することで、

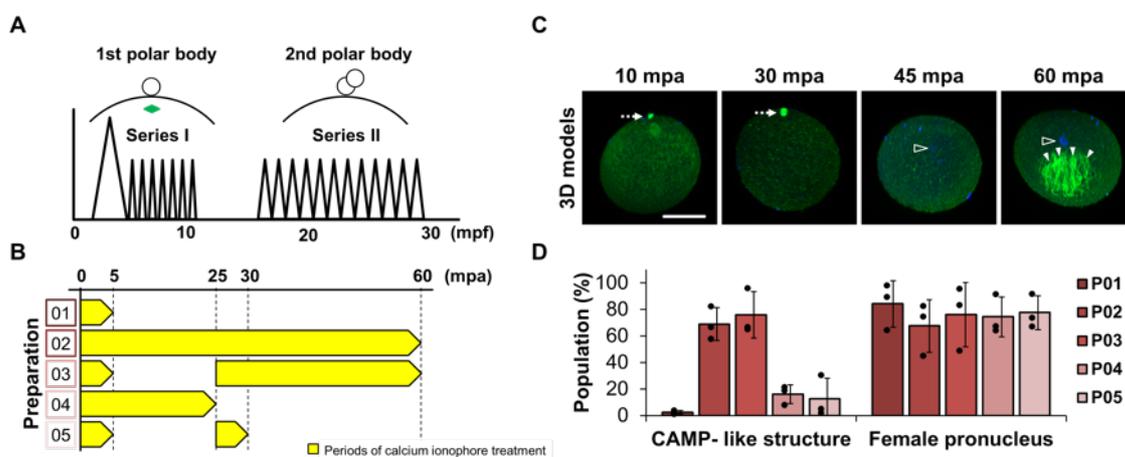


Figure 4-6. 賦活化卵における微小管の挙動

(A) Rosso らの報告 (1996) を参照した *Ciona intestinalis* における Ca^{2+} オシレーションおよび極体放出の模式図を示した (Rosso et al., 1996)。 (B) CaI の処理を行うサンプル (P01 から P06) の説明図を示した。黄色ブロックは処理時間を示す。 (C) P02 において賦活化後 (minutes post activation: mpa) それぞれ 10、30、45、60 mpa でアルコール固定を行い、抗 α Tubulin 抗体で微小管 (緑) と DAPI で染色体 (青) を染色した。図は染色した試料の共焦点顕微鏡画像 (3D 画像:Posterior view) を示している。点矢印および、矢印、中抜け矢印はそれぞれ減数分裂装置、CAMP 様構造、前核を示す。Scale bar = 50 μm 。 (D) 60 mpa における各サンプルの CAMP 様構造および前核の形成率を算出した。形成率は独立した三回の実験において 100 個以上の卵を計測することで求めた。Dot plot と Bar graph はそれぞれ各実験における形成率とその平均値を示している。Error bars は SD を表す (n = 3)。 [from Goto et al., 2019]

継続的な Ca^{2+} オシレーションが誘導され、二回の減数分裂が終了することが報告されている (Yoshida et al., 1998)。以上の先行研究を元に本研究では、P01 から P06 のサンプルを作製した (Fig. 4-6B)。P01 は一般的に行われる短時間 (5 分間) の処理を行ったサンプルであり、一方で P02 は adenophostin B の実験を模倣した長時間 (1 時間) 処理したサンプルである。各サンプルで経時的に微小管の挙動を解析した結果、P02 において CAMP 様の微小管構造が形成されていることが示された (Fig. 4-6C)。

受精卵では二回の Ca^{2+} オシレーションが生じる (Fig. 4-6A)。そこで次に、どの Ca^{2+} オシレーションが CAMP 形成に寄与するかを解析するために、 Ca^{2+} オシレーション series 2 を模倣したサンプルを作成した (Fig. 4-6B)。また、より正確に受精卵での状態を模倣するために、次に記す先行研究における知見 1) 受精卵では Ca^{2+} オシレーションと MPF 活性の上昇のタイミングが非常に良く相関すること (Levasseur et al., 2007)、2) 賦活化卵では 20 分遅れで MPF 活性が上昇すること (Dumollard et al., 2011)、3) IP_3 の顕微注入を 20 分間隔で二回行うことで減数分裂が終了すること (Yoshida et al., 1998) を参考にした P03 (5 分間処理後 20 分で再び 45 分間処理) を作成した。さらに、P03 のコントロールとして P04 および P05 を作成し解析を行った。これらの P03 から P05 において、 Ca^{2+} オシレーション series 2 を模倣した P03 でのみ CAMP 様の構造が形成された (Fig. 4-6D)。そこで、 Ca^{2+} オシレーション series 2 の阻害を示すことが報告されている Heparin を顕微注入し、受精卵で観察を行った結果、CAMP の形成が阻害された (Fig. 4-7)。以

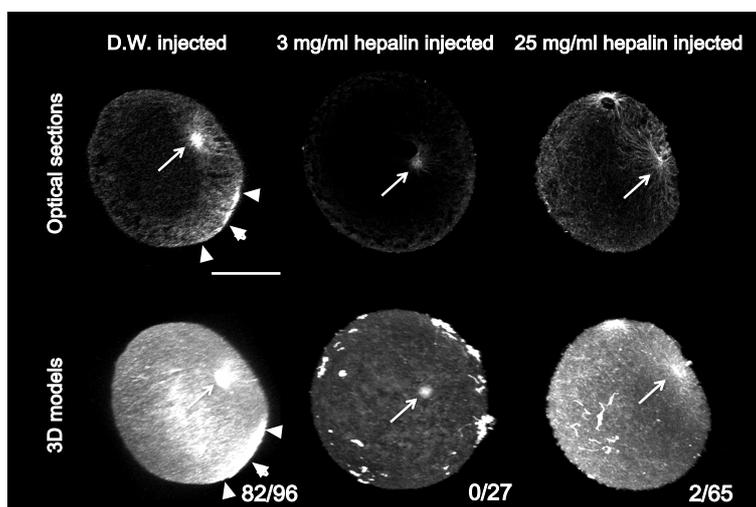


Figure 4-7. Heparin の微小管構造への影響

Heparin (3 mg/ml、25 mg/ml)あるいはコントロールとして蒸留水を未受精卵に対して顕微注入し、受精後 45 mpf でアルコール固定を行った。固定標本は抗 α Tubulin 抗体で微小管を染色した。図は染色した試料の共焦点顕微鏡画像 (上段：光学切片、下段：Side view)を示している。矢印および矢尻、左下の数値はそれぞれ精子星状体、CAMP、CAMP 形成を示した卵の数を示す。Scale bar = 50 μm 。

上の結果より、賦活化卵でCAMP様の構造が形成されることから、CAMPの形成は精子に依存しないことが示された。また、Ca²⁺オシレーション series 2に伴うCa²⁺シグナルがCAMP形成に関与することも示唆された。

次に、MAPK活性とCAMP形成に関して解析を行った。ホヤでは減数分裂が終了したあと pronuclear stageへと移行するために、MAPK活性の低下が必要である (Dumollard et al., 2011)。そこで本研究では、MAPK活性の低下とCAMP形成の関係を明らかにするために、U0126で処理しMAPK活性を低下させた受精卵を用いて解析を行った。その結果、受精の10分前からU0126で処理した卵では、受精後45分においてCAMPの形成が阻害されていることが示された (Fig. 4-8A, B)。一方で、MAPK活性がすでに抑制されている受精後30分からU0126で処理した卵ではCAMPが正常に形成されていることが観察された (Fig. 4-8A, B)。つまりこれらの結果は、MAPK活性がCAMP形成の制御に関与していることを示唆している。そこで、受精前から処理した卵において経時変化を観察したところ、受精から10分でコントロールに比べ精子星状体が発達していることが観察された (Fig. 4-8C)。その後20分では、精子星状体は受精後30分の正常卵における精子星状体と同様の大きさまで発達し、また、雌性前核の形成が確認された (Fig. 4-8C)。さらに、受精から30分で体細胞分裂装置およびCAMPの形成が観察された (Fig. 4-8C)。一方で、タンパク質合成阻害剤処理により、MAPK活性抑制の阻害や減数分裂進行が遅延することが報告されており (Marino et al., 2000; Russo et al., 2009)、何かしらの新たに合成されるタンパク質がMAPK活性の抑制に寄与していることが考えられる。そこで、タンパク質合成阻害剤であるcycloheximideで10分間処理した後に受精させ、微小管の挙動を観察した。受精後1時間でコントロールでは第1卵割が開始していることが観察された (Fig. 4-8D)。また、0.4 mMのcycloheximideで処理した卵において、体細胞分裂装置やCAMPの縮小が見られる50 mpf、1 mMでは前核融合やCAMPの形成を示す45 mpfの正常卵と類似した卵がそれぞれ観察された (Fig. 4-8D)。この結果は、cycloheximideの濃度依存的に発生の遅延が生じたことを示唆している。以上の結果より、MAPK活性の変動あるいは細胞周期の進行がCAMP形成制御に関与していることが示唆された。

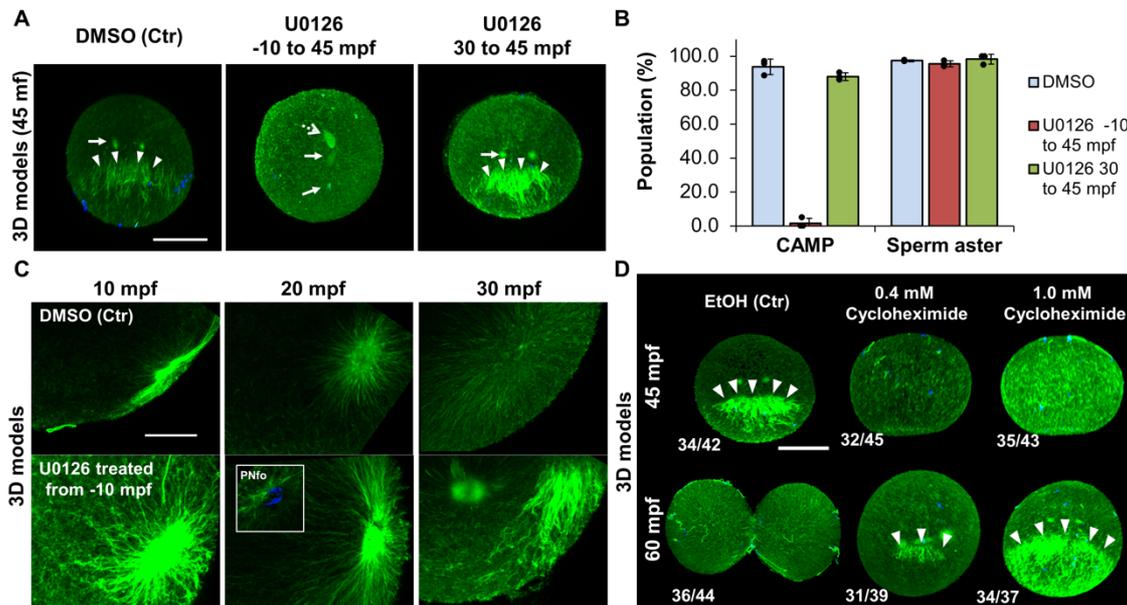


Figure 4-8. U0126 処理による微小管の挙動

(A)受精 10 分前または受精後 30 分から 45 分まで U0126 (1 μ M) で処理した。また、コントロールとして受精 10 分前から DMSO で処理を行った。これらのサンプルを受精後 45 分でアルコール固定を行い、抗 α Tubulin 抗体で微小管 (緑) を、DAPI で染色体 (青) を染色した。図は染色した試料の共焦点顕微鏡画像 (3D 画像:Posterior view) を示している。点線矢印および、矢印、矢尻はそれぞれ減数分裂装置、精子星状体、CAMP を示す。Scale bar = 50 μ m。 (B) A の各サンプルにおける受精後 45 分の CAMP および精子星状体の形成率を算出した。形成率は独立した 3 回の実験において 100 個以上の卵を計測することで求めた。縦軸は CAMP あるいは精子星状体の形成率の平均値を示している。Error bars は SD を表す (n = 3)。 (C) 受精 10 分前から 45 分まで U0126 (1 μ M) および DMSO で処理した卵を受精後 10、20、30 分でアルコール固定を行い、抗 α Tubulin 抗体で微小管 (緑) を、DAPI で染色体 (青) を染色した。図は、共焦点顕微鏡で取得した正中断面における植物極後ろ側の拡大 3D 画像を示している。白四角内は雌性前核を示す。Scale bar = 20 μ m。 (D) Cycloheximide (0.4 mM、1.0 mM) あるいはコントロールとして EtOH で受精 10 分前から処理した卵を受精後 45、60 分でアルコール固定を行い、 α Tubulin 抗体で微小管 (緑) を、DAPI で染色体 (青) を染色した。図は染色した試料の共焦点顕微鏡画像 (3D 画像:Side view) を示している。矢尻および左下の数値はそれぞれ CAMP、CAMP 形成を示した卵の数を示す。Scale bar = 50 μ m。 [from Goto et al., 2019]

これまでの結果から CAMP と細胞周期の進行が密接に関係していることが示唆されている。そこで、CAMP 形成と細胞周期調節因子である CDK との関係解析した。MPF 活性は前述のように減数分裂中では二回のピーク、および体細胞分裂期へと移行する際に再びピークを示す (Russo et al., 1996, 2009)。そこで、CDK 阻害剤である Roscovitine を用いてそれぞれの活性ピークを阻害し、CAMP 形成が見られる受精後 45 分で固定したサンプル P06 から P10 を作成した (Fig. 4-9A)。P06 はコントロールのサンプルで、P07 は受精 10 分前から 45 分まで処理したサンプルである。P08 は、二回目のピークが見られる受精後 10 分から 45

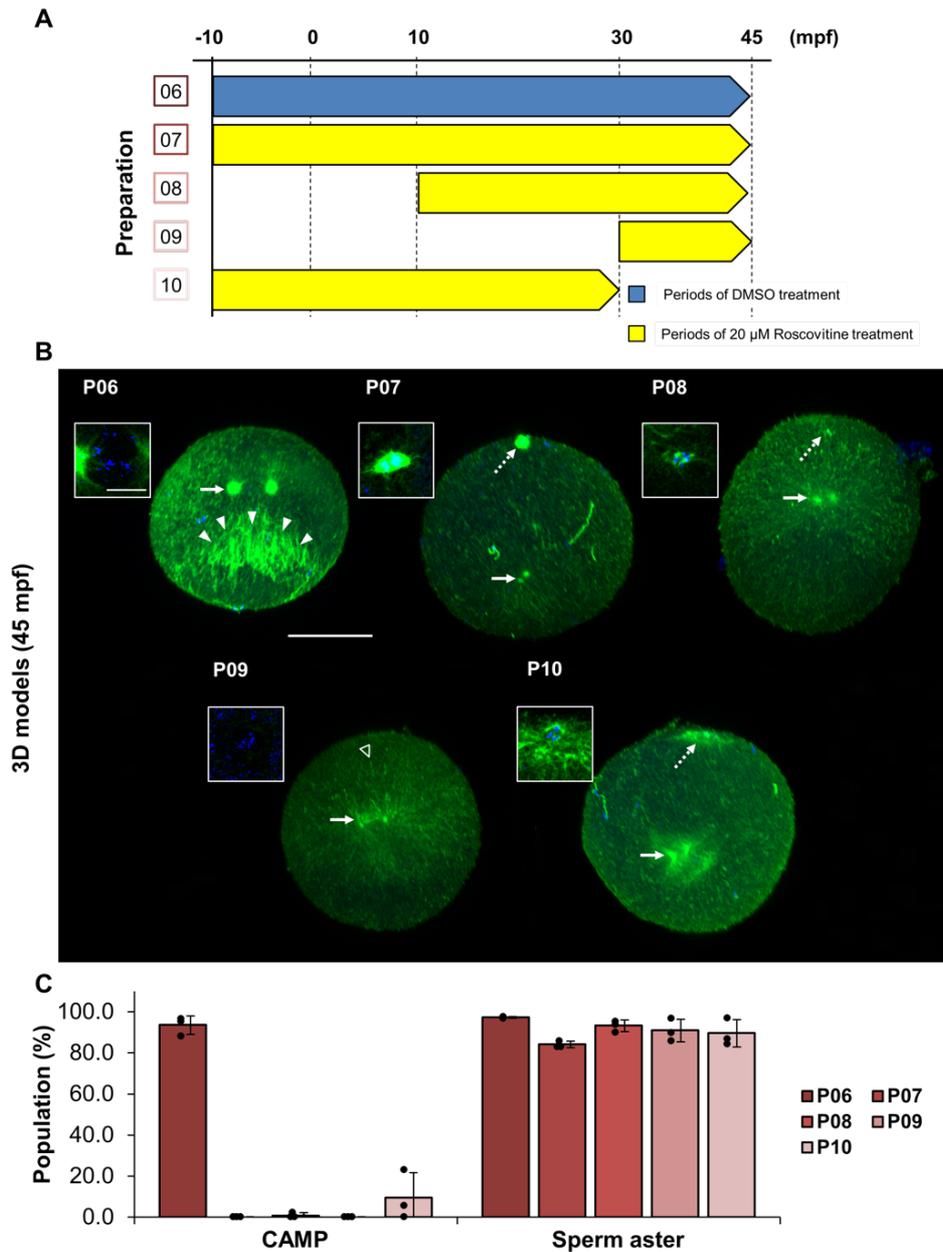


Figure 4-9. Roscovitine 処理による微小管構造の影響

(A) Roscovitine の処理を行うサンプル (P06 から P10)の説明図を示した。青ブロックと黄色ブロックはそれぞれコントロールとして用いた DMSO および Roscovitine の処理時間を示す。

(B) 各サンプルを受精後 45 分でアルコール固定を行い、抗 α Tubulin 抗体で微小管(緑)と DAPI で染色体(青)を染色した。図は染色した試料の共焦点顕微鏡画像(3D 画像:Posterior view)を示している。白四角内には雌性前核および減数分裂装置の拡大図を示した。点矢印および、矢印、矢尻、中抜け矢尻はそれぞれ減数分裂装置、精子星状体、CAMP、前核を示す。Scale bar = 10 (白四角)、50 μ m。

(C) 受精後 45 分における各サンプルの CAMP および精子星状体の形成率を算出した。形成率は独立した三回の実験において 90 個以上の卵を計測することで求めた。Dot plot と Bar graph はそれぞれ各実験における形成率とその平均値を示している。Error bars は SD を表す (n = 3)。[from Goto et al., 2019]

分まで処理したサンプルである。P09 と P10 は、それぞれ体細胞分裂期におけるピークの間（受精後 30 分から 45 分）と減数分裂期におけるピークの間（受精前 10 分から受精後 30 分）に処理したサンプルである。これらのサンプルではコントロールを除く P07 から P10 のサンプル全てで CAMP の形成が阻害された（Fig. 4-9B, C）。したがって、細胞周期調節因子が CAMP 形成に寄与していることが示唆される。

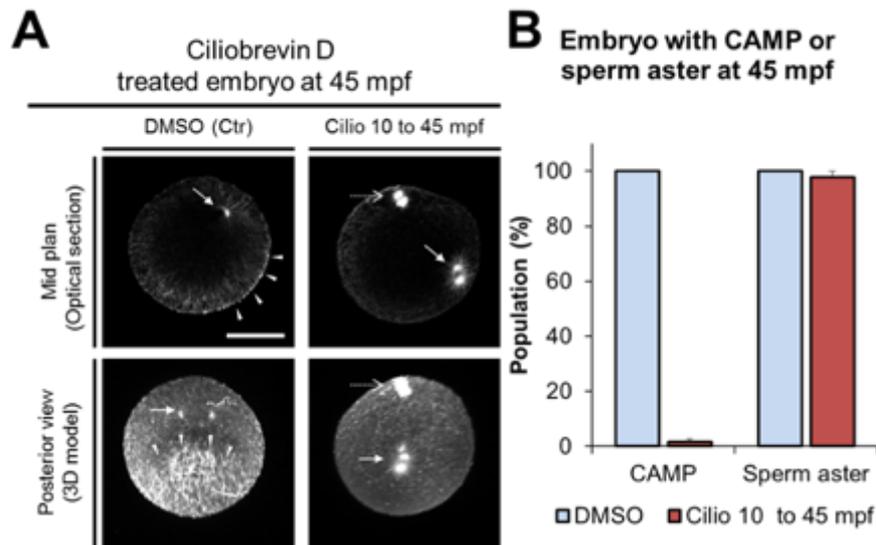


Figure 4-10. Ciliobrevin D による微小管構造の挙動

(A)受精後 10 分から 45 分まで Ciliobrevin D (30 μ M)で処理した。また、コントロールとして DMSO で同様の処理を行った。これらのサンプルを受精後 45 分でアルコール固定を行い、抗 α Tubulin 抗体で微小管を染色した。図は染色した試料の共焦点顕微鏡画像（上段:正中断面、下段:Posterior view）を示している。点矢印および、矢印、矢尻はそれぞれ減数分裂装置、精子星状体、CAMP を示す。Scale bar=50 μ m。(B) A の処理における受精後 45 分の CAMP および精子星状体の形成率を算出した。形成率は独立した三回の実験において 100 個以上の卵を計測することで求めた。Bar graph は各実験における形成率の平均値を示している。Error bars は SD を表す (n=3)。

最後に、CAMP 形成に直接的に関わることが予測される微小管関連分子に関して解析を行った。序章で述べたように *Xenopus* 卵でも CAMP と類似した表層微小管構造が確認されており (Elinson and Rowning, 1988)、さらにプラス端タンパク質やモータータンパク質がその構造形成に寄与することが明らかにされている (Marrari et al., 2000, 2004; Olson et al., 2015)。そこで、CAMP においてもプラス端タンパク質やモータータンパク質が形成制御に関与しているかを明らかにするために、マイナス端依存的なモータータンパク質である dynein に着目し解析を行った。dynein の阻害剤である Ciliobrevin D を受精後 10 分から 45 分まで処理した卵において CAMP の挙動を解析した。その結果、Ciliobrevin D の処理により精子星状体は形成されるが、精子星状体の移動や CAMP の形成は阻害

された (Fig. 4-10A, B)。したがって、CAMP の形成には dynein が必要であることが示された。

4-4. 考察

第3章では、ホヤ卵1細胞期で3つの新規微小管構造 (DEM、TAF、CAMP) を発見しており、特にCAMPに関してはmyoplasmの移動に寄与することから体軸形成に非常に重要な構造であることも明らかにしている。本章では、短期間で変化を示す新規微小管構造の挙動を解析するために、これまでの基準である媒精からの時間mpfの代わりに細胞周期の進行を指標に標準化することが可能であるか解析を行った。その結果、新規微小管構造の挙動と細胞周期の進行とが非常に良く相関していることが明らかとなった。つまり、細胞周期の進行を基準に正確な新規微小管構造の挙動を解析することが可能であることを示したと同時に、新規微小管構造は細胞周期の進行に伴ったなんらかの制御を受けている可能性を提示した。

ホヤの未受精卵では均一な微小管のメッシュワーク構造DEMが形成されており、受精後に消失することが明らかにされている。本研究では、DEMはTelo Iまでに崩壊していることが確認され、また、賦活化実験からこの崩壊がCa²⁺シグナルの活性化にともない誘導されることが示唆された。*Xenopus* の未受精卵においても卵全体に微小管の染色が見られ、受精後に消失することが報告されている (Houliston and Elinson, 1991)。さらに、Ca²⁺シグナルの活性化に伴い微小管関連タンパク質がリン酸化されることで微小管が不安定化することが報告されている (Correas et al., 1992; O'Brien et al., 1997; Callender and Newton, 2017)。一方で、未受精卵の抽出液を用いた*in vitro*実験では、微小管が急速なturnoverを示すことが報告されている (Houliston and Elinson, 1992)。当研究室では、ホヤの未受精卵において微小管安定化剤であるTaxolを添加することにより、DEMが星状体様構造へと変化することを明らかにしている (未発表・私信)。したがって、ホヤ卵におけるDEMはturnoverの早い柔軟な微小管構造であり、Ca²⁺オシレーション series 1によるCa²⁺シグナルが引き金となり崩壊が誘導されていると考えられる。

TAF は、植物極表層に形成される微小管フラグメントの集積である。本研究により、TAF は Pro II から Prometa II において一過的に形成される非常に turnover の早い構造であることが明らかとなった。また、TAF の消失する Meta II 以降より植物半球に存在する精子星状体が急速に発達を開始させることから、第二減数分裂期における植物半球では微小管ダイナミクスが活発であり、TAF が微小管構造の供給源として形成されていることが期待される。また、TAF はアクチン繊維による Cortical contraction 依存的に形成されていることが示された。しか

し、Cortical contraction は受精から約 5 分で見られる現象であり (Roegiers et al., 1995)、この Contraction が直接制御しているとは考えにくい。したがって、cER や myoplasm と同様に contraction により植物極に集められた何らかの因子により形成されている可能性が考えられる。また、アクチン繊維と微小管が細胞骨格間の相互作用を示すことが報告されており (Waterman-Storer et al., 2000; Nagae et al., 2013)、第一細胞質再配置後もアクチン繊維が滞留することで、微小管に直接相互作用することにより TAF が形成されることも推察される。

前述のように、CAMP は Pronuclear stage から体細胞分裂期 (PNm から Meta1) に形成されるレーン様の表層微小管構造である。そこで本研究では、減数分裂期にみられるシグナル分子の活性変化が CAMP 形成に関与しているかを明らかにするために、まず Ca^{2+} シグナルに着目し解析を行った。CaI を用いた賦活化実験により解析を行った結果、CaI で 1 時間処理することにより CAMP 様の微小管構造が形成されることが示された。また、どの様々な処理時間での実験や Heparin による阻害実験から、 Ca^{2+} オシレーション series 2 が CAMP 形成に重要であることが示唆された。したがって、 Ca^{2+} オシレーション series 2 によって Ca^{2+} シグナルが活性化されることが CAMP 形成に重要であることが示唆される。 Ca^{2+} オシレーション series 2 がみられる時期では、MAPK 活性の低下や MPF 活性の 2 回目のピークが見られる (Russo et al., 1996, 2009)。つまり、CAMP 形成には Ca^{2+} シグナルやその下流で制御される細胞周期調節因子の活性が変化することにより、形成が制御されている可能性がある。

ホヤの卵では、未受精卵から第二減数分裂開始時まで MAPK 活性が高い状態が維持されており、第二減数分裂期に移行すると活性が抑制される。この MAPK 活性の変化が CAMP 形成に寄与するかを解析するために、MAPK 活性の阻害剤である U0126 を用いた実験を実施した結果、CAMP の形成や精子生状体の発達、減数分裂の終了など pronuclear stage に見られる現象がコントロールに比べ顕著に早まることが観察された。さらに、これらの現象がタンパク質の合成阻害剤である Cycloheximide の添加により逆に遅延することが観察された。MAPK 活性の低下は減数分裂が終了し、Pronuclear stage へと移行するために必須であることが報告されている (Dumollard et al., 2011)。また、タンパク質の合成阻害剤である Emetine を受精卵に添加した実験では翻訳抑制を介して MAPK 活性抑制が阻害されることが報告されている (Marino et al., 2000; Russo et al., 2009)。従って、U0126 の処理により本来より早い時期に MAPK 活性が抑制されたため、pronuclear stage への移行が早まったと推測される。一方で、Cycloheximide の処理では、MAPK 活性の抑制が阻害されたため Pronuclear stage への移行が遅延したことが考えられる。また、Cycloheximide による阻害効果は濃度依存性を示しており、高濃度処理により翻訳への影響が増大することで、MAPK 活性の抑制

を阻害する複数のタンパク質の合成が阻害されたと考えられる。したがって、MAPK 活性の抑制を担う多数の分子が活性化されることにより、Pronuclear stage への移行が制御されていると考えられる。以上より、本研究で見られた現象は MAPK 活性の人為的な制御にともなう Pronuclear stage への移行時間の変化であることが示唆される。

CAMP や精子星状体の形成が薬剤処理による Pronuclear stage への移行時間の変動に追従していることが観察されている。したがって、これらの構造の形成が MAPK 活性により負に制御、あるいは Pronuclear stage において活性が変動する分子により制御されている可能性が示唆される。Pronuclear stage において活性が上昇する分子として CDK1/CyclinA や Myt1、Wee1、PIK1 などが報告されている (Kishimoto, 2018)。一方で、逆に Pronuclear stage に活性が低下する分子として cdc25、Great wall kinase、Aurora kinase などが報告されている (Kishimoto, 2018)。また、MAPK の活性化により Cyclin A、B の合成や Myt1 が抑制されていることが知られている (Okano-Uchida et al., 2003; Costache et al., 2014; Kishimoto, 2018)。ホヤの受精卵では、Pronuclear stage において Cyclin A の上昇が見られており、また U0126 で処理した未受精卵においても Cyclin A が上昇することも報告されている (Dumollard et al., 2011)。従って、以上のような分子が Pronuclear stage へ移行あるいは MAPK 活性の低下により活性が変動することで CAMP 形成が制御されていることが示唆される。

最後に細胞周期調節因子である CDK と CAMP 形成の関連を解析するために、CDK 阻害剤である Roscovitine を用いて実験を行った。減数分裂中の Roscovitine 処理により CAMP の形成が阻害された。また、MPF 活性の低い Pronuclear stage における Roscovitine の添加においても CAMP の形成阻害が確認された。Roscovitine は CDK1、CDK2、CDK 5 に対して活性阻害効果を示す (Meijer et al., 1997)。つまり、MPF ではなく間期に活性が上昇する CDK1/CyclinA、CDK2/CyclinA、CDK2/CyclinE (Longo et al., 2008) が CAMP の形成に重要であることが示唆される。しかしながら、*Xenopus* では MPF の活性が維持されることで表層微小管構造の消失が遅延することが報告されている (Schroeder and Gard, 1992)。このことは、MPF の活性が CAMP の形成を負に制御していることを示唆している。また、減数分裂期における Roscovitine の処理においても CAMP の形成が阻害された。ホヤ卵の減数分裂期において、MPF 活性を阻害することにより Ca^{2+} オシレーション series 2 が阻害されることが報告されている (Levasseur et al., 2007)。本研究では Ca^{2+} オシレーション series 2 が CAMP 形成に重要であることを示している。したがって、CAMP 形成に対する Roscovitine の減数分裂期における阻害効果は、MPF 活性の抑制を介した Ca^{2+} オシレーション series 2 の阻害によるものであると考えられる。以上より CAMP の形成には、

卵の賦活化に寄与するシグナル分子が次に記す3つの状態：1) Ca^{2+} オシレーション series 2 による Ca^{2+} シグナルの活性化、2) MAPK 活性の低下、3) Pronuclear stage における間期 CDK の活性化、を作り上げることが重要である (Fig. 4-11)。また、間期 CDK の活性制御分子である Cyclin A は、CAMP 形成制御に関わる有力な候補分子の1つとして期待される。

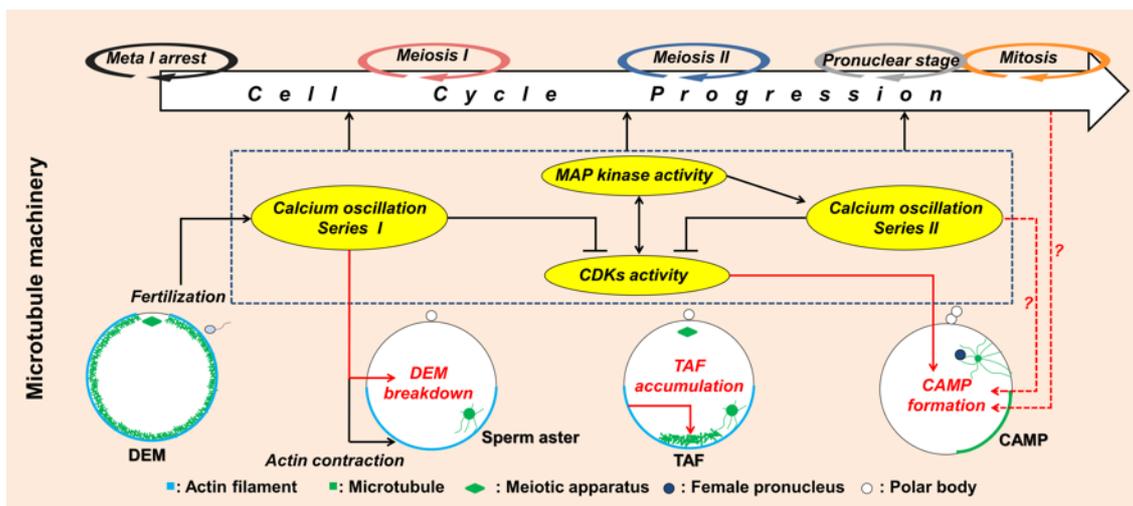


Figure 4-11. ホヤ卵 1 細胞期における新規微小管構造の制御メカニズム

卵の賦活化に寄与するシグナル分子による新規微小管構造のモデル図を示した。黒矢尻は既知の制御メカニズムを赤矢印は本研究で明らかになった制御メカニズムを示す。 Ca^{2+} シグナルおよび MAPK 活性、CDK 活性は、減数分裂の進行や卵表層の変化を制御する。これらは同時に新規微小管構造である deeply extended MT meshwork (DEM)、transiently accumulated MT fragments (TAF)、and cortical MT array in the posterior vegetal cortex (CAMP)を制御していることを示唆している。[from Goto et al., 2019]

本研究では CAMP の形成制御メカニズムを明らかにするために、より直接的に関与する分子の解析も行った。その結果 minus-end directed motor protein である Dynein が CAMP の形成制御に関与していることが示された。Dynein は *Xenopus* における表層微小管構造の形成に寄与していることが報告されている分子である (Marrari et al., 2004)。 *Xenopus* の表層微小管構造形成には他にも、 plus-end directed motor protein である Kinesin Related Proteins (KRPs) や End binding protein 3 (EB3) を含む微小管のプラス端タンパク質が重要であることが報告されている (Marrari et al., 2000; Cuykendall and Houston, 2009; Olson et al., 2015)。したがって、Dynein と同様にこれらの分子が CAMP の形成に寄与している可能性がある。

ホヤの未受精卵は中心体を待たず、受精により精子から持ち込まれることで初めて中心体に依存的な微小管構造が形成される。そのため、未受精卵で形成する DEM や減数分裂装置は中心体非依存的な微小管構造である。さらに本章では、CaI を用いた実験により、TAF および CAMP が精子の関与なしに形成されることが示されたことから、本研究で発見した微小管構造は中心体非依存的な微小

管構造である。近年、このような中心体非依存的な微小管構造が、神経細胞の軸索伸長 (King et al., 2014) や上皮細胞の細胞極性維持 (Noordstra et al., 2016) など様々な機能を有することに関心が集まっている (Baines et al., 2009)。微小管は多くの細胞において非常に保存性の高い分子である。本研究で明らかにした卵の賦活化に寄与するシグナル分子による新規微小管構造の制御メカニズムの理解は、他の細胞における微小管の制御メカニズム解明に寄与することが期待される。

第 5 章 細胞質再配置における myoplasm を構成する要素および微

小管構造の相関解析

5-1. 序論

本研究ではこれまでに、1 細胞期において微小管の新規構造の存在ならびに、その形成メカニズムを明らかにしてきた (Ishii et al., 2017; Goto et al., 2019)。特に、表層の微小管構造 CAMP は myoplasm の移動に寄与することから体軸形成に非常に重要な構造であるが、CAMP がどのようにして myoplasm の移動に寄与しているのかについては不明なままであった。また、myoplasm を構成するミトコンドリアや ER、母性 mRNA や細胞質再配置に関連する細胞骨格など、あるいはそれらの相互作用に関する時空間的な報告が乏しいため、細胞質再配置の俯瞰的なメカニズムは理解されているものの分子メカニズムは不明な点が多く残っている。

細胞質再配置による cER の後極への移動や割球への分配、CAB 形成などの解析は、ER を染色することができる脂溶性カルボシアニン色素を卵に顕微注入し、myoplasm に存在する cER の動態を time lapse 撮影により観察することが主流であった (Speksnijder et al., 1993; Prodon et al., 2005)。しかしながら、この手法では他の分子と共に可視化することが困難であるため、分子間の位置関係を解析することが困難である。一方で、postplasmic/PEM RNA の可視化においては、RNA probe を用いた *in situ* hybridization 法が広く用いられており、これまでに初期発生における様々な母性 mRNA の分布が示されている (Yamada, 2006)。しかしこれも、*in situ* hybridization にはタンパク質を変性させる工程が複数含まれるため、cER と同様に同一試料で他の分子と共に観察することが難しい場合が多かった。そこで考案されたのが、単離表層を用いた同時染色法である。この手法は、卵表層のごく一部分をガラスに固着させる手法であり、染色時にタンパク質を変性させる工程を省略することが可能である (Sardet et al., 1992; Prodon et al., 2005)。この手法により、mRNA と ER の同時染色が達成され、Type I postplasmic/PEM RNA と cER が共局在していることが明らかとなった (Prodon et al., 2005)。しかし、単離表層は卵のごく一部の領域であり、その厚みも 1 μm 未満である (Prodon et al., 2005)。したがって、観察領域が非常に限定的であり、空間情報に乏しいのが問題点として挙げられる。以上のように、細胞質再配置に関連する要素を単一で可視化することは可能であるが、複数を対象に同時に可視化し、高精細でかつ三次元的に可視化することに至っていなかった。そこで、本研究では可視化技術

の改良を経て、高精細でかつ三次元的な解析を駆使することで、CAMP を含め細胞質再配置に関わる要素の時空間的な相関を明らかにし、細胞質再配置の分子メカニズム解明を目指した。

5-2. 実験操作

5-2-1. 実験動物

ホヤ成体 (*Ciona intestinalis*) は、National Bio-Resource Project より提供されたものを使用した。ホヤ成体から採卵後、コリオンを除去 (Ishii et al., 2012, 2014) し、フィルター濾過を行った 18°C の海水中で発生させた。この条件下で発生した胚は、受精後 30 mpf で第 2 細胞質再配置、60 mpf で第一卵割を開始する。受精には、別個体から採精した精子を 1N NaOH で pH を約 11 にすることで活性化させ、海水中で受精させた。

5-2-2. 顕微注入法

顕微注入に用いたマイクロガラスピペットおよびマイクロガラスピペットに試料を充填するガラスピペットはガラス管 (Microcaps, Drummond Sci., USA) をから作製した。マイクロガラスピペットは微小ガラス針作製装置 (Sutter Instrument, Novato, USA) を用いて作製した。作製したガラスピペットおよびマイクロガラスピペット作製に用いたガラス管は乾熱滅菌後使用した。試料である 1.1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3' - tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiIC₁₈(3): Molecular probes, USA) は大豆油 (Ajinomoto, Japan) に飽和濃度で溶解させた。調整試料をマイクロガラスピペットに充填後、実体顕微鏡 (Stemi 2000-c, Carl Zeiss, Germany) に固定したマイクロマニピュレーター (Model MN-151, Narishige, Japan) に装着した。コリオンを除去した未受精卵を 1.5% Agar gel 上に整列させ、卵の 1/5 程度の直径で ER を可視化できる DiIC₁₈(3) (Speksnijder et al., 1993) が卵内に注入されるよう圧力により顕微注入した。。

5-2-3. 小胞体およびミトコンドリアの同時染色

目的のステージまで発生させた卵および胚を、Prodon ら (2009) が報告した固定液を参考に改良した固定液 Fix Solution 1 (3.2% formaldehyde [Polysciences Inc., Warrington, Pennsylvania], 100 mM HEPES [pH = 7.0], 50 mM EGTA, 10 mM MgSO₄, 525 mM sucrose) を用いて固定した (Prodon et al., 2009)。固定は常温で

1時間行い、その後100% EtOHに置換し、使用まで-20°Cで保存した。固定標本をEtOH下降系列(100%、70%、35%)により再水和した後、PBSTで洗浄しG1T0処理を行った。G1T0処理を行った標本に対し、6 M 尿素を含む0.1 M Tris-HCl (pH=9.5)を加え、80°Cで30分間抗原賦活化処理を行った。Hayashiらの報告(2011)では、この抗原賦活化処理によりERに存在するシャペロン分子の抗体認識が向上することが示されている(Hayashi et al., 2011)。抗原賦活化処理後PBSTで洗浄し、一次抗体としてanti-NN18 mouse monoclonal antibody (Sigma-Aldrich; 1:100)、およびanti-Bip rabbit polyclonal antibody (StressMarq Biosciences, Canada; 1:100)を添加した。anti-NN18 antibodyはカタユウレイボヤにおいてミトコンドリア内のF1-ATP synthase alpha-subunit (Chenevert et al., 2013)、一方でanti-Bip antibodyはERに存在するシャペロン分子Bipを認識する(Terasaki and Reese, 1992)。二次抗体としてAlexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1:1000)、Alexa Fluor Plus 555-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:1000)を用いて蛍光標識を行った。また、5 µg/ml DAPIにより染色体を蛍光標識した。

5-2-4. 小胞体および微小管の同時染色

目的のステージまで発生させた卵を、-20°Cで冷却した固定液 Fix Solution 2 (70% MeOH、3.2% methanol free formaldehyde)を用いて固定した。固定は-20°Cで1時間行い、その後室温でさらに1時間行った後に、100% EtOHに置換し、使用まで-20°Cで保存した。固定標本をEtOH下降系列(100%、70%、35%)により再水和した後、PBSTで洗浄しG1T0処理を行った。G1T0処理を行った標本に対し6 M 尿素を含む0.1 M Tris-HCl (pH=9.5)を加え80°Cで30分間抗原賦活化処理を行った。抗原賦活化処理後PBSTで洗浄し、一次抗体としてanti- α -tubulin mouse monoclonal antibody (1:100)およびanti-Bip rabbit polyclonal antibody (1:100)を添加した。二次抗体としてAlexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1:1000)、Alexa Fluor Plus 555-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:1000)を用いて蛍光標識を行った。また、5 µg/ml DAPIにより染色体を蛍光標識した。

5-2-5. Whole-mount Fluorescence *in situ* hybridization

目的のステージまで発生させた卵を0.5 M NaClおよび0.1 M 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (Mops; pH=7.5)に4.0%となるように溶解したparaformaldehydeを用いて固定した。固定は室温で1時間行った後に100% EtOHに置換し、使用まで-20°Cで保存した。固定標本をEtOH下降系列(100%、70%、

35%) により再水和した後に PBST 洗浄し、5 µg/ml Proteinase K で 15 分間、37°C で処理した。2 mg/ml グリシン溶液で Proteinase K 反応を止め、4.0% paraformaldehyde で 1 時間、後固定を行なった。PBST で洗浄後、0.1 M 2,2',2'' Nitrilotriethanol および 0.27% 無水酢酸を含む混合溶液を用いて室温で 10 分間アセチル化処理を行った。その後、Pre-hybridization 溶液 (5xSSC、50% formamide、50 µg/ml heparin、100 µg/ml yeast tRNA、1.0% Tween20) を用いて 50°C、1 時間 Pre-hybridization を行った後、Pre-hybridization 溶液に 0.5 µg/ml アンチセンス RNA probe (Ci-macho-1 および Ci-pem-1、Ci-vasa) を加え、50°C で 16 時間 hybridization を行った。Hybridization を行った標本を、5xSSC および 2xSSC wash buffer (5x または 2xSSC、50% formamide、1.0% Tween20) で洗浄した後、遊離のプローブを除去するため 37°C で 20 分間 20 µg/ml の RNase A 処理をした。その後、2xSSCT および 0.2xSSCT (2xSSC または 0.2xSSC、0.1% Tween20) で洗浄し、peroxidase conjugated anti-DIG fab fragment (Boehringer Ingelheim, Germany, 1:100) を用いてプローブの DIG に対して HRP 標識を行なった。その後 Cy5-Tyramide (Akoya Bioscience) で室温 30 分間処理することにより mRNA を蛍光標識した。その後、5 µg/ml DAPI により染色体を蛍光標識した。

5-2-6. 免疫蛍光染色と Fluorescence *in situ* hybridization の同時染色

目的のステージまで発生させた卵を、-20°C で冷却した固定液 Fix Solution 2 (70% MeOH、3.2% methanol free formaldehyde) を用いて固定した。固定は -20°C で 1 時間行い、その後室温でさらに 1 時間行った後に、100% EtOH に置換し、使用まで -20°C で保存した。固定標本を EtOH 下降系列 (100%、70%、35%) により再水和した後、PBST で洗浄し G1T0 処理を行った。その後、Pre-hybridization 溶液と抗原賦活化液の混合液 (3.78 M Urea、0.063 M Tris-HCl [pH=9.5]、50 µg/ml heparin、100 µg/ml yeast tRNA、1.0% Tween20) 中で 80°C、30 分間抗原賦活化処理を行った。その後、Pre-hybridization 溶液にアンチセンス RNA probe を加え、50°C で 16 時間 hybridization を行った。Hybridization を行った標本を、5xSSC および 2xSSC wash buffer (5x または 2xSSC、50% formamide、1.0% Tween20) で洗浄した後、遊離のプローブを除去するため 37°C で 20 分間 20 µg/ml の RNase A 処理をした。その後、2xSSCT および 0.2xSSCT (2xSSC または 0.2xSSC、0.1% Tween20) で洗浄し、peroxidase conjugated anti-DIG fab fragment (1:100) および anti-NN18 mouse monoclonal antibody (1:100)、anti-Bip rabbit polyclonal antibody (StressMarq Biosciences, Canada; 1:100) を添加することで、プローブの HRP 標識と一次抗体染色を行なった。二次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1:1000)、Alexa Fluor Plus 555-conjugated goat anti-rabbit

IgG antibody (1:1000) を用いて蛍光標識を行った。その後 Cy5-Tyramide (Akoya Bioscience) で室温 30 分間処理することにより mRNA を蛍光標識した。その後、5 µg/ml DAPI により染色体を蛍光標識した。

5-2-7. 単離表層における免疫蛍光染色と *Fluorescence in situ hybridization* の同時染色

ホヤ卵から、Sardet ら (1992, 2011) の手法に従って単離表層を作製した (Sardet et al., 1992, 2011)。目的のステージまで発生させた卵を海水から Calcium free 人工海水 (0.46 M NaCl, 9.4 mM KCl, 0.1 M MgSO₄, 5.9 mM NaHCO₃, 0.2 mM EDTA) に移し、その後、人工海水と共に卵を 20 µg/ml poly-L-Lysine でコートされた 18x18 mm のカバーガラス上に載せた。この際、液量はカバーガラス上に載る液滴の限界量を載せている。2 分間静置後に、卵が潰れない様に半分量の人工海水をガラスピペットで回収し、等量の Buffer X (350 mM K-aspartate, 130 mM taurine, 170 mM betaine, 50 mM glycine, 19 mM MgCl₂, 0.01M Hepes [pH=7.0]) を液滴に加えて混合した。再び液滴を 3 分の 2 量回収し、Buffer X を加えることで液滴内の卵を人工海水から Buffer X へと素早く置換した。Buffer X の液滴から 3 分の 2 量回収し、ガラスピペットを用いて Buffer X の穏やかな水流を、カバーガラス上で起こすことにより卵を破碎した。カバーガラス上に浮遊した卵のデブリと余分な Buffer X を回収し、-20°C で冷却した固定液 Fix solution 2 もしくは 3.7% formaldehyde と 0.1% glutaraldehyde を CIM buffer (800 mM glucose, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 0.01 M Mops [pH=7.0]) に混合した固定液をカバーガラスに載せることにより、双方の固定液において室温で 30 分間、単離表層を固定した。

Fix solution 2 で固定した単離表層は、5-2-6 と同様の操作により、mRNA の蛍光標識と免疫染色を行なった。なおこの際、一次抗体として anti- α -tubulin mouse monoclonal antibody (1:100)、および anti-Bip rabbit polyclonal antibody (1:100)、anti-ATP5B chicken antisera (Sigma-Aldrich; 1:100 dilution) を、二次抗体は Alexa Fluor 405-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1:200)、Alexa Fluor Plus 555-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:1000)、Alexa Fluor 633-conjugated goat anti-chicken IgG antibody (1:1000) を使用した。その後 FITC-Tyramide (Akoya Bioscience) で室温 30 分間処理することにより mRNA を蛍光標識した。一方で、3.7% formaldehyde および 0.1% glutaraldehyde の混合液で固定した単離表層では、PBS で洗浄後、5-2-5 と同様の手法により mRNA を蛍光標識した。この際、実験プロトコルおよび試薬から界面活性剤およびプロテアーゼ処理を除いて実験した。その後、前述と同様の抗体セットにより免疫染色を実施した。

5-2-8. Focus ion beam-scanning electron microscopy (FIB-SEM)観察

目的のステージまで発生させた卵および胚を Fix Solution 1 に 2.5% glutaraldehyde を混合した固定液を用いて固定した。固定は室温で1時間行った後に 100% EtOH に置換し、使用まで-20°Cで保存した。固定標本を EtOH 下降系列 (100%、70%、35%) により再水和した後、PBST で洗浄し、2.0% osmium tetroxide (Nisshin-EM, Japan) および 1.5% potassium ferrocyanide を人工海水 (420 mM NaCl, 9 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 24.5 mM MgSO₄, 2.15 mM NaHCO₃, 60 mM HEPES [pH = 8.0]) 内で調整した後固定液を用いて 4°C で1時間後固定した。後固定を行なった標本を、1% thiocarbohydrazide (Tokyo Chemical Industry, Japan) で 20 分間、室温で処理し、2.0% osmium tetroxide を含む人工海水で再び室温で 30 分間後固定を行なった。人工海水で洗浄後、3% Ti-blue (Nisshin-EM) で 4°C、16 時間染色を行うことで、ブロック染色を行なった。ブロック染色を行なった標本を 0.03 M aspartic acid の 0.02 M lead nitrate 混合液で 30 分間、60°C で処理することにより鉛染色を行なった。その後 EtOH 上昇系列 (50, 60, 70, 80, 90, 99.5, 99.9%) により脱水後、脱水アセトンで処理し、完全に脱水を行なった。脱水した標本をエポキシ樹脂 (CLEARPOXY Resin, Sankei Co., Ltd, Japan) に包埋し、FIB-SEM (NX5000; Hitachi, Tokyo, Japan) にて観察を行なった。

FIB-SEM 観察では、15000 倍の倍率で 50 nm ピッチの連続撮像を行い計 100 枚のスタック画像を取得した。取得した画像の内 10 枚を用いて、ER およびミトコンドリアを手動で領域抽出した。それらを、教師画像として深層学習モデル (U-Net; Ronneberger et al., 2015) に入力し、モデルの学習を行なった。学習モデルは、Python 3 系を用いたコードにより作成し、TensorFlow 2.0 バックエンドの基で実行した。学習したモデルに FIB-SEM 観察より得た全てのスタック像を入力することでミトコンドリアと ER の領域を推論させ、自動抽出した。その後、ER が自動抽出されたスタック画像から、Image J Fiji (Schindelin et al., 2012) の Plugin Volume viewer を用いて三次元モデルを作成した。

5-2-9. 共焦点顕微鏡観察および画像解析

種々の染色を行った全載標本は EtOH 上昇系列 (35%、70%、100%) により脱水後、サリチル酸メチル (Nacalai Tesque, Japan) で透明化処理を行い、ホールスライドガラスにマウントした。試料の観察は共焦点顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss, Germany) または A1RHD25 (Nikon, Japan) を用いて行った。取得した画像は、それぞれのイメージングソフトウェア ZEN Black edition (Carl Zeiss) および NIS

element imaging software (Nikon)を用いて取得した。Image J Fiji を用いて取得したデータから、光学切片および立体再構成した 3D 画像をそれぞれ作成した。光学切片は正中断面 (画像の上側が動物極、右側が後極) で作製し、一方 3D 画像は Side view (正中断面の立体再構成)および Posterior view (Side view を後極側からの視点に回転)で作製した。画像解析の詳細はそれぞれの図中の説明に記した。単離表層は、80% Glycerol を用いて封入し、観察を行なった。DiIC₁₈ を顕微注入した卵は、受精後 18°C で発生させ 30 分後に Time lapse 撮影を行うため、海水で満たしたガラスボトムディッシュに移した。撮影情報の詳細は図中の説明に記した。

5-3. 実験結果

5-3-1. 細胞期における ER およびミトコンドリアの時空間的解析

本研究ではまず、myoplasm を構成する要素の内 ER の時空間情報に着目して研究を行なった。前述のように、これまでに脂溶性カルボシアニン色素を顕微注入した卵の time lapse 撮像や単離表層を用いた観察から myoplasm の領域には cER が存在し、第 2 細胞質再配置により後極へと移動することが明らかにされ

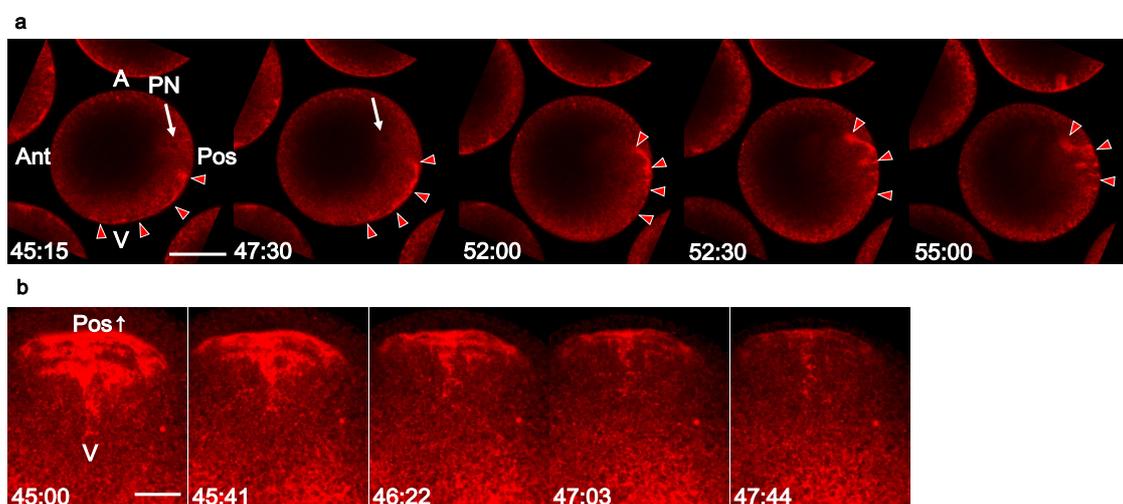


Figure 5-1. 第 2 細胞質再配置における ER の挙動および形態変化

(a) DiIC₁₈ を顕微注入した卵を 45 から 55 mpf で共焦点顕微鏡を用いてタイムラプス撮像を行なった。図は正中断面で示しており、上方が動物極 (A: Animal pole)、下方が植物極 (V: Vegetal pole)、左右が前後軸を示す (Ant: Anterior pole, Pos: Posterior pole)。図中左下の数値は受精からの時間を示す (mm:ss)。(b) DiIC₁₈ を顕微注入した卵の植物極表層を 45 から 47 mpf でタイムラプス撮像を行なった。図は三次元画像であり、下方が植物極 (V: Vegetal pole)、上方は後極方向 (Pos ↑) を示す。Scale bar = 50 μm。[from Goto et al., 2021]

ている。そこで、第2細胞質再配置においてERの移動を再確認するため、卵にカルボシアニン色素 (DiIC18(3)) を顕微注入し、タイムラプス撮像を行なった。ERは細胞質全体に広がる一連のネットワーク構造であるため、バックグラウンド染色は卵細胞質全体を覆っていたが、後極において強く染色されたERドメインが明確に確認された (Fig. 5-1a)。このERドメインは、植物表層に沿って後極へと移動し、後極に移動した後はドメイン先端部や中央部が表層からより細胞質側へと侵入したドメインとして観察された (Fig. 5-1a)。植物極からの観察によりこのERドメインは正中線から左右に広がるひだ状の連続した構造であることが確認された (Fig. 5-1b)。以上の結果は、先行研究により報告されているcERの挙動とよく一致する (Speksnijder et al., 1993; Prodon et al., 2005)。つまり、本研究で観察されたERドメインは、cERに相応するものであると考えられ

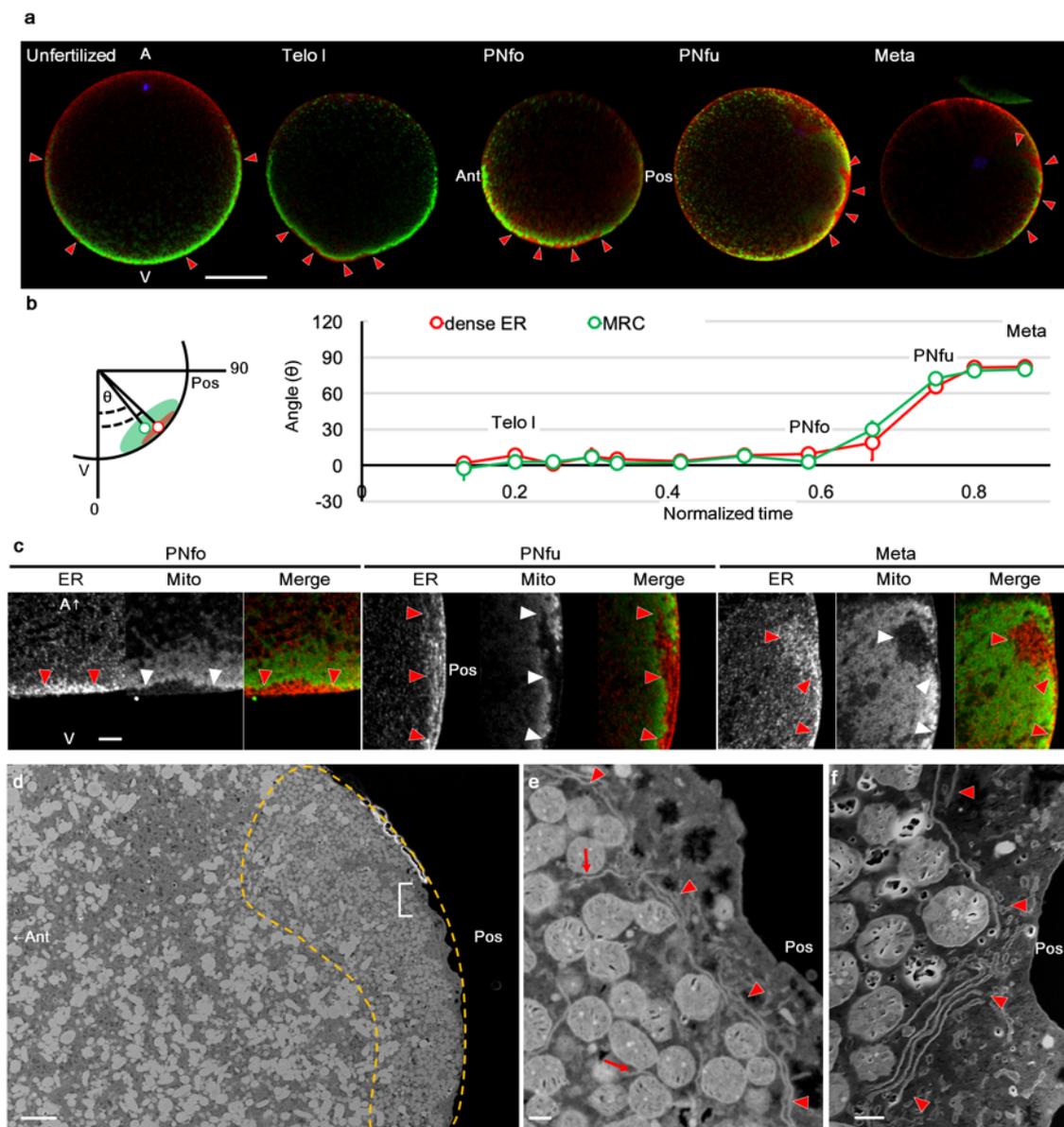


Figure 5-2. 1 細胞期における ER とミトコンドリアの挙動

(a) 未受精卵 (Unfertilized)、Telo、PNfo、PNfu、Meta における全載標本の同時染色像を示した。青および、赤、緑の染色はそれぞれ核、ER、ミトコンドリアを示す。図は正中面における光学切片を示し、未受精卵における上方が動物極 (A: Animal pole)、下方が植物極 (V: Vegetal pole) を表す。PNfo から、精子星状体の位置により、前極 (Ant) -後極 (Pos) が明確となる。赤矢印は dense ER を示す。Scale bar = 50 μm 。(b) 植物極 (V) から後極 (Pos) への dense ER (赤) および MRC (緑) の移動を、図に示すように定量的に測定した。ER および、MRC、CAMP の領域をコントラスト調整と二値化により抽出し、その重心を算出した。正中断面の光学切片において、dense ER または MRC の重心 (それぞれ赤または緑の円) と動物軸との間の角度 (θ) を測定し、折れ線グラフで示した。時間は Normalized time で示し、未受精卵を 0 とした際に、各細胞周期 Meta I、Telo I、Pnfo、Pnfu、Meta はそれぞれ 0.2、0.6、0.75、0.9 に対応する。2 細胞期の開始である Telo を 1 と定義した。Error bars は SD を表す (n=3)。(c) PNfo、PNfu、Meta における dense ER 領域の高倍率画像。ER、ミトコンドリア、およびマージされた画像を別々に示した。dense ER 領域はミトコンドリアが乏しい領域と対応している (白矢印)。Scale bar = 5 μm 。(d) PNfu の後極領域における FIB-SEM 画像。myoplasm (黄色の破線) は MRC および dense ER 領域 (赤色の矢頭) から構成される。Scale bar = 6 μm 。(e, f) dense ER の一部 (e: d の [で示す部分、 d: 別標本) の拡大像を示した。赤矢印は小胞体シートが積層した cisterna 状の構造を示す。一方で、赤矢印は MRC 領域に存在する細胞質側で観察される ER を示す。Scale bar = 0.6 μm 。 [from Goto et al., 2021]

る。しかし、cER がこのように細胞質側まで深く入り込んだ構造であることは新しい発見であり、本研究では、この ER ドメインを dense ER と名付け、その時空間情報の詳細を明らかにすることを目的に解析を進めた。

dense ER の時空間情報の詳細を明らかにするためには、固定処理により作成した全載標本で高精細に観察することが必要となる。しかし、ER を標識するための抗体は ER 内に存在するシャペロン分子を抗原とするため、他のタンパク質と隣接した状態で固定されるため、抗体がアクセスすることが困難であるとされている (Hayashi et al., 2011)。そこで、尿素が主成分の抗原賦活化処理を組み合わせることにより、全載標本における ER を十分な分解能で可視化する免疫染色法を開発した。この手法により、ホヤの 1 細胞期において ER を全載標本で可視化することが可能となった (Fig. 5-2a)。また、ミトコンドリアとの同時染色も可能となった。そこで次に、myoplasm の領域を dense ER と ミトコンドリアに富んだ細胞質 (Mitochondria rich cytoplasm: MRC) に区別し、それらを細胞周期の進行 (4-3-1 参照) に合わせて解析した。未受精卵表層の ER 染色は薄い一方で、第 1 細胞質再配置終了後に植物極で集積した dense ER が明確に観察された (Fig. 5-2a: Unfertilized, Telo I)。この挙動は、Sardet ら (1992) が記載している cER の振る舞いと酷似している (Sardet et al., 1992)。一方、第 2 細胞質再配置では、dense ER は MRC と協調して後極へと移動した (Fig. 5-2a,b; PNfo から Meta)。これらの動きも cER と同様であったが、PNfo 以降、dense ER はより厚みのある構造 (5-10 μm) として観察された。高倍率の画像から、MRC と dense ER の領

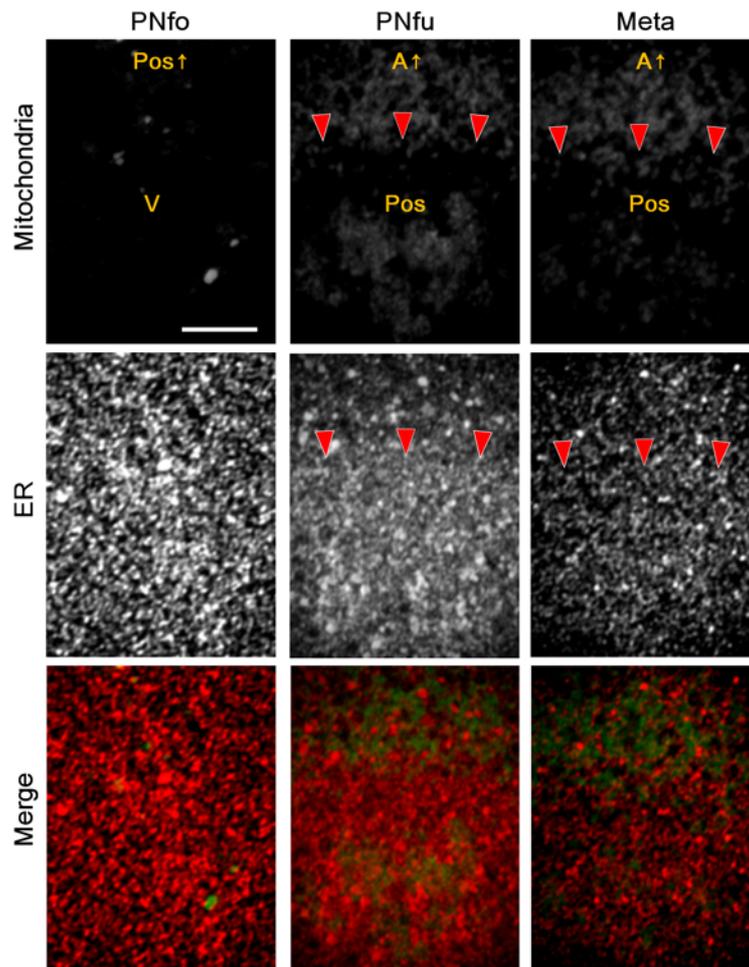


Figure 5-3. 第2細胞質再配置におけるERとミトコンドリアの挙動

PNfo、PNfu、Metaの高倍率画像の光学切片から厚さ約 $4\mu\text{m}$ の3Dモデルを作成した。ER、ミトコンドリア、およびマージされた画像を別々に示している。PNfoでは植物極(V)を中心に、上側を後極方向(Pos ↑)にして示している。PNfuとMetaでは後極(Pos)を中心に、上側を動物極方向(A ↑)にして示している。矢尻は、卵表層から細胞質側に侵入し始めたdense ERの領域を示す。Scale bar= $5\mu\text{m}$ 。[from Goto et al., 2021]

域は明確に境界を持っていることが観察された。後極からの観察像においてもこれらの排他的な局在パターンは明確に観察されている (Fig. 5-3)。一方で、MRC内においてもERの弱いドット状の染色が観察された (Fig. 5-2c)。細胞質内のERは連続的な構造であり、この染色はdense ERから細胞質側に伸びた連続的なERであることが予想される。本研究では、このERをLoosely extended ERと名付けた。このようなdense ER以外のERがこの染色手法において、dense ERに対するバックグラウンドとして観察されていると示唆される。一方で、dense ERは明確な構造として観察され、特にPNfuでのみ一過的にストライプ様の構造を形成していることが観察された (Fig. 5-2c)。そこで、FIB-SEMを用いて、第2細胞質再配置におけるdense ERの超微細構造を観察した。PNfuと予想

される広域画像では、ミトコンドリアと ER からなる myoplasm の領域が明瞭に可視化できた (Fig. 5-2d)。さらに高倍率画像から、この時期の dense ER は平行に積み重なった ER シートから構成される cisterna 状の構造であることが観察された (Fig. 5-2e, f 矢尻)。一方で、Loosely extended ER と考えられる dense ER から伸びた ER も MRC 内に存在していることが確認できた (Fig. 5-2e, f 矢印)。次に、dense ER のさらに詳細な構造を明らかにするために FIB-SEM 像から三次元モデルを作成した。このモデルから、垂直方向の断面においても明確な ER シートの堆積が示されたことから、PNfu における dense ER は cisterna 状の構造であることが強く示唆された (Fig. 5-4)。以上の結果から、myoplasm は MRC と dense ER の排他的な領域から構成され、共に細胞周期の進行と共に後極へと移動し、dense ER は PNfu において一過的に cisterna 状の構造を形成することが示唆された。

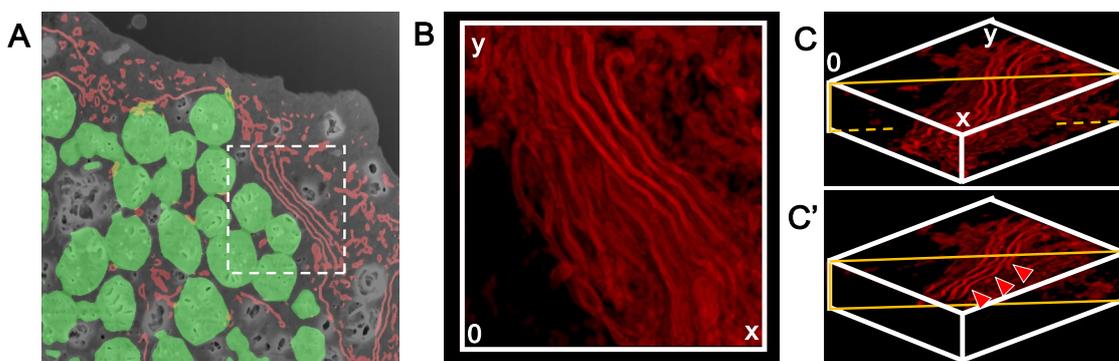


Figure 5-4. FIB-SEM 像における dense ER の三次元モデル

(A) FIB-SEM 像において ER とミトコンドリアの領域抽出し、それぞれ赤と緑で示した。(B) ER のみが領域抽出された FIB-SEM 像を 40 スタック用いて三次元モデルを作成した。画像は X-Y 平面で示している。(C, C') B を XYZ 方向から視認できるように回転し (C)、黄色線部の断面を示した (C')。

5-3-2. 第 2 細胞質再配置における ER と表層微小管構造の時空間的解析

次に、dense ER と微小管構造との時空間的な相関を全載標本により解析した。解析を行う上で ER と微小管との同時染色は必須である。しかし、これまでの研究において卵内の微小管と ER の同時染色が行われた例はほとんどなく、同時染色方法および ER と微小管の関係に関する知見は少ない。その理由として、固定標本の微小管を染色するためには、アルコールによる脱脂および脱水などにより、遊離のチューブリンの除去や抗体のアクセスを向上させる必要がある。一方で ER は脂質膜から構成されるオルガネラであるため、有機溶媒に対して顕著な構造変化や破壊を示す。本研究ではこれらの問題点を解決した、冷アルコール-

ホルマリン固定と抗原賦活化処理を組み合わせにより、卵内における ER と微小管の同時染色に成功した。

この染色法を用いた観察から、第 2 細胞質再配置において dense ER が表層微小管構造である CAMP と同様の領域に局在し、相関をもって移動していることが示唆された (Fig. 5-5a,b)。また、後極表層からの観察においても同様に、dense ER と CAMP が同様の領域に存在していることが観察されている (Fig. 5-6)。さらに高倍率画像から、表層に微小管バンドルが形成される PNm において、そのバンドルが dense ER の領域で形成されていることが示された (Fig. 5-5c)。その後、発達した CAMP が形成される PNfu では、CAMP が dense ER 内に形成されていること (Fig. 5-5c)、また CAMP が縮小する Prometa1 から Meta1 においても CAMP は、dense ER 内に存在し続けることが観察された (Fig. 5-5c)。以上の微小管と ER の同時染色の結果から、CAMP が dense ER 内で形成され、dense ER の移動に寄与していることが示唆される。

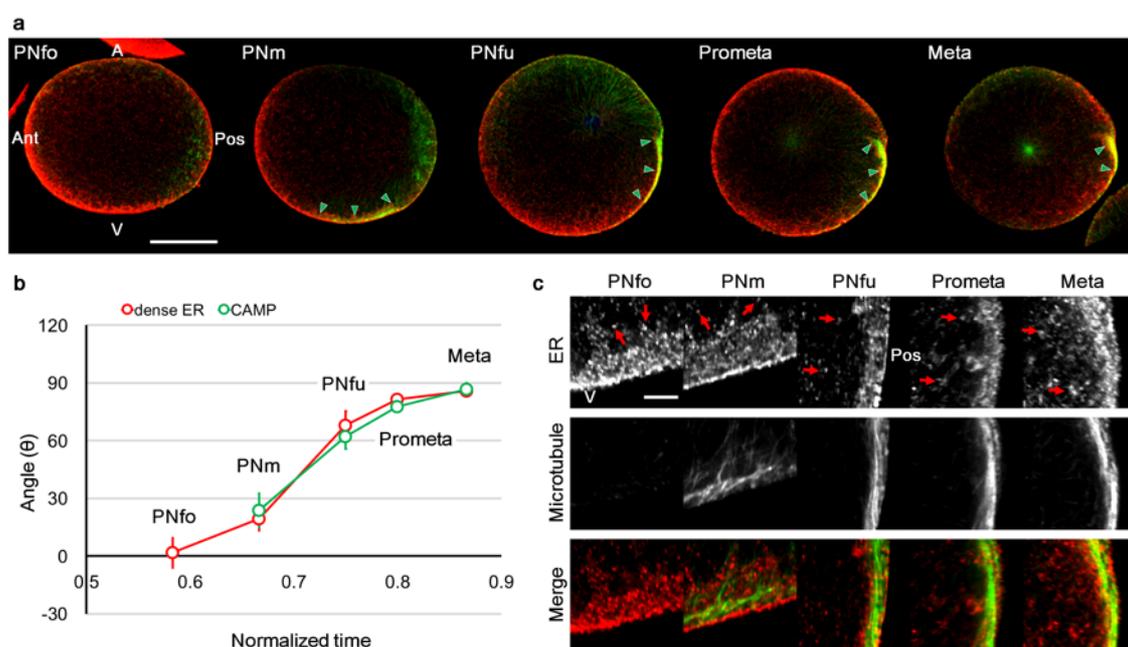


Figure 5-5. 第 2 細胞質再配置における ER と表層微小管構造の挙動

(a) PNfo, PNm, PNfu, Prometa, Meta における全載標本の同時染色像を示した。青および、赤、緑の染色はそれぞれ核、ER、微小管を示す。図は正中面における光学切片を示し、上方が動物極 (A: Animal pole)、下方が植物極 (V: Vegetal pole) を表す。また、精子星状体の位置より、前極 (Ant) -後極 (Pos) を示した。緑矢印は CAMP を示す。Scale bar=50 μ m。 (b) 植物極 (V) から後極 (Pos) への dense ER (赤) および微小管 (緑) の移動を定量的に測定した。また、解析結果を折れ線グラフで示した。解析方法の詳細は、Fig. 5-2 に記載した。Error bars は SD を表す (n = 3)。 (c) PNfo から Meta における dense ER 領域の高倍率画像。ER、微小管、およびマージされた画像を別々に示した。dense ER 領域はミトコンドリアが乏しい領域と対応している (白矢印)。Scale bar=5 μ m。 [from Goto et al., 2021]

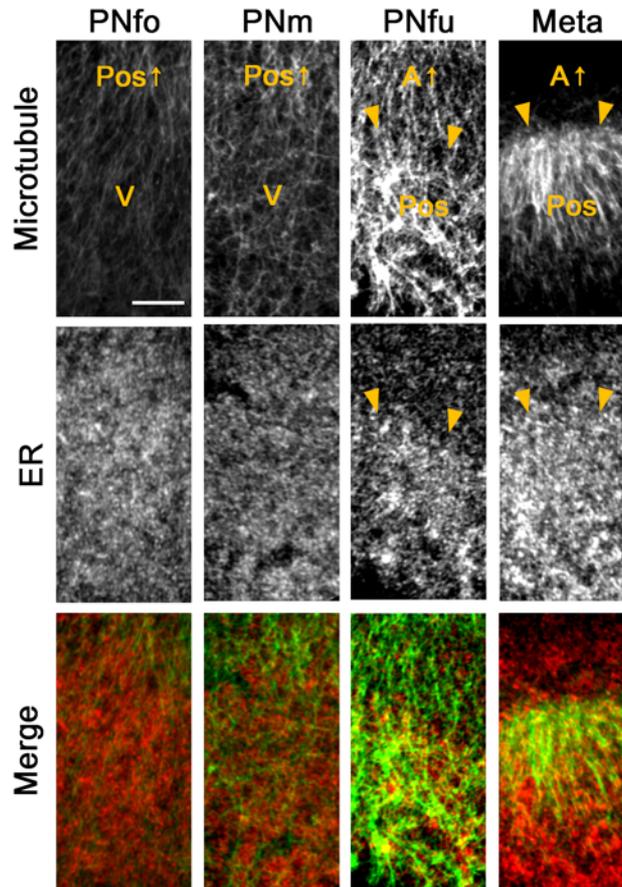


Figure 5-6. 第2細胞質再配置におけるERと表層微小管構造の挙動

PNfo、PNm、PNfu、Metaの高倍率画像の光学切片から厚さ約18 μm の3Dモデルを作成した。ER、ミトコンドリア、およびマージされた画像を別々に示している。PNfo、PNmでは植物極(V)を中心に、上側を後極方向(Pos \uparrow)にして示している。PNfuとMetaでは後極(Pos)を中心に、上側を動物極方向(Pos \uparrow)にして示している。矢尻は、卵表層から細胞質側に侵入し始めたdense ERの領域を示す。Scale bar = 5 μm 。[from Goto et al., 2021]

5-3-3.1 細胞期におけるERと母性mRNAの時空間的解析

最後に、母性mRNA (postplasmic/PEM RNA) とERやミトコンドリア、さらに微小管との時空間的な相関を明らかにするために、Fluorescence *in situ* hybridization とER、ミトコンドリアの免疫染色を組み合わせた新しい染色方法を開発した。まず、本研究で開発した手法が従来のFluorescence *in situ* hybridization法と同様のmRNAシグナルを示すかを確認するために、それぞれの手法を用いて作製した試料を同じ観察条件で比較した (Fig. 5-7)。Type I postplasmic/PEM RNAのプロープとして*macho-1*を用いた染色を行なった結果、双方ともに同様の後極における局在が観察されたが、新規法で作成した試料で

は、より強いシグナル強度を示した。Type II postplasmic/PEM RNA のプローブとして *vasa* を用いた観察でも同様に、新規法は従来法で作成した試料より高い S/N 比を示しつつ、同様の局在を示した。これらの結果から、局在領域を明瞭に観察できる新規手法を開発できたと結論づけた。

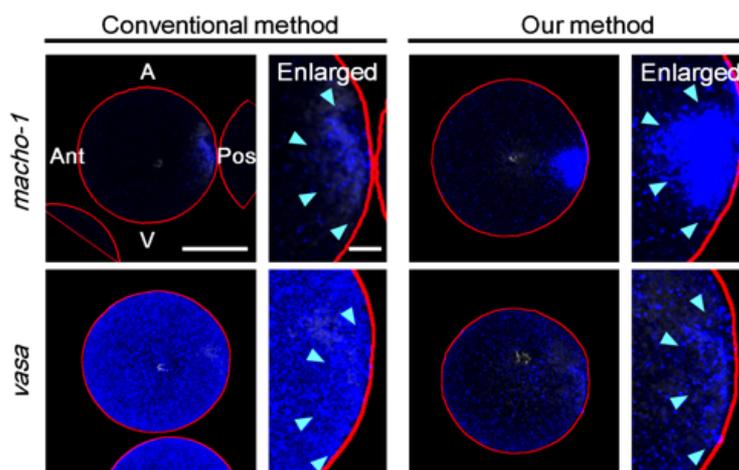


Figure 5-7. Fluorescence *in situ* hybridization における従来法および新規法の mRNA シグナルの比較

macho-1 と *vasa* のプローブを用いて、従来法と新規法で Fluorescence *in situ* hybridization を行い、同じ画像取得条件下で比較した。これらの卵は全て Meta における、正中断面の光学的切片を示す。どちらのプローブおよび手法においても後極に局在するシグナルが検出された（青：水色矢尻）。ImageJ で検出された卵の輪郭を赤線で示す。従来法と比較して、*macho-1* では高いシグナルと S/N 比が得られ、*vasa* では細胞質バックグラウンドの著しい減少が見られた。Scale bar = 50 μ m（卵全体画像）、10 μ m（拡大画像） [from Goto et al., 2021]

そこで次に、本手法を用いて ER、ミトコンドリア、postplasmic/PEM RNA を同時に全載標本で観察することにより、卵全体での時空間的な相関の可視化を行なった。Type I postplasmic/PEM RNA の 1 つである *macho-1* mRNA と ER、ミトコンドリアを同時に観察した結果、ER および *macho-1* は卵表層に均一に局在し、その細胞質側には MRC が存在していた (Fig. 5-8a; Unfertilized)。その後、第 1 細胞質再配置により、これらは全て植物極へと集積していることが観察された (Fig. 5-8a; Telo I)。この間、先行研究で報告されているように (Prodon et al., 2005)、*macho-1* は dense ER と共局在を示した (Fig. 5-8a; Unfertilized-Telo I, ER/*macho-1*)。一方で、第 2 細胞質再配置が開始する PNfo 以降において、*macho-1* は dense ER から乖離し、より細胞質側へと侵入かつ MRC 内で局在していることが観察された (Fig. 5-8a; PNfo-Meta, ER/*macho-1*)。Type I postplasmic/PEM RNA に分類される別の mRNA である *pem-1* mRNA においても、*macho-1* と同様の挙動を示した (Fig. 5-9a)。さらに、*macho-1* と ER の共局在性を再確認するために、Sardet ら (1992, 2011) が報告した方法にしたがい (Sardet et al., 1992, 2011)、45

mpf (PNm から Prometa) の卵から単離表層を調製し、微小管、ミトコンドリア、ER、および *macho-1* について四重染色を行った。また、CAMP の微小管バンドルが豊富な領域を指標に、後極植物極の単離表層を観察した (Fig.5-10)。 *macho-1* シグナルは、従来法および本研究での手法により取得された後極植物極の単離表層において、表層に存在する ER ではなく細胞質成分にある MRC 領域で強く検出された (Fig.5-10)。これらの結果は、*macho-1* が第 2 細胞質再配置において dense ER から乖離し、MRC 側で局在するということを強く支持するものである。

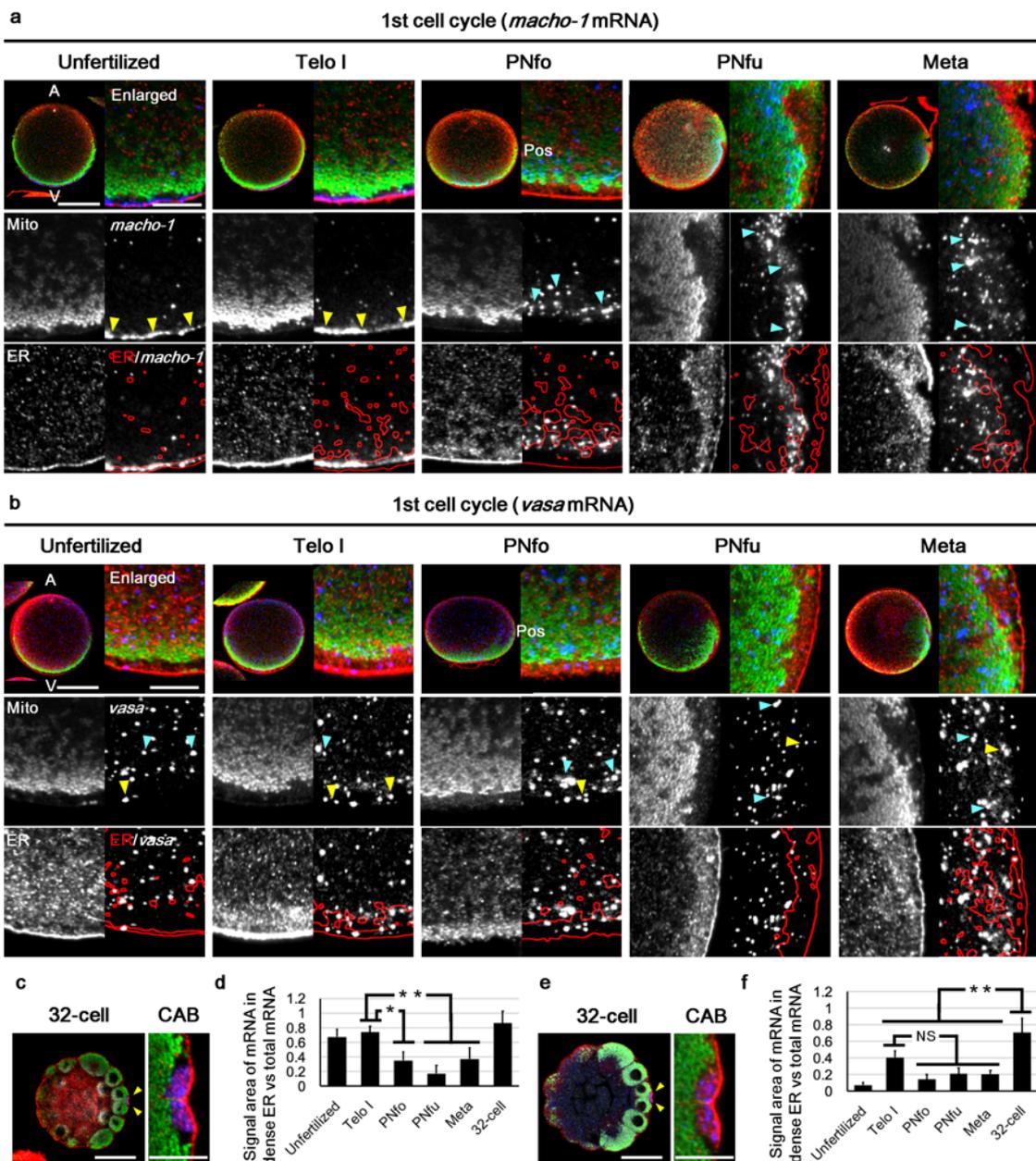


Figure 5-8. MRC および dense ER、postplasmic/PEM RNA の挙動

(a, b) 1細胞期における ER (赤) と ミトコンドリア (緑) および postplasmic/PEM RNA (青: *macho-1* (a)、*vasa* (b)) の同時染色像 (細胞周期は図上に示す; 未受精、Telo I、PNfo、PNfu、Meta). 図は正中面における光学切片を示し、上方が動物極 (A: Animal pole)、下方が植物極 (V: Vegetal pole) を表す。また、精子星状体の位置より、前極 (Ant)-後極 (Pos) を示した。図の上段は卵全体 (ラベルなし) と中段および下段は dense ER 領域の拡大 (各チャンネルを表記) を示している。核は DAPI で染色した (上段: 白)。下段右図においては ER 領域の輪郭 (赤線) と mRNA のシグナルと重ね合わせた (ER/*macho-1*、ER/*vasa*)。黄色と水色の矢尻はそれぞれ、dense ER と共局在する *macho-1* シグナルとしないシグナルを示す。Scale bar = 50 μm (卵全体像)、10 μm (拡大像)。(c, e) 32細胞期における ER (赤) と ミトコンドリア (緑) および postplasmic/PEM RNA (青: *macho-1* (c)、*vasa* (e))の同時染色像。右図に左図内の矢尻で示す CAB の拡大画像を示した。Scale bar = 50 μm (左画像)、10 μm (右画像)。(d, f) mRNA 総面積に対する dense ER 領域内の *macho-1* (d) または *vasa* (f) mRNA のシグナル面積の比率を算出することにより、postplasmic/PEM RNA と dense ER の共局在性を定量的に評価した。dense ER と mRNA シグナルの共局在を解析するために、まず 5 枚の光学切片から正中断面の 3D モデルを作成した。次に、ノイズ除去、コントラスト調整、二値化を行い、オブジェクトサイズを制限することで、dense ER 領域を抽出した。mRNA シグナルは二値化により領域を抽出した。その後、それぞれの面積を測定し、シグナル面積の比率を算出した。統計的有意性は、一元配置分散分析に続く Tukey-Kramer 検定により解析した。有意差は各記号で表した (NS: 有意差なし、*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$)。Error bar は SD を表す (*macho-1*: $n = 3$, *vasa*: $n = 4$)。[from Goto et al., 2021]

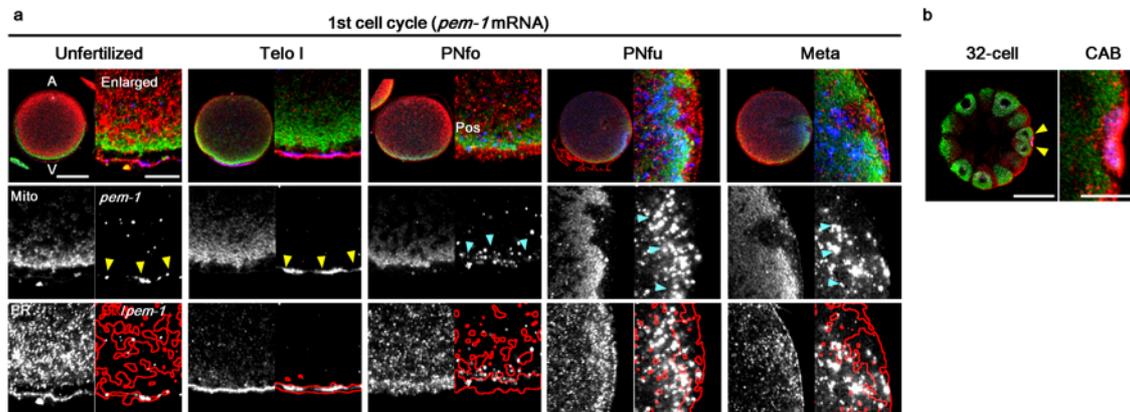


Figure 5-9. MRC および dense ER、pem-1 mRNA の挙動

(a) 1細胞期における ER (赤) と ミトコンドリア (緑) および *pem-1* mRNA (青) の同時染色像 (細胞周期は図上に示す; 未受精、Telo I、PNfo、PNfu、Meta). 図は正中面における光学切片を示し、上方が動物極 (A: Animal pole)、下方が植物極 (V: Vegetal pole) を表す。また、精子星状体の位置より、前極 (Ant)-後極 (Pos) を示した。図の上段は卵全体 (ラベルなし) と中段および下段は dense ER 領域の拡大 (各チャンネルを表記) を示している。核は 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride で染色した (上段: 白)。下段右図においては ER 領域の輪郭 (赤線) と mRNA のシグナルと重ね合わせた (ER/*pem-1*)。黄色と水色の矢尻はそれぞれ、dense ER と共局在する *pem-1* シグナルとしないシグナルを示す。Scale bar = 50 μm (卵全体像)、10 μm (拡大像)。(b) 32細胞期における ER (赤) と ミトコンドリア (緑) および *pem-1* mRNA (青)の同時染色像。右図に左図内の矢尻で示す CAB の拡大画像を示した。Scale bar = 50 μm (左画像)、10 μm (右画像)。[from Goto et al., 2021]

一方、Type II postplasmic/PEM RNA である *vasa* mRNA は、未受精卵から第2細胞質再配置開始まで細胞質中に均一に分布していたが、PNfo では植物極表層に蓄積していた (Fig. 5-8b; Unfertilized-PNfo)。その後、Meta までに Type I と同様に後極へと移動していた (Fig. 5-8b; PNfo-Meta)。一方で、Type II は Type I とは異なり 1 細胞期において dense ER とは明確な共局在シグナルは確認されなかった (Fig. 5-8b ER/*vasa*)。その後、32 細胞期においては、Type I および II は dense ER と共局在を示し CAB を構成していることが示された (Fig. 5-8c,e, Fig. 5-9b)。また、dense ER と Type I および II の共局在を定量的に解析した結果からも、これらの時間的変化を強く支持する結果が得られている (Fig. 5-8d,f)。

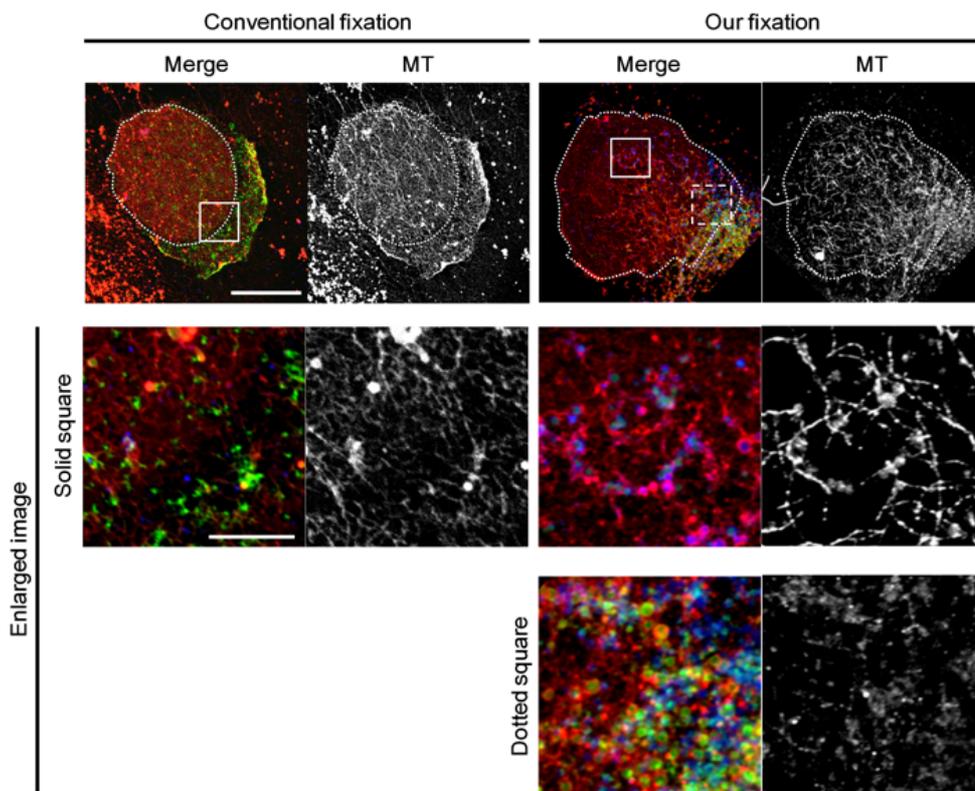


Figure 5-10. 単離表層における Myoplasm、母性 mRNA、微小管の空間情報
 45 mpf の卵から単離した卵表層を、ER (赤)、*macho-1* (緑)、ミトコンドリア (青)、微小管 (MT; 白) を従来の方法 (Conventional fixation)、もしくは本研究で開発した染色法 (Our fixation) で 4 重染色した。光学切片から作成した厚さ約 4 μm の 3 次元モデルを示す。マージ画像 (Merge) および微小管のみのシングルチャンネル (MT) を示した。これらの単離表層は左上からの水流によって破碎され、Myoplasm や *macho-1* は右下側に流れたと仮定する。点線は表層部分の境界であり、点線部外は細胞質に相当する。実線と破線領域の拡大画像を中段と下段に示した。実線領域は微小管に富んだ領域であり、後極表層に相当すると予想される。破線領域は細胞質成分であり MRC 領域であると予想される。Scale bar = 50 μm (上段)、10 μm (拡大画像)。[from Goto et al., 2021]

5-3-4. 卵割期における ER と母性 mRNA の時空間的解析

前章より、Type I postplasmic/PEM RNA は第2細胞質再配置までに dense ER から乖離するが、32細胞期には再び CAB として ER に再局在することがわかった。そこで、2細胞期から32細胞期までの ER と postplasmic/PEM RNA の挙動を観察することで、どの時期に dense ER と再共局在を示すのかを確認した。2細胞期では、dense ER は後極表層から細胞質側に渡り局在し、また、dense ER 内に *macho-1* のシグナルは、ほとんど検出されなかった (Fig. 5-11a)。一方、4細胞期では、dense ER が後極表層領域に集中し、*macho-1* の dense ER 領域での局在が明確に確認された (Fig. 5-11a)。その後、8-32細胞期では、dense ER は徐々に後極へと集積して CAB を形成し、*macho-1* はその間 dense ER に局在していた (Fig. 5-11a)。定量的な解析からもこの現象は強く示唆される (Fig. 5-11b)。また、Type II postplasmic/PEM RNA である *vasa* においても、2細胞期から4細胞期の間に、dense ER に局在していることが明らかとなった (Fig. 5-12)。さらに、詳細な観察から *macho-1* の再局在は2細胞期の分裂期から始まっていることが

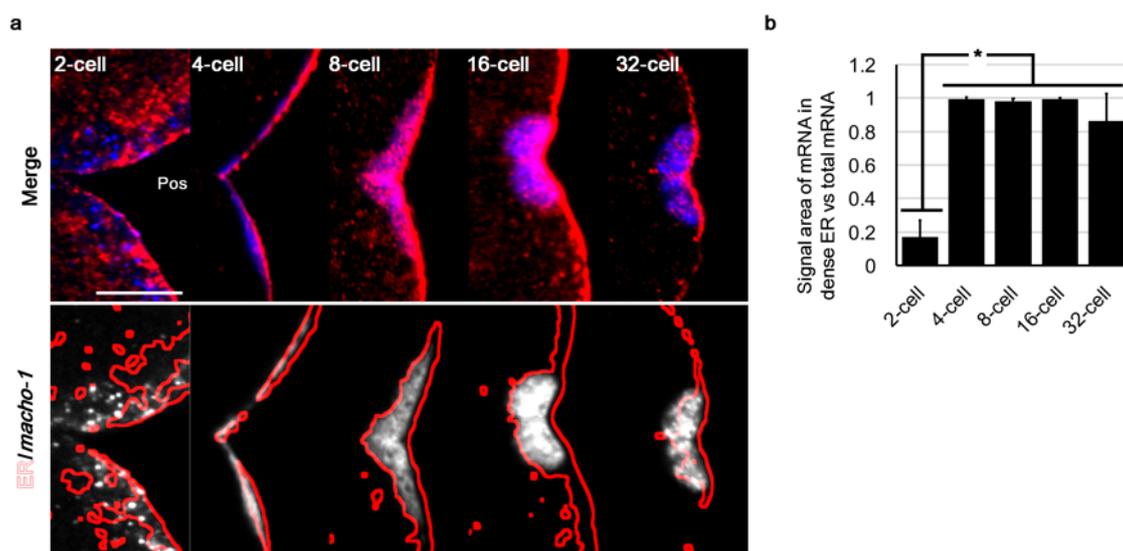


Figure 5-11. 分裂期における *macho-1* mRNA と dense ER の挙動

(a) 2-32細胞期における ER (赤) と *macho-1* (青) の同時染色像 (卵割期の情報は図上に示す; 2, 4, 8, 16, 32 cell)。2細胞期の細胞周期は間期、4細胞期以降の細胞周期は分裂期の胚であり、それぞれ CAB 形成領域の拡大画像を上段に示した (Merge)。画像右側は後極 (pos) を示す。下段は ER 領域の輪郭 (赤線) と mRNA のシグナル (白) を重ね合わせた画像を示している (ER/*macho-1*)。Scale bar = 10 μ m。 (b) Fig.5-8 と同様に *macho-1* シグナルの総面積に対する dense ER 領域内の *macho-1* シグナル面積の比率を算出することにより、postplasmic/PEM RNA と dense ER の共局在性を定量的に評価した。統計的有意性は、一元配置分散分析に続く Tukey-Kramer 検定により解析した。有意差は各記号で表した (*: $p < 0.05$)。Error bar は SD を表す (n=5)。 [from Goto et al., 2021]

観察された (Fig. 5-13)。以上の結果より、*macho-1* は第 2 細胞質再配置から 2 細胞期の分裂期までに一過的に dense ER から乖離するが、その後に再共局在することで CAB を形成することが示された。また、*vasa* においても 4 細胞期以降で dense ER に局在することから、卵割期における ER と mRNA の局在メカニズムは postplasmic/PEM RNA 間で共通性が高いことが示唆される。

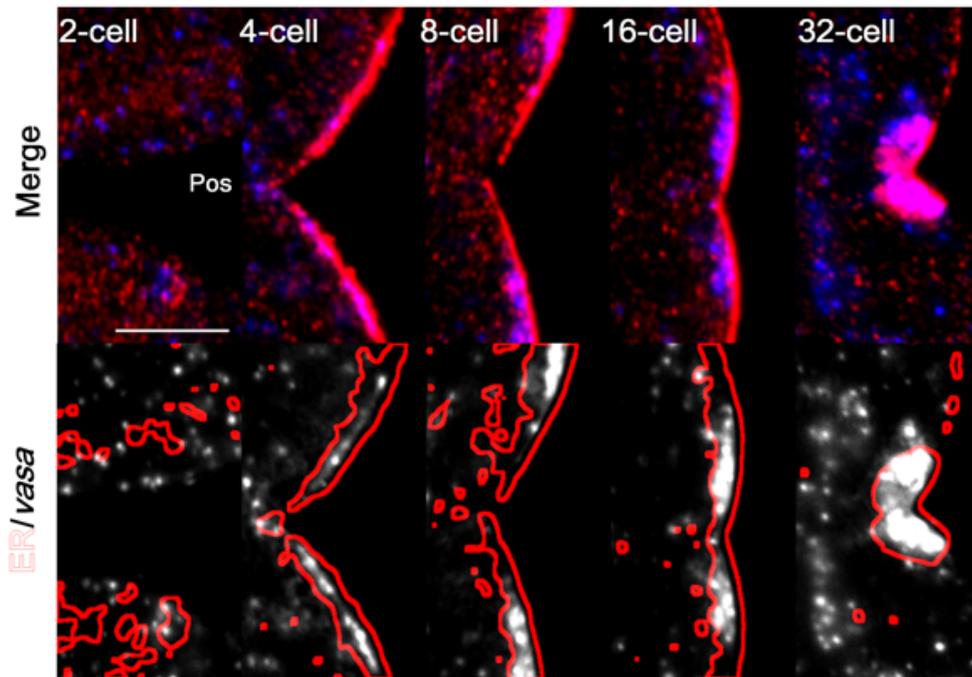


Figure 5-12. 分裂期における *vasa* mRNA と dense ER の挙動

2-32 細胞期における ER (赤) と *vasa* (青) の同時染色像 (卵割期の情報は図上に示す; 2, 4, 8, 16, 32 cell)。2 細胞期の細胞周期は間期、4 細胞期以降の細胞周期は分裂期の胚であり、それぞれ CAB 形成領域の拡大画像を上段に示した (Merge)。画像右側は後極 (pos) を示す。下段は ER 領域の輪郭 (赤線) と mRNA のシグナル (白) を重ね合わせた画像を示している (ER/*vasa*)。Scale bar = 10 μ m。[from Goto et al., 2021]

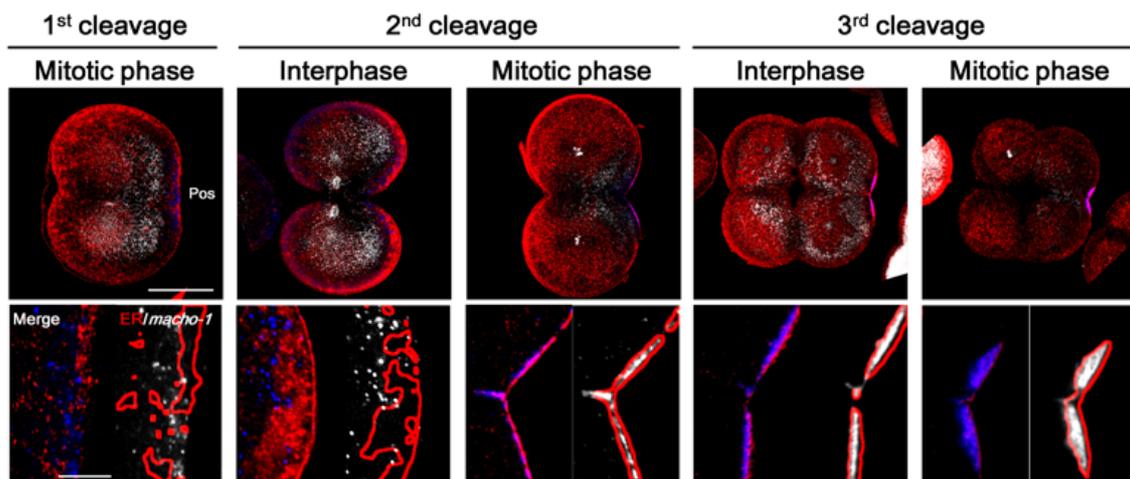


Figure 5-13. 第一から第三卵割の間期と分裂期における *macho-1* mRNA と dense ER の挙動

macho-1 と dense ER の再共局在化の時期を明らかにするために、第 1 から第 3 卵割の間期と分裂期における胚を ER (赤) と *macho-1* (青)、DAPI (白) で染色をした。上段は赤道面の光学切片におけるマージ画像を示す。画像右側は後極 (pos)。下段は CAB 形成領域の拡大画像 (Merge) と、ER 領域の輪郭 (赤線) と mRNA のシグナル (白) を重ね合わせた画像を示している (ER/*macho-1*)。Scale bar = 50 μm (上段)、10 μm (下段)。[from Goto et al., 2021]

5-4. 考察

ホヤ卵の myoplasm は、胚軸決定や組織分化の理解に重要であることから、100 年以上にわたって研究されてきた (Conklin, 1905)。この長い研究の歴史の中で、myoplasm には postplasmic/PEM RNA と呼ばれる母性 mRNA が存在し、その重要性と翻訳制御機構が胚軸決定や組織分化を含むホヤの形態形成に必要不可欠であることが明らかになっている (Prodon et al., 2007)。その一方で、遺伝情報である母性 mRNA がその機能を発現するために、翻訳制御を担う ER とリボソームの存在が不可欠であるが、ホヤ卵の ER もしくは ER と母性 mRNA の相関に関しては巨視的な知見しか得られていなかった (Sardet et al., 1992, 2003; Prodon et al., 2005)。本研究では、その問題点を解決すべく、全載標本で ER を含む Myoplasm を構成する要素を可視化するための、3 種類の可視化手法の開発に成功した。2 つは ER とミトコンドリアまたは微小管の二重免疫染色法、もうひとつは *in situ* hybridization と共に免疫染色を実施する方法である。これらのプロトコルを用いて、先行研究で明らかにされている myoplasm 内の ER である cER に相当するが、より細胞質側へと侵入した構造を持つ dense ER であることを証明した。また、この dense ER が第 2 細胞質再配置において、一過的に重層された ER シートから構成される cisterna 状へと形態変化することを FIB-SEM を用いて解析を行うことで、世界に先駆けて明らかにすることができた。ER は、細胞質全体に広がる連続した膜システムであるが、形態の違いにより異なる機能を有することが報告されている。一般的には、リボソームが結合した ER シートから構成される粗面 ER (rough ER: rER) とリボソームを持たない ER チューブから構成される滑面 ER (smooth ER: sER) に分類される (Westrate et al., 2015)。前述のように、これらの形態的なバリエーションはその機能と密接に関連している。例えば、タンパク質合成は rER で行われ、カルシウムイオンの貯蔵と排出は sER で優先的に行われる (Lynes and Simmen, 2011; Schwarz and Blower, 2016)。一方で、rER や sER とは異なり、細胞膜近傍でチューブとシートのハイブリッドな形状を示す cER は (Westrate et al., 2015)、様々な動物種で報告されており (Terasaki and

Jaffe, 1991; Kline et al., 1999; Estrada et al., 2003)、cER と細胞膜との接触部分では脂質合成や輸送などの特殊な機能を実行している (Tavassoli et al., 2013; Quon et al., 2018)。哺乳類細胞にも cER が存在し、膜結合タンパク質の輸送に重要な役割を担っていることが報告されている (Fox et al., 2013)。さらに、cER はマウスからウニまで幅広い種の卵にも存在しており、受精後のカルシウムウェーブに寄与することが報告されている (Terasaki and Jaffe, 1991; Kline et al., 1999)。また、前述のようにホヤ卵でも cER が報告されており、リボソームが結合したチューブとシートから構成されるネットワーク構造を示すことが確認されている (Sardet et al., 1992)。本研究では、FIB-SEM および共焦点顕微鏡による観察から、dense ER はネットワーク様の形態を示すが、後極への移動時に一過的に cisterna 状の形態へと変化していることが明らかとなった。また、その間に表層の微小管構造である CAMP が dense ER 内で形成されることも示すことができた。ER は形態と機能が密接に関連しているため、この dense ER のネットワーク様から cisterna 状への変化は、微小管との関連やオルガネラ輸送などの機能の発現に重要であることが期待される。

さらに、*in situ* hybridization と共に免疫染色を実施する新しい可視化手法によって、dense ER と postplasmic/PEM RNA の空間的な相関がダイナミックに変化することを証明できた。*macho-1* と *pem-1* (type I postplasmic/PEM mRNA) は第 2 細胞質再配置までに dense ER から乖離し、より細胞質側で MRC と共に局在することが観察された。先行研究を精査すると、著者の言及はないものの *Halocynthia* 卵の *HrPEM* と *macho-1* mRNA、および *Ciona* 卵の *pem-1* mRNA が第 2 細胞質再配置において表層から細胞質側へと局在をシフトさせるという結果が示されている (Sardet et al., 2003; Paix et al., 2011)。これらの先行研究は、本研究で観察された母性 mRNA の dense ER からの乖離に通じるものであり、本研究で得られたデータを支持するものである。また、本研究では、*macho-1* と *pem-1* mRNA は Telo I と PNfo の間で dense ER から乖離することを確認している。この時期は、myoplasm がアクチン繊維依存的な第 1 細胞質再配置からから微小管依存的な第 2 細胞質再配置へと移行する遷移期である (Sawada and Schatten, 1989; Chiba et al., 1999)。したがって、*macho-1* と *pem-1* の局在の変化が、細胞骨格の連携と関係していることが期待される。一方で、これらの mRNA は第 2 細胞質再配置で dense ER から乖離するものの、MRC や dense ER と共に後極へと移動する。この結果は、ER 以外の要素と母性 mRNA が相互作用を持って移動していることを示唆している。以上より、母性 mRNA の移動メカニズムを理解するためには、mRNA と細胞骨格や RNA 結合タンパク質との関連性を詳細に解析することが強く求められる。

Type II postplasmic/PEM mRNA である *vasa* は、1 細胞期には dense ER に局在

を示さないが、第2細胞質再配置後はType Iと同様に植物極から後極への移動が見られた。これまでの研究から本研究で得られた知見と同様に、Type IとType II postplasmic/PEM mRNAは第2細胞質再配置後に後極で類似した局在を示すことが報告されているが、一般的にこれらのmRNAの局在メカニズムは異なると考えられている (Sasakura et al., 2000; Paix et al., 2009)。本研究においても、PNfu期とMeta期におけるこれらmRNAの局在は巨視的に見ると類似しているものの、その詳細は異なるものであった。*macho-1*や*pem-1*はdense ER領域からほぼ完全に乖離していたが、*vasa*はdense ER領域を含み均一に後極で局在していた。この結果は、1細胞期においてはType IとType II postplasmic/PEM mRNAは別々の移動メカニズムを持つという報告を支持するものであった。一方、Yamadaは、*Ciona*卵の37種類のpostplasmic/PEM mRNA (Type IとType IIを含む)が、少なくとも4細胞期から明確にdense ER領域と想定される領域に局在することを報告している (Yamada, 2006)。本研究においても、*macho-1*と*vasa*はそれぞれ2細胞期から4細胞期の間dense ER領域に局在していることを確認している。したがって、1細胞期とは異なり卵割期においては、postplasmic/PEM RNAは同様の局在メカニズムを有していることが示唆される。

このようなpostplasmic/PEM RNAのdense ERへの乖離・再局在は、postplasmic/PEM RNAの移動とその翻訳メカニズムについて新たな疑問を投げかけるものである。特に第2細胞質再配置において、type I postplasmic/PEM RNAがdense ER領域から排除されMRC領域へと移動する理由に関しては興味深い。postplasmic/PEM RNAがMRC領域において遊離リボソームと結合しているかは不明であるが、第2細胞質再配置までや4細胞期以降においてtype I mRNAの翻訳がdense ER上で活発に行われ、dense ERから乖離中は休止状態になる可能性が考えられる。*Halocynthia*胚の4細胞期において、特異的な抗体により*macho-1*の翻訳産物が検出されている (Kumano et al., 2010)。一方で、*Ciona*卵と*Halocynthia*卵において、第2細胞質再配置開始までにおいても*pem-1/PEM* mRNAの翻訳産物が検出されている (Negishi et al., 2007; Paix et al., 2011)。したがって、これらの先行研究からも、我々のmRNAとdense ERの結合と乖離によって翻訳制御が行われているという分子制御モデルが支持される (Fig. 5-14)。しかし、type IIにおいては、*vasa*が4細胞期にはすでにdense ERと局在していることを本研究で明らかにしたが、*Ciona*卵における*vasa*の翻訳に関しては32細胞期以降でしか報告されていない (Shirae-Kurabayashi et al., 2006)。以上のことから、postplasmic/PEM RNAはそれぞれ独自の時期に翻訳が開始され、様々な翻訳制御機構が存在することが示唆される。したがって、発生初期における種々の母性mRNAとdense ERの正確な空間分布を明らかにすることは、形態形成に不可欠な翻訳制御機構を理解する上で非常に重要である。また、本研究で観察した

macho-1 と *vasa* はそれぞれ転写因子と RNA helicase であり、ともに分泌タンパク質や膜タンパク質をコードしていないため、ER 内で翻訳後修飾されることを要さず、遊離リボソームで翻訳されていると考えられる (Raz, 2000; Nishida and Sawada, 2001)。しかし、近年 Hannigan (2020) らにより、全ての mRNA が ER 上で翻訳されることを報告されている (Hannigan et al., 2020)。さらに、Reid と Nicchitta (2015) は、ER 膜上の RNA 結合タンパク質が mRNA に直接することで安定化することを報告しており (Reid and Nicchitta, 2015)、母性 mRNA の保護など多様な翻訳制御が ER 上で行われている可能性が示唆されている (Fig. 5-14)。

本研究で開発した全載標本の同時可視化手法は、細胞質再配置においてオルガネラや母性 mRNA、細胞骨格の局在や相互関係が複雑に制御されていることを明らかにした。このような、分子間の時空間的な複雑さを理解することによって、細胞質再配置の分子メカニズムを明らかにすることに貢献することができる。

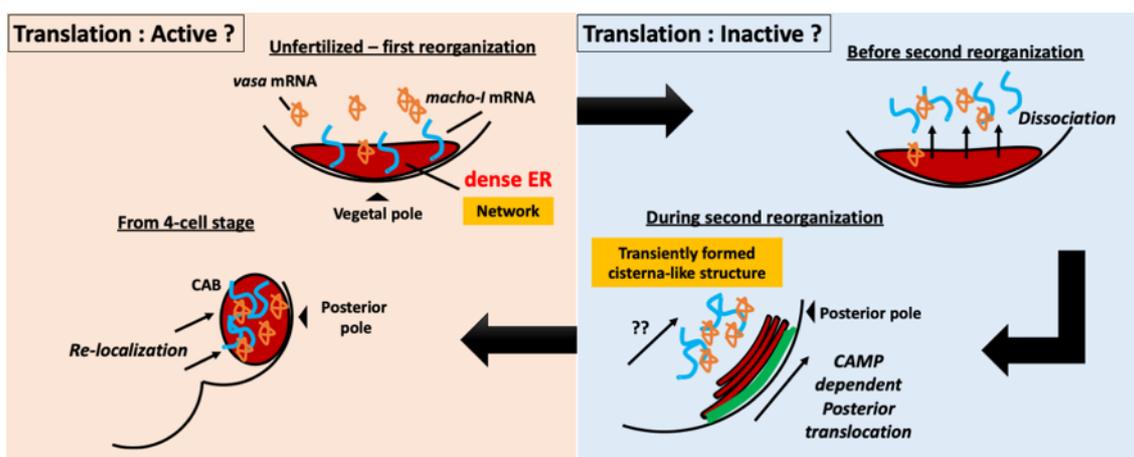


Figure 5-14. ホヤの初期発生における母性 mRNA の移動および翻訳制御メカニズムのモデル図

第 6 章 Actin 繊維の機能解析

6-1. 序論

これまでの研究から、細胞質再配置は“アクチン依存的な第1段階と微小管依存的な第2段階により myoplasm の後極への移動が完了する”といったように概論的には理解されている。しかし、第5章で記載した様に、第2細胞質再配置において、これまでに報告されている myoplasm 内の ER よりもより深い領域に渡り存在する dense ER の存在や type I postplasmic/PEM RNA の一過的な dense ER からの乖離する現象などから (Goto et al., 2021)、これまで考えられていなかった複雑なメカニズムの存在を考えなければならなくなっている。特に、これまでには第1細胞質再配置および第2細胞質再配置に注視されて研究が進められてきたが、その間の移行期に関しては特に注目されてこなかった。前述の dense ER からの type I postplasmic/PEM RNA の乖離はこの遷移期に行われることも示されており、新たなメカニズムを考えざるを得ない。そこで、本章ではアクチン繊維の役割を解析し、特に、第1と第2細胞質再配置の間の移行期や微小管構造との関係に着目して研究を行なった。

6-2. 実験操作

6-2-1. 実験動物

ホヤ成体 (*Ciona intestinalis*) は、National Bio-Resource Project より提供されたものを使用した。ホヤ成体から採卵後、コリオンを除去 (Ishii et al., 2012, 2014) し、フィルター濾過を行った 18°C の海水中で発生させた。この条件下で発生した胚は、受精後 30 mpf で第2細胞質再配置、60 mpf で第一卵割を開始する。受精には、別個体から採精した精子を 1N NaOH で pH を約 11 にすることで活性化させ、海水中で受精させた。

6-2-2. 薬剤添加実験

薬剤添加実験ではアクチン重合阻害剤 Cytochalasin B (CytB; Sigma-Aldrich) および微小管重合阻害剤 Nocodazole (Noco; Sigma-Aldrich) を用いた。CytB と Noco は DMSO に溶解させ、それぞれ終濃度が 2 µg/ml および 2.5 µg/ml になるように添加した。各阻害剤におけるコントロールとして DMSO を阻害剤処理群の同じ溶媒の濃度になるように添加した。

6-2-3. アクチン繊維の観察

目的のステージまで発生させた卵および胚を Prodon ら (2009) を参考にして作成した抽出液 (2% Triton-X 100、50 mM MgCl₂、10 mM KCl、10 mM EGTA、20% glycerol、25 mM imidazole) と固定液 (0.25% glutaraldehyde、3.7% formaldehyde、100 mM HEPES [pH=7.0]、50 mM EGTA、10 mM MgSO₄、525 mM sucrose) を 1:1 で混合した溶液を用い、室温で 15 分間かけて抽出固定した後、固定液のみで室温でさらに 2 時間固定を続けた。固定した標本は PBST で洗浄した後に、10 unit/ml Alexa Fluor 488 標識ファロイジン (Molecular Probes, USA) により室温で 30 分間処理した。脱水せずに透明化するために、ファロイジン染色した標本を 40% fructose で 30 分間、室温で処理し、SeeDB 溶液 (80.2% fructose、0.5% α -thioglycerol) と共に封入した。

6-2-4. 免疫蛍光染色

目的のステージまで発生させた胚を 100% MeOH を用いて室温で一時間固定を行った。その後、標本は 100% EtOH に置換し、-20°C で保存した。染色時、標本は 0.05% Tween 20 を含む PBST を用いて洗い、改良 Scale 試薬 G1T0 で 4°C、90 分間処理を行った。Scale 処理を行った胚を再び PBST で洗い、一次抗体として anti- α -tubulin mouse monoclonal antibody (1:100) を添加した。二次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1:1000) を用いて蛍光標識を行った。抗体の希釈溶液は全て Blocking one を用いた。また、5 μ g/ml DAPI により、染色体を蛍光標識した。

6-2-5. Whole-mount Fluorescence *in situ* hybridization

目的のステージまで発生させた卵を 0.5 M NaCl および 0.1 M 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (Mops: pH=7.5) に 4.0% となるように溶解した paraformaldehyde を用いて固定した。固定は室温で 1 時間行った後に 100% EtOH に置換し、使用まで -20°C で保存した。固定標本を EtOH 下降系列 (100%、70%、35%) により再水和した後に PBST 洗浄し、5 μ g/ml Proteinase K で 15 分間、37°C で処理した。2 mg/ml グリシン溶液で Proteinase K 反応を止め、4.0% paraformaldehyde で 1 時間、後固定を行なった。PBST で洗浄後、0.1 M 2,2',2'' Nitrilotriethanol および 0.27% 無水酢酸を含む混合溶液を用いて室温で 10 分間アセチル化処理を行った。その後、Pre-hybridization 溶液 (5xSSC、50% formamide、50 μ g/ml heparin、100 μ g/ml yeast tRNA、1.0% Tween20) を用いて 50°C、1 時間 Pre-

hybridization を行った後、Pre-hybridization 溶液に Ci-macho-1 のアンチセンス RNA probe を 0.5 µg/ml の濃度で混合し、50°C で 16 時間 hybridization を行った。Hybridization を行った標本を、5xSSC および 2xSSC wash buffer (5x または 2xSSC、50% formamide、1.0% Tween20) で洗浄した後、遊離のプローブを除去するため 37°C で 20 分間 20 µg/ml の RNase A 処理をした。その後、2xSSCT および 0.2xSSCT (2xSSC または 0.2xSSC、0.1% Tween20) で洗浄し、alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG Fab fragment (Sigma-Aldrich; 1:1000) を用いてプローブの DIG に対して AP 標識を行なった。その後 X-リン酸およびテトラゾリウム塩の混合溶液で処理することによりホルマザン発色を行なった。

6-2-6. 免疫蛍光染色と Fluorescence *in situ* hybridization の同時染色

目的のステージまで発生させた卵を -20°C で冷却した固定液 Fix Solution 2 (70% MeOH、3.2% methanol free formaldehyde) を用いて固定した。固定は -20°C で 1 時間行い、その後室温でさらに 1 時間行った後に 100% EtOH に置換し、使用まで -20°C で保存した。固定標本を EtOH 下降系列 (100%、70%、35%) により再水和した後、PBST で洗浄し GIT0 処理を行った。その後、Pre-hybridization 溶液と抗原賦活化液の混合液 (3.78 M Urea、0.063 M Tris-HCl [pH=9.5]、50 µg/ml heparin、100 µg/ml yeast tRNA、1.0% Tween20) 中で 80°C、30 分間抗原賦活化処理を行った。その後、Pre-hybridization 溶液に調整したアンチセンス RNA probe 中で、50°C で 16 時間 hybridization を行った。Hybridization を行った標本を、5xSSC および 2xSSC wash buffer (5x または 2xSSC、50% formamide、1.0% Tween20) で洗浄した後、遊離のプローブを除去するため 20 µg/ml RNase A を用いて 37°C で 20 分間インキュベーションした。その後、2xSSCT および 0.2xSSCT (2xSSC または 0.2xSSC、0.1% Tween20) で洗浄し、peroxidase conjugated anti-DIG fab fragment (1:100) および anti-NN18 mouse monoclonal antibody (1:100)、anti-Bip rabbit polyclonal antibody (StressMarq Biosciences, Canada; 1:100) を添加することで、プローブの HRP 標識と一次抗体染色を行なった。二次抗体として Alexa Fluor 405-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1:200)、Alexa Fluor Plus 555-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:1000) を用いて蛍光標識を行った。その後 FITC-Tyramide (Akoya Bioscience) で室温 30 分間処理することにより mRNA を蛍光標識した。その後、5 µg/ml DAPI により染色体を蛍光標識した。

6-2-7. 顕微鏡観察および画像解析

免疫染色を行った全載標本は EtOH 上昇系列 (35%、70%、100%) により脱水

後、サリチル酸メチル (Nacalai Tesque, Japan) で透明化処理を行い、ホールスライドガラスにマウントした。試料の観察は共焦点顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss, Germany) または A1RHD25 (Nikon, Japan) を用いて行った。取得した画像は、それぞれのイメージングソフトウェア ZEN Black edition (Carl Zeiss) および NIS element imaging software (Nikon) を用いて取得した。Image J Fiji (Schindelin et al., 2012) を用いて取得した生データから、光学切片および立体再構成した 3D 画像をそれぞれ作成した。光学切片は正中断面 (画像の上側が動物極、右側が後極) で作製し、一方 3D 画像は Side view (正中断面の立体再構成) および Posterior view (Side view を後極側からの視点に回転) で作製した。画像解析の詳細はそれぞれの図中の説明に記した。Whole-mount Fluorescence *in situ* hybridization のみで染色した標本は、80% Glycerol で封入し、Biorevo BZ-9000 (Keyence, Japan) にて透過光観察を行なった。また、幼生は Fix solution 2 で固定後に同様の手法で透過光観察を行なった。

6-3. 実験結果

6-3-1. 1 細胞期におけるアクチン繊維の時空間的解析

細胞質再配置ではアクチン繊維が myoplasm の移動に寄与していることがよく知られている。受精後、カルシウムシグナルの制御下で卵表層に均一に存在していたアクチン繊維は植物極表層へ集積するが (Chiba et al., 1999; Roegiers et al., 1999; Yoshida et al., 2003)、第 1 細胞質再配置以降のこの植物極のアクチン繊維の挙動や機能に関しては報告されていない。そこで、本研究ではまず、1 細胞期を通してアクチン繊維の時空間的な挙動を調べることを目的とした。この際、全載標本を用いて卵全体でアクチン繊維の分布を観察するためには、100 μm を超える厚みの標本の観察には透明化する必要がある。これまでの観察では、標本を脱水してサリチル酸メチルに置換することにより透明化を行ってきたが、アクチン繊維においてはアルコール処理によりファロイジンの認識部位の変性が見られるため、脱水処理を避けることが強く求められる。そこで、本研究では固定時に緩やかに透過処理を行いつつ、親水性透明化試薬 SeeDB による封入を経て透明化することで全載標本におけるアクチン繊維の明瞭かつ安定的に観察できる手法を開発した (Fig. 6-1)。この手法では、細胞質分裂時の収縮管や極体放出時のアクチンキャップなど典型的なアクチン繊維の集積が明確に確認されたことから、十分な感度でアクチン繊維を可視化できていると判断できる (Fig. 6-1)。またこれまでの報告同様 (Chiba et al., 1999; Roegiers et al., 1999)、10 mpf において第 1 細胞質再配置由来の植物極表層でのアクチン集積が観察されている。

今回透明化をすることで、この植物極での集積が 20 mpf まで滞留し続けること、さらにその後、30 mpf にかけて徐々に集積が弱くなっていくものの植物極に存在し続けることが示された (Fig. 6-1b)。その後、45 mpf では顕著な集積は見られなくなった (Fig. 6-1b)。本研究では、第 1 細胞質再配置終了後 30 mpf までの植物極におけるアクチン繊維の集積を Prolonged F-actin accumulation と名付けた。

6-3-2. CytB 処理による微小管構造への影響を解析

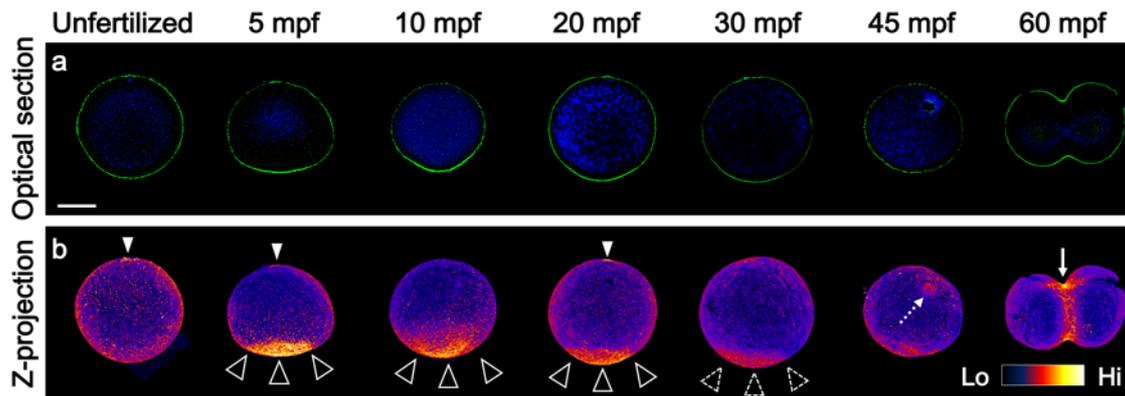


Figure 6-1. 1 細胞期におけるアクチン繊維の挙動

(a) 1 細胞期における核 (青) および アクチン繊維 (緑) の 染色像 (時間は図上に示す). 図は 60 mpf を除き、正中面における光学切片を示した. 図中の上方が動物極、下方が植物極を表す. また、精子由来の染色体の位置より、左右はそれぞれ前極と後極を指す. 5 mpf と 20 mpf における矢尻はその直下に減数分裂紡錘体が存在することが示唆されるアクチンキャップを指す. Scale bar = 50 μm . (b) F-actin のシングルチャンネルから 3 次元モデルを作成し、range indicator により、ファロイジンのシグナル強度を表現した. 右下に強度範囲を示す. 実線矢尻は植物極における F-actin の強いシグナルを、破線矢尻は弱いシグナルをそれぞれ示している. 45 mpf では分裂装置がわずかに染色され (点線矢印)、60 mpf では裂溝の収縮輪が明るく染色された (矢印). [from Goto et al., 2022]

次に、第 1 細胞質再配置 (受精直後) におけるアクチン繊維の集積や Prolonged F-actin accumulation が細胞質再配置においてどのような役割を担っているかを確認した. まず、第 2 細胞質再配置に必要な細胞骨格である微小管に着目して研究を進めた. Fig. 6-2a に示すように、1 細胞期の様々な時期においてアクチンの重合阻害剤である CytB で処理することにより、微小管構造への影響を確認した (CytB_01 [0-10 mpf]、CytB_02 [0-30 mpf]、CytB_03 [10-30 mpf]、CytB_04 [30-45 mpf]). なお、CytB 処理によりアクチン繊維の集積が十分に阻害されること

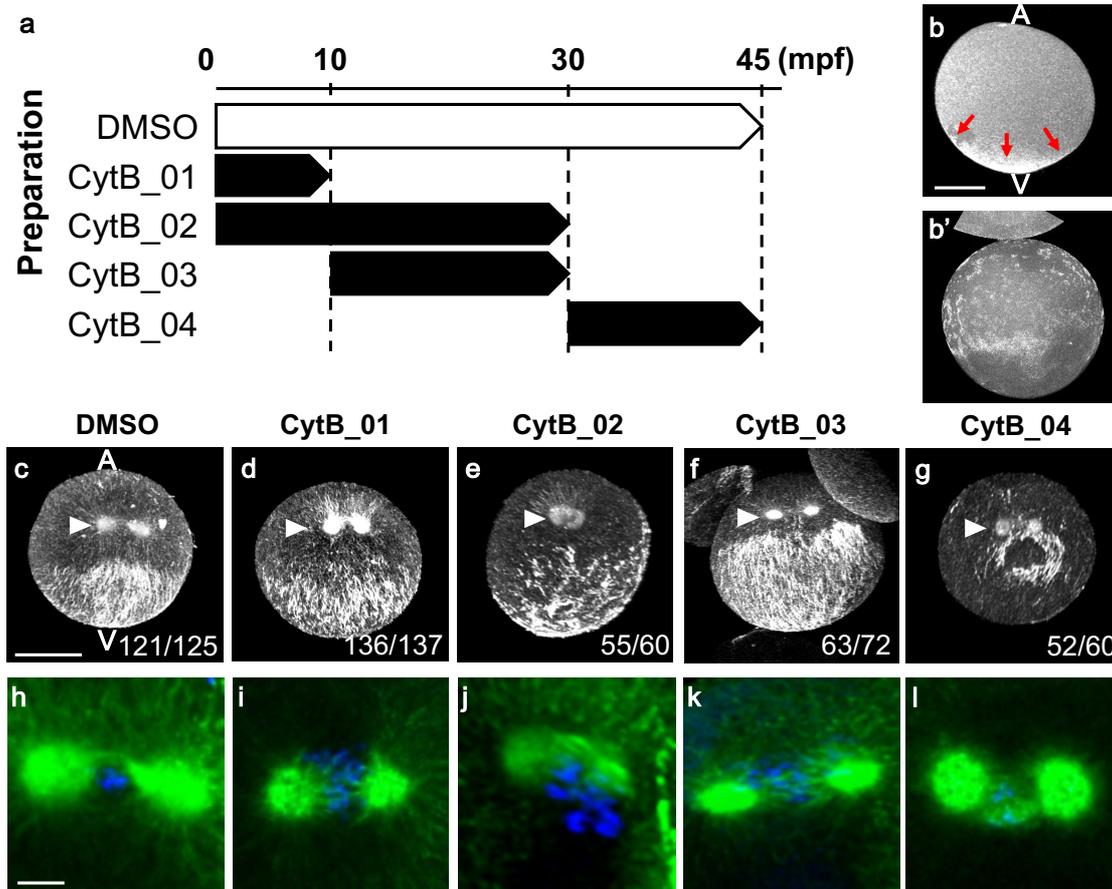


Figure 6-2. CytB 処理による微小管構造への影響

(a) CytB 処理を行うサンプル (CytB_01-04)の説明図を示した。白ブロックと黒ブロックはそれぞれコントロールとして用いた DMSO および CytB の処理時間を示す。(b) 10 mpf における DMSO 処理 (b) および CytB 処理卵 (b') の F-アクチン (緑) の染色像。図は 3 次元モデルであり side view で示している。矢印は植物極におけるアクチン繊維の局在を示す。Scale bar = 50 μm 。(c-g) CytB 処理を行なった卵の微小管染色像。図は 3 次元モデルであり、posterior view で示されている。図上が動物極で下方が植物極を表す。矢尻は精子星状体を指す。左下の数値は、各図中の卵と同様の影響が見られる卵の数を示している。Scale bar = 50 μm 。(h-i) c-g における分裂装置の拡大図。緑と青はそれぞれ微小管と染色体を示す。Scale bar = 10 μm 。
[from Goto et al., 2022]

を確認している (Fig. 6-2b,b')。CytB 処理を行なった卵は、CAMP や精子星状体が見られる 45 mpf において固定し、微小管構造への影響を調べた。未処理卵では、CAMP が後極植物極表層で正常に形成されていた (Fig. 6-2c)。CytB_01 および CytB_03 処理においても CAMP は形成されるものの、未処理卵でみられるような正中線への集積が十分に見られず、左右方向へ拡大していることが観察された (Fig. 6-2d,f)。CytB_02 処理では、CAMP は形成されず、微小管バンドルが植物半球に広くランダムに分布していた (Fig. 6-2e)。CytB_04 処理では、赤道付近の正中線領域に集積した CAMP 様の構造は形成されるものの微小管バンドル

が大きく欠失することが観察された (Fig. 6-2g)。一方で、精子星状体に関してはどの処理群においてもほぼ正常に形成されており、CAMP と精子星状体とは卵内で異なった制御を受けていることを示している (Fig. 6-2h-i)。ただ CytB_02 処理では、第 1 卵割の分裂装置の形成が遅れている事から、細胞周期への一般的影響が出ていることが推察される。この結果から、CAMP 形成に関して、アクチン繊維が 1 細胞期を通して継続的に密接に関係していることが示唆された。

6-3-3. CytB 処理による myoplasm の移動への影響を解析

CytB 処理したタイミングによらず第 2 細胞質再配置に寄与する CAMP の形成の異常が認められたため、全ての時期において CAMP 形成に対するアクチン繊維は何らかの役割を持っていることが示された。そこで次に、myoplasm を構成する dense ER、MRC、postplasmic/PEM RNA の後極への移動に対する CytB 処理の影響を確認した。まず、第 2 細胞質再配置以前に CytB 処理した群 (CytB_01-03) に着目して解析を行なった。CytB 処理した卵を 45 mpf で固定し、type I postplasmic/PEM RNA (*macho-1* mRNA)、ER、ミトコンドリアの 3 重染色を行った。DMSO 処理群では、dense ER、MRC および *macho-1* が後極に位置し、前章で報告したように dense ER が MRC のより表層側に、dense ER から乖離した *macho-1* は MRC 領域内で局在していた (Fig. 6-3a)。また、三次元像から *macho-1* が後極に位置し、赤道付近の正中線領域で集積していることが観察された (Fig. 6-3a',a'')。一方 CytB_01 処理群では、dense ER、MRC および *macho-1* の大部分は後極へと移動するが、植物極から前極にかけて一部が残存していることが観察された (Fig. 6-3b,b')。また、後極の *macho-1* の局在においても DMSO 処理群のように一団で局在せず疎らとなり、左右方向への広がりが見られた (Fig. 6-3b'')。CytB_02 処理群では dense ER、MRC および *macho-1* の後極への移動は観察されず、植物半球の表層領域に広く局在していることが観察された (Fig. 6-3c,c',c'')。CytB_03 では DMSO 処理群と同様、dense ER、MRC および *macho-1* が後極に局在していた (Fig. 6-3d,d')。しかし、三次元像から *macho-1* が後極に一団で局在するが、CytB_01 処理群のように正中線領域で集積せず左右方向への広がりが観察された (Fig. 6-3d'')。これらの結果をより詳細に理解するために、*macho-1* のシグナル領域の位置を定量的に解析した。Side view で示した 3D モデルの解析では (Fig. 6-3e,f)、DMSO および CytB_03 で後極領域に局在していることが示された。一方、CytB_01 と_02 では後極から前極側に向かって広く局在しており、第 2 細胞質再配置の際に後極側に移動できなかった *macho-1* があることを示唆している (Fig. 6-3f)。また、3D モデルを動物極側から見て解析した結果では (Fig. 6-3e,g)、全ての CytB 処理において、*macho-1* の局在領域が DMSO 処理群よりも

広く左右方向に渡って分布していた (Fig. 6-3g)。CytB_01 と CytB_03 においては同程度の左右方向への拡大がみられ、CytB_02 で著しい影響は CytB_01 と

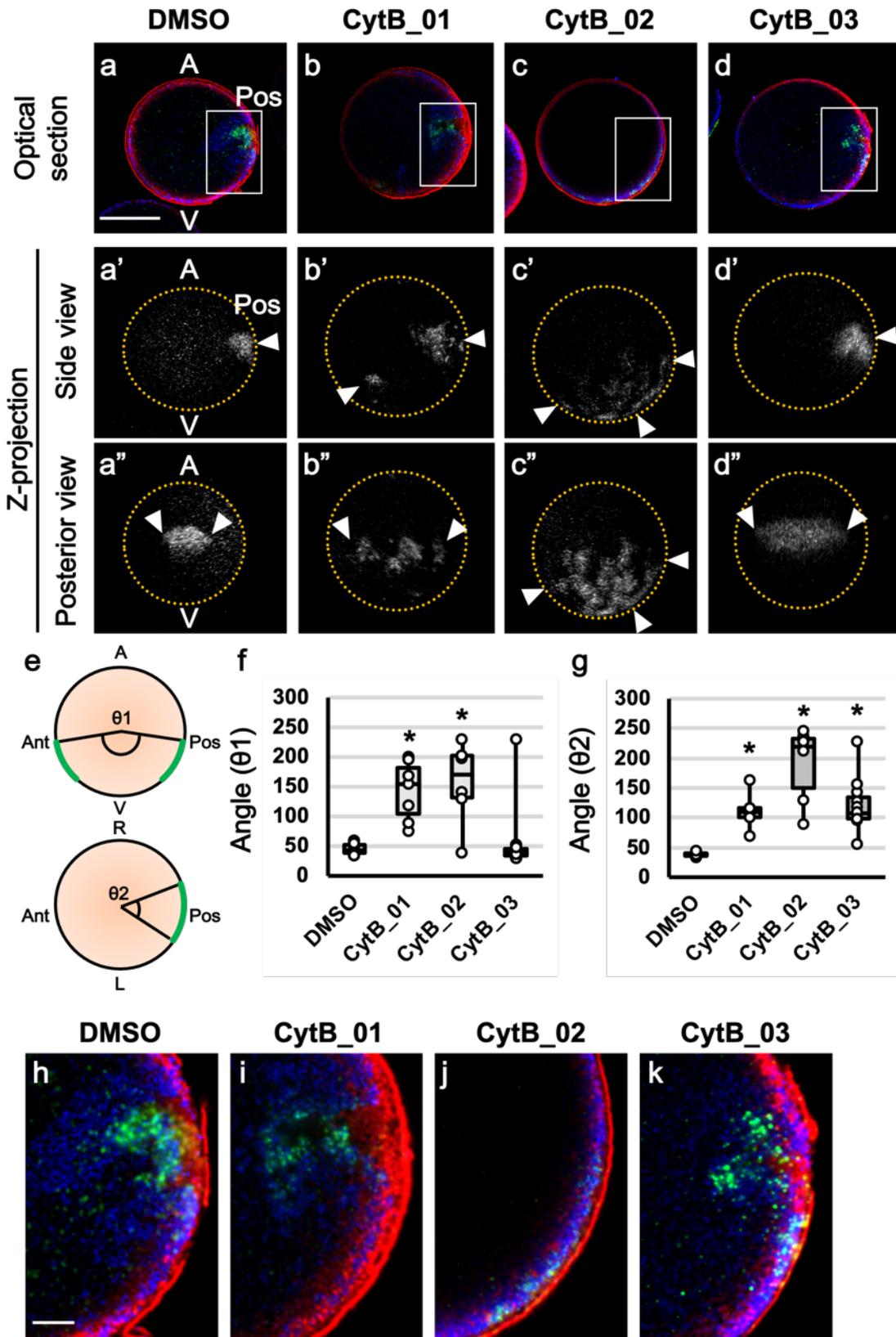


Figure 6-3. CytB 処理による myoplasm を構成する要素の移動への影響

(a-d) 45 mpf 卵における ER (赤) と ミトコンドリア (青) および *macho-1* (緑) 同時染色像。図は正中面における光学切片を示し、上方が動物極 (A: Animal pole)、下方が植物極 (V: Vegetal pole)、右側が後極 (Pos) を表す。図上のラベルは Fig.6-2 に示したサンプル群を明記している。(a'-d') a-d における *macho-1* のチャンネルから作成した 3 次元モデルを Side view で示した。(a''-d'') a-d における *macho-1* のチャンネルから作成した 3 次元モデルを Posterior view で示した。矢尻と黄色点線はそれぞれ *macho-1* のシグナルと卵の輪郭を指す。Scale bar = 50 μm 。(e) 3D モデルにおける *macho-1* 局在領域解析の模式図。卵の中心と *macho-1* 局在領域の動植物軸方向の両端を結ぶ三点から得られる角度 θ_1 、および卵の中心と *macho-1* 局在領域の左右方向の両端を結ぶ三点から得られる角度 θ_2 を計測した。(f, g) θ_1 、 θ_2 の計測結果をそれぞれ j, k の箱ひげ図で示した。各プロットは計測した卵に相当する。解析したサンプル数は DMSO、CytB_01、CytB_02、CytB_03 で、それぞれ 7、7、6、11 個である。統計的有意性は、一元配置分散分析に続く Dunette's 検定により DMSO 群との優位差を解析した (*: $p < 0.05$)。(h-k) a-d に示された四角内の拡大図。Scale bar = 10 μm 。[from Goto et al., 2022]

CytB_03 の相加効果であると考えられる。Cyt_B 処理により *macho-1* の分布が異常となる一方で、dense ER、MRC および *macho-1* の相対的な位置関係には顕著な影響が観察されていない (Fig. 6-3h-k)。しかし、一方で正中断面における後極のそれぞれの局在量は DMSO に比べ少ない傾向にある (Fig. 6-3h-k)。これらは、前極側での残存や、左右方向への広がりから、正中断面で観察される局在量が相対的に減少したことが示唆される。以上の結果から、アクチン繊維の働きには、第 1 細胞質再配置において植物極へと *macho-1* を移動・集積させるだけでなく、Prolonged F-actin accumulation が *macho-1* の正中線領域への収束に関与していることが推測された。

次に、第 2 細胞質再配置における CytB の影響を確認するために、CytB_04 で処理した卵を 45 mpf で固定し、*macho-1*、ER、ミトコンドリアの同時染色を行った卵の解析を行なった。DMSO 処理卵では、dense ER においては後極へ移動後に表層から卵中央部に向かって進入し、*macho-1* は dense ER から乖離することで MRC に局在していた (Fig. 6-4a, a', c, c')。CytB_04 処理卵では、同様に *macho-1* と dense ER が後極へ移動するものの、dense ER の明確な細胞質側への進入が見られなかった (Fig. 6-4b, b')。さらに、*macho-1* が MRC へと移行せずに、ほとんどが dense ER と共局在していた (Fig. 6-4d, d')。そこで、*macho-1* の MRC への移行に微小管が関与するかを確認するために、第 2 細胞質再配置において微小管重合阻害剤である Nocodazole (Noco) で処理した卵を観察した。Noco 処理群において、明確な微小管構造は確認されず、dense ER 内に抗チューブリン抗体による不明瞭な染色が見られた (Fig. 6-4e, e', e'')。dense ER、MRC、*macho-1* においては、第 2 細胞質再配置の移動が阻害されていることが反映され、植物極に留まっていることが確認された (Fig. 6-4f)。興味深いことに、Noco 処理群においても CytB_04 と同様に dense ER からの *macho-1* の解離が阻害され、ほとん

どが dense ER と共局在していることが観察された (Fig. 6-4f', f'')。一方で、dense ER と MRC の相対的な位置関係に影響は観察されなかった (Fig. 6-4f''')。DMSO および CytB_04、Noco 処理群において dense ER における *macho-1* の共局在の割合を定量したところ、このチューブリン染色領域には、高密度の ER が存在しており、CytB_04、Noco 処理群では *macho-1* の大部分が dense ER に局在していることが示された (Fig. 6-4g,h)。以上の結果は、第 2 細胞質再配置において、アクチン繊維と微小管が何らかの相互作用を持つことにより dense ER からの *macho-1* の乖離を制御していることを示唆している。

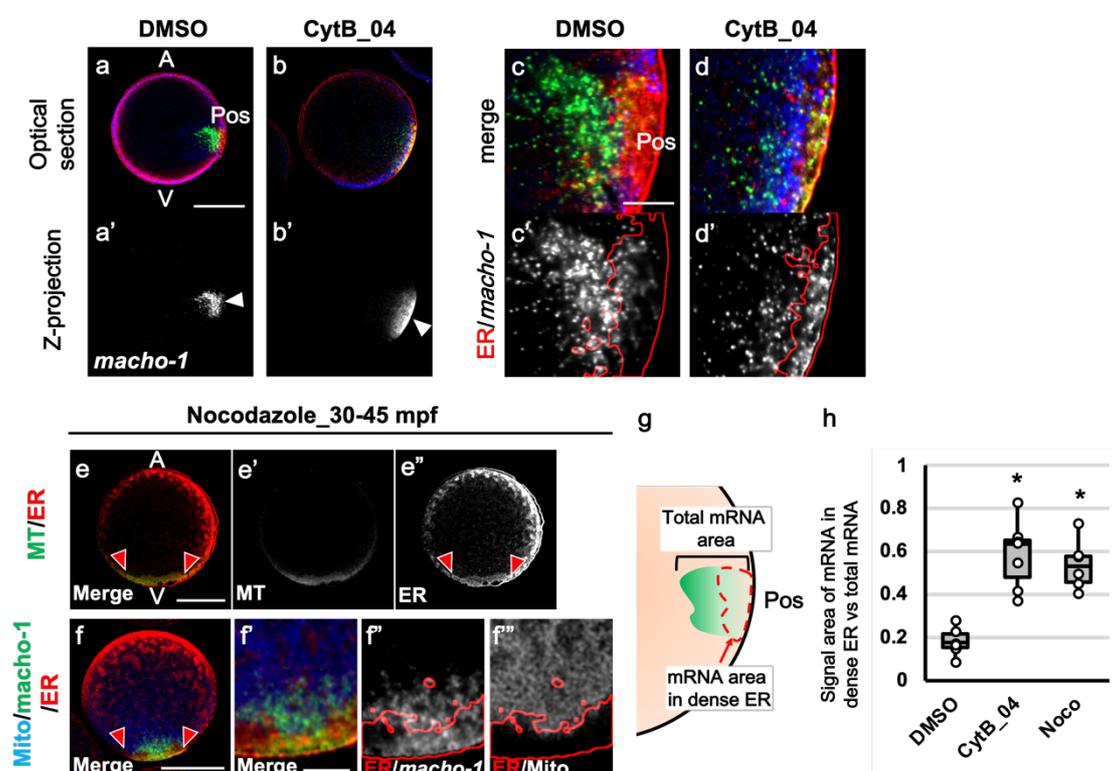


Figure 6-4. 第 2 細胞質再配置における CytB および Noco 処理による myoplasm を構成する要素の移動への影響

(a,b) CytB_04 および DMSO 処理を行なった 45 mpf 卵における ER (赤) と ミトコンドリア (青) および *macho-1* (緑) の同時染色像。図は正中面における光学切片を示し、上方が動物極 (A: Animal pole)、下方が植物極 (V: Vegetal pole)、右側が後極 (Pos) を表す。図上のラベルは Fig.6-2 に示したサンプル群を明記している。(a',b') a,b における *macho-1* のチャンネルから作成した 3 次元モデルを示した。矢尻は *macho-1* のシグナルを指す。Scale bar=50 μ m。(c,d) dense ER 領域の拡大図。(c',d') c,d における ER 領域の輪郭 (赤線) と *macho-1* のシグナルと重ね合わせた。Scale bar=10 μ m。(e-e'') Noco 処理を行なった 45 mpf 卵における ER (赤) と 微小管 (緑) の同時染色像。図は光学切片を示し、上方が動物極 (A: Animal pole) で下方が植物極 (V: Vegetal pole) を表す。e および e', e'' はそれぞれマージ画像、微小管のシングルチャンネル、ER のシングルチャンネルを示す。(f) Noco 処理を行なった 45 mpf 卵における ER (赤) と ミトコンドリア (青) および *macho-1* (緑) の同時染色像。図は正中面における光学切片を示し、上方が動物極 (A: Animal pole)、下方が植物極 (V: Vegetal pole)、右側が後極 (Pos) を表す。矢尻は *macho-1* のシグナルを指す。Scale bar=50 μ m。(f',f'',f''') f の dense ER 領域の拡大図。f' と f'', f''' はそれぞれ、マージ画像と ER 領域の輪郭 (赤線) と *macho-1* のシグナル、およびミトコンドリアと重ね合わせた画像を示す。Scale bar=10 μ m。(g) Fig.5-8 と同様に *macho-1* mRNA 総面積に対する dense ER 領域内の *macho-1* mRNA のシグナル面積の比率を算出することにより、*macho-1* mRNA の dense ER への局在性を定量的に評価した。(h) 定量結果は箱ひげ図で示した。各プロットは計測した卵に相当する。解析したサンプル数は DMSO、CytB_04、Noco で、それぞれ 6 個ずつである。統計的有意性は、一元配置分散分析に続く Dunette's 検定により DMSO 群との優位差を解析した (*: p<0.05)。
[from Goto et al., 2022]

6-3-4.1 細胞期における CytB 処理が体軸形成へ与える影響を解析

次に、1 細胞期における CytB 処理が、前後軸形成に対してどのような影響を及ぼすのかを解析した。CytB 処理した卵を 32 細胞期で固定し、*in situ* hybridization により *macho-1* の染色を行った。DMSO 処理を行なった 32 細胞期胚では、*macho-1* は後極の 2 つの小割球 (B6.3) にそれぞれ存在する CAB 領域に局在しており、それぞれの割球に等しく分配されていることが観察された (Fig. 6-5a)。一方で、CytB 処理群では、各処理時期に応じて様々な異常な表現型が見られた。そこで、隣接する 2 つの割球にそれぞれ 1 つずつほぼ均等に *macho-1* の局在が見られる胚を前後軸が形成された胚として定義して解析を行なった。CytB_01 処理群の 3 分の 2 では、DMSO 処理群と同様に 2 つの小割球にそれぞれ *macho-1* が局在したが、*macho-1* シグナル領域および小割球の大きさは不均等であった (Fig. 6-5b)。一方、残りの 1/3 は、隣接しない割球間において *macho-1* の局在がみられ、明確な後極は確認されなかった (Fig. 6-5b')。CytB_02 処理群では、最も顕著な影響を受けており、ほとんどの胚において隣接する割球にそれぞれ *macho-1* の局在が見られるものの、発生が著しく遅延し、不均等な割球を持つ異常な卵割を行っ

ていた (Fig. 6-5c)。また、胚の 4 分の 3 では隣接した 2 つの割球に渡り連続的な 1 つの細長いシグナルとして *macho-1* が検出された (Fig. 6-5c')。CytB_03 処理群の過半数では、小さな割球が見られず等割した割球 2 から 3 個において *macho-1* の局在が検出され、明確な前後軸を有する胚は観察されなかった (Fig. 6-5d, d')。CytB_04 処理群における半数の胚では、対称性が著しく乱れた卵割様式を示すが、2 つの割球がそれぞれ不均等に *macho-1* の局在を示した (Fig. 6-5e)。一方、残りの半数の胚では、同様に対称性が著しく乱れた卵割様式を示し、かつ 1 つの *macho-1* の局在が 1 つの割球に存在する形質を示した (Fig. 6-5e')。次に、これらの胚において *macho-1* および ER、ミトコンドリアを染色することで、小さな割球を生み出す不等卵割に必要な CAB の形成を確認した。DMSO 処理群では、CAB 形成領域において、*macho-1* と dense ER が共局在していた (Fig. 6-6a, a')。CytB 処理群においては、全ての処理において *macho-1* と dense ER の分布が乱れるものの、これらは共局在しており CAB 形成が正常に行われたことが示唆された (Fig. 6-6b-g, b'-g')。以上の結果から Fig.6-5 で確認された前後軸形成の異常は、CAB の分布異常や完全な機能を発揮するためのいくつかの因子が欠如することによるものであることが示唆された。

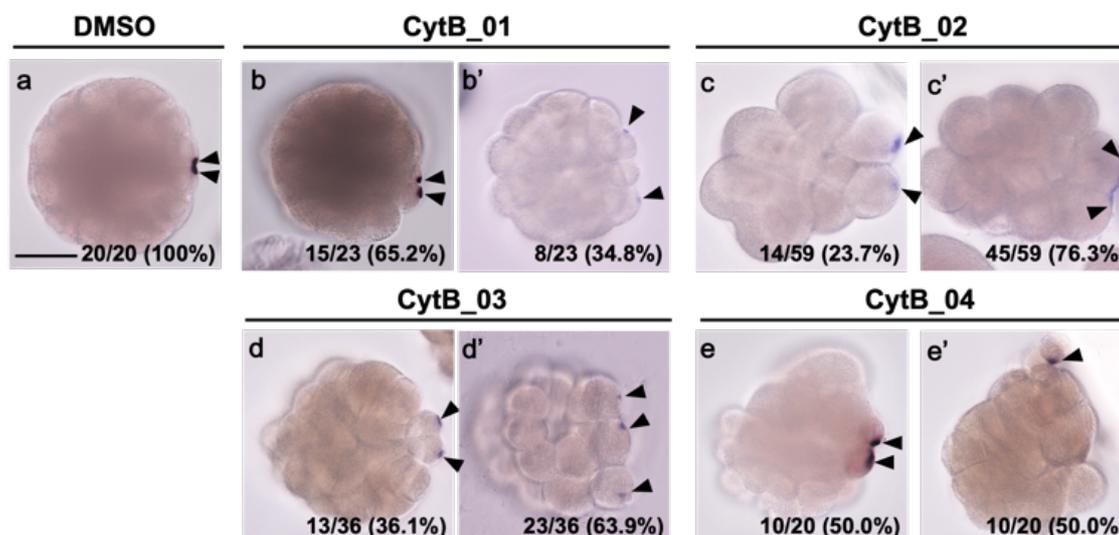


Figure 6-5. 1 細胞期における CytB 処理が *macho-1* の局在および前後軸形成に与える影響

(a-e, a'-e') 1 細胞期に各処理を行なった後に発生させ、32 細胞期 (受精後約 3 時間) で固定し、in situ hybridization により *macho-1* を染色した後に透過光観察により画像を取得した。図上のラベルは Fig.6-2 に示したサンプル群を明記している。矢尻は *macho-1* の局在を指す。右下の数値は、各図中の胚と同様の影響が見られる胚の数およびパーセンテージを示している。a-e にはそれぞれの群において *macho-1* の局在が正常に近い胚の代表例を、a'-e'には *macho-1* の局在および卵割様式に著しい影響が見られた胚の代表例を示した。Scale bar = 50 μ m. [from Goto et al., 2022]

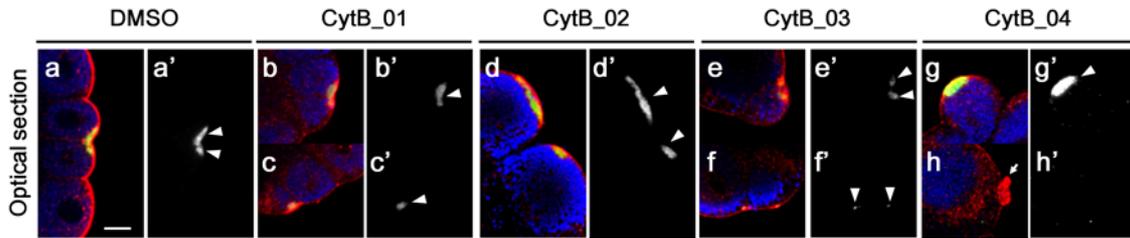


Figure 6-6. 1細胞期における CytB 処理が CAB 形成に与える影響

(a-h, a'-h') 1細胞期に各処理を行なった後に発生させ、32細胞期（受精後約3時間）で固定し、ER（赤）とミトコンドリア（青）および *macho-1*（緑）の同時染色像を取得した。図上のラベルは Fig.6-2 に示したサンプル群を明記している。矢尻は *macho-1* の局在を指す。a-h は *macho-1* 局在周囲の拡大図を示し、h は異常な ER の局在周囲の拡大図を示した。a'-h' は a-h における *macho-1* のシングルチャンネルを示す。Scale bar = 50 μm。[from Goto et al., 2022]

最後に、1細胞期に CytB 処理することによる一連の異常が形態形成にどのような影響を及ぼすかを確認するために、幼生の表現型を観察した。DMSO 処理群では、頭部と長い尾部から成るオタマジャクシ様の正常な形態をしている (Fig. 6-7a)。一方で全ての CytB 処理群において、幼生は二種類に大別される異常な形態を示した (Fig. 6-7b-e, b'-e')。1つ目の表現型では、頭部と尾部が形成され前後軸を有しているが、尾部の縮小や頭部の未発達などの異常が見られた (Fig. 6-7b-e)。この表現型を示す幼生の割合は、CytB_01、CytB_02、CytB_03、CytB_04 でそれぞれ約 57.8%、24.2%、44.3%、54.7% であり、32細胞期胚で見られた比較的正常に近い胚の比率に近いことが示唆された (Fig. 6-7b-e)。もう一方の表現型では、表皮系の発達を示唆する被囊の分泌やわずかな対称性は有するものの、

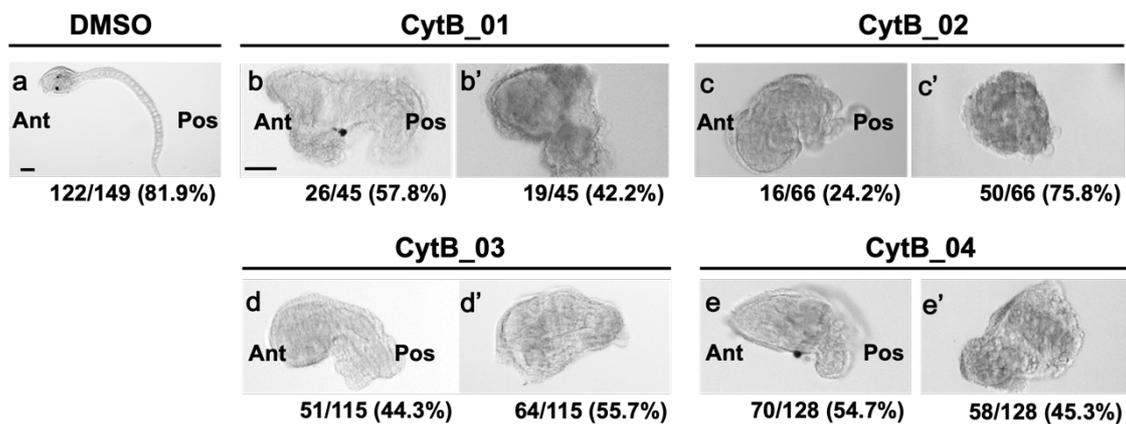


Figure 6-7. 1細胞期における CytB 処理が幼生の表現型に与える影響

(a-e, a'-e') 1細胞期に各 CytB 処理を行なった後に発生させ、幼生（受精後約18時間）で固定し、透過光観察により画像を取得した。図上のラベルは Fig.6-2 に示したサンプル群を明記している。a-e の図中の左右はそれぞれ前極 (Ant) と後極 (Pos) を指す。右下の数値は、各図中の幼生と同様の影響が見られた幼生の数およびパーセンテージを示している。a-e にはそれぞれの群において前後軸が正常に近い幼生の代表例を、a'-e' には明確な前後軸が見られない幼生の代表例を示した。Scale bar = 50 μm。[from Goto et al., 2022]

明確な頭部と尾部は観察されず、細胞塊に近い形態を示した (Fig. 6-7b'-e')。これらの胚は、32 細胞期胚において前後軸形成が行われなかった胚から発生したものであると考えられる。

6-4. 考察

これまでの研究で、細胞質再配置はアクチン依存的な第 1 細胞質再配置および微小管依存的な第 2 細胞質再配置として個々には理解されてきたが、アクチン繊維から微小管への移り変わりなど移行時期に関してはほとんど無視されてきた。また myoplasm の移動に関しても、その領域に存在する ER やミトコンドリア、母性 mRNA の詳細な挙動は明らかにされておらず、本研究にて初めてこれらが別々のメカニズムで移動していることを報告した。したがって、細胞質再配置には依然として未知のメカニズムが存在していると考えられる。まず、本章ではアクチン繊維観察の改良により、アクチン繊維が第 1 細胞質再配置終了後も第 2 細胞質再配置開始まで植物極で局在し続けることを明らかにした (Prolonged F-actin accumulation)。また、第 1 細胞質再配置および Prolonged F-actin accumulation の機能を CytB 処理により解析した結果、これらのアクチン繊維の局在が第 2 細胞質再配置において重要であることが示唆された。第 1 細胞質再配置 (0-10 mpf) または Prolonged F-actin accumulation (10-30 mpf) のどちらかを阻害すると微小管構造である CAMP の形成に異常が見られた。この異常は CAMP の正中線領域への収束の阻害である。したがって、アクチン繊維の役割として第 1 細胞質再配置に加え CAMP 形成の制御が本研究により示唆された。

本章では、興味深いことに顕著なアクチン繊維の集積が見られない第 2 細胞質再配置においても CytB 処理は CAMP 形成に影響を及ぼし、さらに dense ER からの *macho-1* の解離を阻害した。また、微小管重合阻害剤である Nocodazole 処理においても dense ER からの *macho-1* の乖離が阻害されたことから、第 2 細胞質再配置においても微小管とアクチン繊維は何らかの相互作用を有しており、母性 mRNA の局在を制御している可能性が示唆された。体細胞においてアクチン繊維が、微小管の細胞表層への局在や伸長方向を制御していることが報告されている (Dogterom and Koenderink, 2019)。また、CAMP は分裂装置とは異なり中心体を持たない中心体非依存的な微小管構造体であり、一般的な微小管構造の理解とは少し異なる部分もある。しかし、中心体非依存的な微小管構造においても、アクチン繊維が spectraplakins (ACF7; 微小管とアクチン繊維の両方に結合して細胞骨格を架橋するタンパク質) と微小管マイナス端結合タンパク質 (CAMSAP3: calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3) を介して構造形成の制御をしていることも報告されている (Noordstra et al., 2016)。したがって、こ

れら細胞骨格関連分子に対する解析を行うことで、アクチン繊維による CAMP 形成の分子制御機能がより確かなものとなることが期待される。本研究で各段階における細胞質再配置におけるアクチン繊維の役割を明らかにすることができた。今後、第 1 から第 2 細胞質再配置への移行を含め *myoplasm* の移動を理解する上で、細胞骨格とオルガネラ、mRNA の動態を詳細に解析し、それらの相互作用や関連する分子の存在を明らかにすることで細胞質再配置を分子レベルで理解することが期待できる。

1 細胞期におけるアクチン繊維の阻害は CAMP の形成阻害に加え、*macho-1* の局在にも影響することで胚の前後軸の欠失をもたらした。CytB 処理による異常胚において CAB の形成は認められたが、正常な不等卵割は行われず、その機能が損なわれていると考えられる。この要因として、1 細胞期において後極に *myoplasm* が適切な領域に配置されなかったため CAB 形成に必要な要素の異常な分配が行われ、CAB の機能に重要な要素の欠失や分布異常が起きたことが示唆される。したがって、アクチン繊維が細胞質再配置の全体を通して前後軸形成に寄与していると考えられる。以上より、第 1 から第 2 細胞質再配置間の細胞骨格間相互作用や *myoplasm* 内でのオルガネラや mRNA の複雑な挙動など本研究の成果は、より詳細な視点で細胞質再配置を理解したものであり、これらの成果はこれまで不明瞭であった分子メカニズムの理解につながる端緒となる重要な研究であると意味づけられる。

第7章 結果のまとめ

本章では、これまでに報告されている知見と本研究で得られた新たな知見を交えながら細胞質再配置全体に関して、用語の整理や発生の時間軸を考慮しながら論述する (Fig. 7-1)。

・未受精卵

ホヤの未受精卵では、myoplasm が動物極付近のごく一部を除く表層領域全体において、放射相称に存在する (Prodon et al., 2006)。myoplasm はミトコンドリアに富んだ細胞質領域 (MRC) と MRC の表層領域に存在する ER 領域から構成される (Sardet et al., 2005)。この ER には、母性 mRNA である postplasmic/PEM RNAs (Type I) が局在している (Prodon et al., 2007)。第5章では初めて全載標本 (卵全体の試料) において、未受精卵の MRC および ER (dense ER)、dense ER と共局在する Type I mRNA を同時にかつ高精細に記載した。一方で、Type II mRNA についても記載しており、Type II mRNA は Type I mRNA とは異なり、明確な局在を示さないことを示している。また、第3、4章において新規微小管構造の1つである微小管メッシュワーク DEM が未受精卵で存在することを記載した (Fig. 7-1)。この DEM は減数分裂装置を除き、卵表層から中心に向かって 15-20 μm の厚さ均一に存在する密なメッシュワーク構造であることを示した。

・第1減数分裂期

受精後、 Ca^{2+} ウェーブが生じることで減数分裂の再開やアクチン繊維の再構成などの卵の賦活化が見られる。第4章にて、 Ca^{2+} ウェーブが引き金となり DEM が第1減数分裂期終了までに崩壊することを示し、このことから DEM の崩壊が Ca^{2+} シグナルにより制御されていることが推察された (Fig. 7-1)。一方で、 Ca^{2+} シグナルは植物極表層におけるアクチン繊維の集積を制御する (Yoshida et al., 2003)。これにより卵全体が植物極に向かって収縮する Cortical contraction や myoplasm の植物極への移動 (第1細胞質再配置) が完了する (Chiba et al., 1999; Roegiers et al., 1999)。第4、6章において、このアクチン繊維の働きが第1細胞質再配置だけでなく新規微小管構造である TAF や CAMP の形成を制御していることを記載した。また第5章にて、第1細胞質再配置により植物極へ移動した myoplasm 内では dense ER がより厚みを持って存在することを示した。さらにこの際、未受精卵と同様に Type I mRNA は dense ER に局在するが、Type II mRNA

は明確な局在を示さないことも明らかにしている。

・第2減数分裂期

Ca²⁺シグナルにより抑制されていた MPF 活性が再び上昇することで、第2減数分裂期中期まで進行する。その後、MRF 活性は再度 MAPK 活性と共に Ca²⁺シグナルにより抑制されることで第2極体を放出し、Interphase へと移行する (Sensui et al., 2012; Levasseur et al., 2013; Fig. 7-1)。また、この期間は、第1細胞質再配置から第2細胞質再配置へと移行する遷移期である (Sardet et al., 2005)。第3章において Prophase II から Metaphase II にかけて一過的に植物極表層で微小管フラグメントの集積 TAF が形成されることを記載した (Fig. 7-1)。Metaphase II から Telophase II にかけて精子星状体は非常に発達しながら後極まで移動する。この星状体の発達や移動には MAPK 活性の十分な抑制が必要であることを第4章で示した。また第6章にて、第1細胞質再配置で植物極に集積したアクチン繊維が第2細胞質再配置開始まで局在し続けることを記している (Prolonged F-actin accumulation)。さらに第1細胞質再配置で植物極に集積したアクチン繊維と同様に、Prolonged F-actin accumulation が CAMP の形成を制御していることを明らかにした。一方、myoplasm は植物極での局在を維持していることが観察されたが、dense ER がより細胞質側へと広がることで分厚いドメイン構造を形成することを第5章に記している。さらに、Type I mRNA が dense ER から乖離し、MRC へと移行することも明らかにしている。一方で、Type II mRNA は myoplasm 内への集積を始めることが示された。

・前核形成期 (Interphase)

前核形成期では、減数分裂を終えた雌の染色体が前核を形成し、雄性前核と融合する (Sardet et al., 2005)。この前核融合のため、後極に位置する雄性前核および精子星状体は表層側から卵中心へと進入する。第3章では、この時期に形成される発達した表層の微小管構造 CAMP の存在を記した (Fig. 7-1)。また、第4章において以下のような CAMP の一連の動態を記載した。前核が形成される前核形成期から移行期にかけて、植物極表層で微小管バンドルが形成され始める。前核融合期に、もっとも発達した構造を示し、後極から植物にかけて微小管バンドルが並んだレール様の構造が形成される。特に赤道付近の正中線領域ではより太いバンドルが密に配列する。その後、体細胞分裂期において赤道付近の正中線領域を除く微小管バンドルは消失することで CAMP の領域は縮小し、Metaphase において CAMP は消失する。以上の知見から、CAMP は比較的広い

領域に形成された表層の微小管バンドルであり、方向性を持って限局された後極領域に向かって収束する微小管構造であると理解することができる。一方、myoplasmはこの期間に植物極から後極へと移動する(第2細胞質再配置)。CAMPはdense ER領域に形成されることを第5章で記しており、dense ERの移動にはCAMPが寄与していることが考えられる。さらにこの際、dense ERの微細構造はネットワーク構造からcisterna様構造へと一過的に変化する。一方で、MRCやMRC内に局在するType IおよびII mRNAはCAMPから離れて局在するが、dense ERと同時期に後極へと移動する(Fig. 7-1)。本研究では、卵の賦活化を制御するシグナル分子がCAMPの形成を制御していることを示す知見を得ている。MAPK活性がCAMP形成を負に、Interphase Cyclin/Cdkの活性が正にCAMP形成を制御していることも明らかにしている。さらに、その下流にはモータータンパク質であるDyneinがCAMP形成を制御していることが示唆されている。一方で、アクチン繊維によるCAMP形成制御に関するいくつかの重要な知見も得ている。上述のように、第1細胞質再配置におけるアクチン繊維の集積または植物極に局在した何らかの因子により、CAMP形成領域(左右方向と動植物軸方向)および微小管バンドルの配向性が制御されていることを明らかにした。また、Prolonged F-actin accumulationがCAMP形成領域(左右方向)を制御し、前核形成期では明確なアクチン繊維の局在は見られないものの、微小管バンドル形成に重要であることを明らかにした(第6章)。

・卵割期

体細胞分裂期(卵割期)へと移行したホヤ胚では、8細胞期までは等割が行われるが、8細胞期以降、植物半球の最も後極に位置する2つの割球でのみ3回の連続する不等卵割が生じる(Conklin, 1905)。この不等卵割には、dense ERや母性mRNA、微小管関連タンパク質などから構成されるCAB(Centrosome Attracting Body)が分裂装置を牽引することが重要だとされている(Nishikata et al., 1999; Sardet et al., 2005; Costache et al., 2017)。このように卵割期においてCABの形成が正常な卵割に必須であることが知られている。本研究では、第5章にて第2細胞質再配置の間にCABの構成要素である母性mRNAがdense ERから解離していることを明らかにしている。第5章ではさらなる解析により、2細胞期の分裂期に再び母性mRNAとdense ERは表層領域で共局在することも明らかにした。その後、卵割の進行に伴い母性mRNAとdense ERは卵割面で集中することとなり、CABが形成されることを明らかにした。

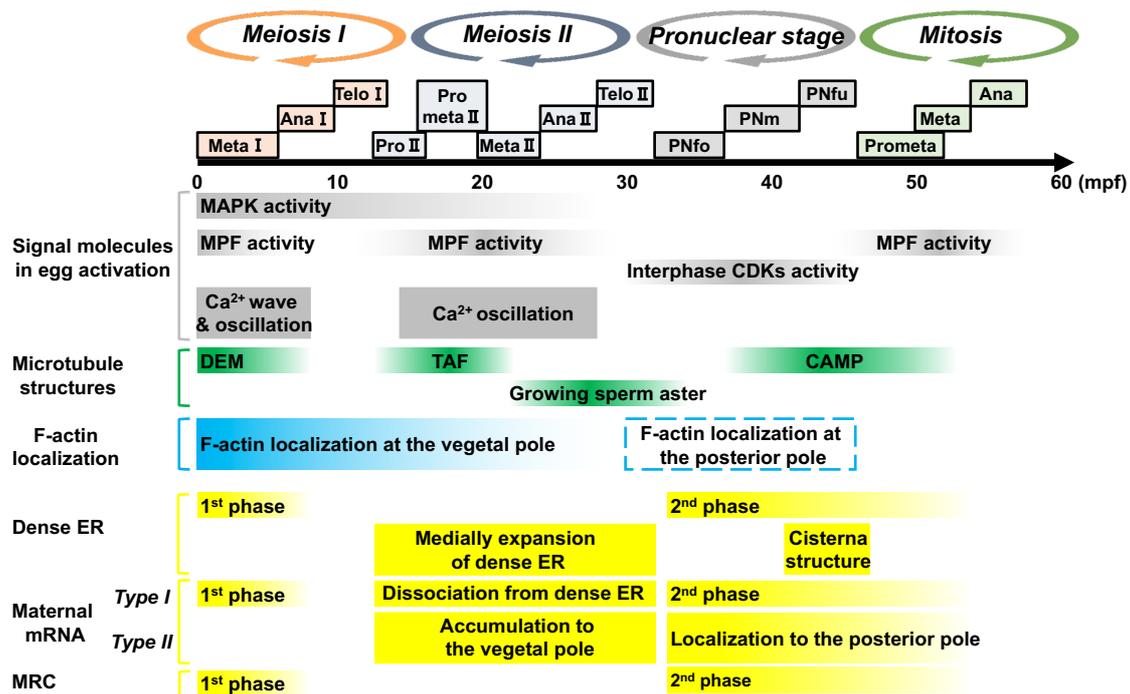


Figure 7-1. 本研究より得られた知見の時系列情報を示す模式図

受精後、 Ca^{2+} ウェーブやオシレーションにより Ca^{2+} シグナルが活性化されることでMPF活性が抑制され、第1減数分裂が進行する。 Ca^{2+} シグナルはさらにDEMの崩壊やアクチン繊維の集積を誘導する。このアクチン繊維の集積により、dense ERやtype I mRNA、MRCは植物極へと集積する（第1細胞質再配置）。その後、MPF活性の再活性化により第2減数分裂期へと進行する。この第2減数分裂期では、TAFの形成や精子星状体が発達する。また、第1細胞質再配置で集積したアクチン繊維の局在は維持されている。さらにmyoplasm内ではdense ERのドメイン構造が形成され、type I mRNAの乖離やtype II mRNAの集積など母性mRNAの局在が変化する。 Ca^{2+} オシレーション series 2によるMPFやMAPK活性の抑制とInterphase CDKs活性の活性化により減数分裂期から前核形成期へと移行する。前核形成期では、CAMPの形成やdense ERおよびMRC、type I mRNAの後極への移動が行われる（第2細胞質再配置）。この際、dense ERは一過的にメッシュワークからCisterna様構造へと微細構造を変化させながら移動する。Type II mRNAに関しても第2細胞質再配置終了後に後極で局在する。また、アクチン繊維は顕著な局在は見られないものの、CAMPの形成を制御する。その後再びMPF活性が活性化することで、体細胞分裂が進行する。

第 8 章 総論

ホヤの細胞質再配置は発見から約 1 世紀の間、“アクチン依存的な第 1 段階と微小管依存的な第 2 段階により myoplasm の後極への移動が完了する”という概念的な理解に留まっていた。一方で本研究から得られた知見は、細胞骨格やオルガネラ、母性 mRNA の時空間的な情報やそれらの相互作用をより精細な視点で解析したものであり、ホヤ細胞質再配置を分子レベルでより詳細に解析する際に不可欠な基本情報となるものである。特に、新規微小管構造の存在やアクチン繊維の新しい機能、母性 mRNA やオルガネラの複雑な局在パターンなど新たな分子メカニズムの存在を本研究により明示した。これらの知見から私は、ホヤの 1 細胞期において以下のような Translocational Machinery の存在とその制御機構を提案する。

8-1. Microtubule domain

微小管は、全ての真核細胞で高度に保存された細胞骨格であり、多様な形態を示し、多岐にわたる細胞機能を果たす。例えば、細胞質分裂で働く放射状の微小管構造である星状体や、神経細胞の軸索における小胞輸送に見られるような微小管が配列したレール様構造が挙げられる (Lasser et al., 2018; Vukušić et al., 2019)。これらの例を含む多くの微小管構造は、高度に配向した微小管を足場にモータータンパク質が駆動力を生み出すことで染色体の分配や物質輸送を行う (Lasser et al., 2018; Vukušić et al., 2019)。本研究では、細胞質再配置において 3 つの新規微小管構造 DEM、TAF、CAMP を発見している。CAMP は微小管が高度に配向したレール様構造であるが、DEM や TAF ではランダムに配向する微小管が比較的高密度に局在した構造であり、前述のような高度に配向した微小管を有する一般的な微小管構造とは全く異なる形態の構造である。微小管構造は機能と構造が密接に関係ことから、新規構造体である DEM や TAF は未知の機能を有していることが期待される。さらに、CAMP を含めた 3 つの構造は、卵という一つの細胞内で 1 時間にも満たない短期間のうちに形成、消失する劇的な微小管ダイナミクスを示す。そのため、各構造の消失後においても、そこには豊富な微小管や微小管制御因子などの分子群がまとまりを持って存在すると考えられ、様々な分子の局在制御や後続の微小管構造形成に必要とされる分子の供給を行うなどの機能を有していると考えられる。そこで本章では、このような微小管が高密度で局在する特徴的な構造を“Microtubule domain”とし、DEM や TAF はそれに属するものとしてその機能や制御に関して後述する。

8-2. 細胞質再配置における Microtubule domain の機能

Microtubule domain としての DEM は、未受精卵において動物極付近を除く卵表層全周に 15-20 μm の厚さで存在するメッシュワーク構造であり、その表層側は、myoplasm の未受精卵での局在領域に一致する。また受精後 myoplasm は、第 1 細胞質再配置が終了する受精後 5 分までに表層の actin contraction によって卵の植物極に集められるが、DEM はその後、受精後 10 分までの間に消失する。これらのことから、DEM は myoplasm の第 1 細胞質再配置が卵表層でのみ起こるよう領域を限局化するための内部支持構造として存在していると考えられることができる。もし、myoplasm が水の様に粘性が低く、第 1 細胞質再配置がもっと高速で起これば、慣性の法則が働き、myoplasm のみが移動することも考うることであるが、粘度の高い細胞質ゲルの myoplasm のみが数分かけて移動する運動では、動かない卵内部の細胞質とその表面を滑るように動く myoplasm の間には、何らかの明確な境界面が必要であり、内部の細胞質が myoplasm とは異なる何らかの堅さを持つことが必要だと考えられる。そういった第 1 細胞質再配置の移動を支える支持構造を微小管のメッシュワーク構造として実現させているのではないかと考えている。さらに、DEM は Microtubule domain として、そこには多様な微小管を制御する因子群も存在しているはずであり、消失後も次の微小管構造形成に寄与していることが予想される。例えば、当研究室では、未受精卵を Paclitaxel で処理して微小管の脱重合を阻害した際、DEM の構造はその領域で Cytoplasmic Aster (CA) と名付けられた星状体様構造へと変化するという知見を得ている (未発表・私信)。このように DEM は柔軟に構造変化を起こすことが可能な微小管構造であり、DEM 由来の豊富な微小管や微小管制御因子が、TAF や CAMP など DEM 崩壊後の微小管構造の形成に寄与していることが考えられる。

TAF は Prophase II から Metaphase II において、一過的に植物極表層で形成される微小管フラグメントの集積である。TAF は MRC の領域内で形成されるが、その形成領域は MRC の領域よりも狭く植物極により限局された局在を示す。TAF の形成、消失と同時期には、dense ER が表層からより細胞質側へと進入することで分厚いドメイン構造を形成する。また、Type I mRNA が dense ER からの乖離し、Type II mRNA が植物極へ集積し始めることも観察されている。微小管が ER や mRNA の移動や局在を制御していることが報告されており (Kloc and Etkin, 1998)、TAF が足場となることで dense ER の細胞質側への移動や postplasmic/PEM RNAs の局在に寄与していることが考えられる。また、postplasmic/PEM RNAs は MRC へ移行した後に、第 2 細胞質再配置の間もその局

在を維持しながら後極へと移動する。ドメイン構造である dense ER から乖離した mRNA は、別のドメインにより局在を維持されなければ細胞質が大きく動く第 2 細胞質再配置の間、その局在は非常に不安定なものになると考えられる。Microtubule domain である TAF は形成、崩壊しながらも、mRNA が局在するための保持の役割を担い、第 2 細胞質再配置の間も mRNA の局在が維持されていると考えられる。また精子は、第 1 細胞質再配置の actin contraction によって植物極近傍に移動させられており、TAF に接するような位置で精子星状体が形成される。Metaphase II 以降、植物極では精子星状体の急速な発達や CAMP の形成がおこなわれることから、これら微小管構造形成のための微小管供給源として形成されていることも予想される。以上のように、DEM や TAF は Microtubule domain として myoplasm 内のオルガネラあるいは母性 mRNA の局在や移動の制御し、また、構造崩壊後も次の微小管構造形成のための分子を供給する役割も担っており、これらは微小管構造がもつ新しい機能の発見であると考えられる。後節ではさらに、第 2 減数分裂期にまで残存するアクチン繊維の局在である Prolonged F-actin accumulation と TAF との関わりについても論述する。

8-3. CAMP の機能

第 2 細胞質再配置で myoplasm は、微小管依存的に後極への移動を完了する。この際、新規微小管構造 CAMP が dense ER 内で形成されることを明らかにした。しかし、CAMP がどの様にして dense ER を後極へ輸送しているか、その明確なメカニズムの理解には至っていない。CAMP は第 2 細胞質再配置という短期間において比較的広い領域に形成された表層の微小管バンドルが、方向性を持ってより限局された領域に向かって収束する動的な微小管構造である。これらのことを鑑みると、微小管バンドルと dense ER が何らかの形で結合し、それぞれのバンドルがモータータンパク質を駆動力にして後極へと輸送されることで dense ER が後極へと移動するメカニズムが予想される。一方で、MRC や母性 mRNA は CAMP から離れているにも関わらず同時期に後極へと移動する。このメカニズムに関しても、移動のタイミング等が dense ER の移動と一致することから CAMP が生み出す表層での力に依存して myoplasm 全体として移動していると予測される。その根拠として、前述のように myoplasm はミトコンドリアと ER が中間系フィラメントによりドメイン化された構造(まとまりを持った構造)であることが報告されている (Jeffery, 1995)。また、第 5 章において dense ER から MRC 内に向かって伸びた Loosely extended ER の存在を記している。したがって、中間系フィラメントあるいは ER が MRC 内に配向することで、MRC と dense ER はある程度まとまりを持って移動することが可能であると予想される。さら

に、第1細胞質再配置においてもアクチン繊維は表層に存在しており、dense ERよりも内側に広がるMRCとは直接的に接触していないものの、dense ERと同様に植物極へと移動することから (Chiba et al., 1999; Roegiers et al., 1999; Prodon et al., 2005)、ホヤ卵細胞質内で一貫してmyoplasm全体をまとめる何らかのつながりがあるものと考えられる。CAMPが生み出す力に依存してmyoplasm全体が移動していることが立証された場合、myoplasmの移動の駆動力は常に表層で生み出されていることとなる。したがって、微小管やアクチン繊維、さらに中間系フィラメントを含む細胞骨格とERやMRCとの間での相互作用を明らかにすることで細胞質再配置のより明確な理解につながることを期待される。

8-4. ホヤ卵における Translocational machinery の存在

これまでに、Microtubule domainであるDEMやTAF、あるいはCAMPの機能に関して論述した。本節では、細胞質再配置におけるこれらの構造の位置付けを総論する。DEMやTAF、CAMPは一過的にかつ逐次的に形成される。また、DEMやTAFにおいては、それらの構造の崩壊後もその領域にはチューブリン抗体による不明瞭な染色が見られることを明らかにしている。この不明瞭な染色は、発達した微小管繊維が乏しい一方で、チューブリンモノマーや微細な微小管断片が豊富に存在することを示していると考えられる。また、構造が崩壊することにより空間的に高い自由度がもたらされることが予想される。したがって、DEMやTAFは構造崩壊後も特定の領域で次の構造を作るために必要な分子のソースとして機能していることが考えられる。また、ショウジョウバエ卵の前後軸形成において、細胞質の微小管が細胞表層へと移行して高度に配向することで微小管構造を形成することが報告されている (Khuc Trong et al., 2015)、DEMがTAFを、さらにTAFが精子星状体やCAMPのような微小管が高度に配向した構造を形成する今回の観察との類似性を指摘することができる。さらに第6章では、第2細胞質再配置においてNocodazole処理を行うことにより、dense ER内にTAFやDEMの崩壊後と類似したチューブリン抗体による不明瞭な染色が見られることを示している。これらは、CAMPの由来がMicrotubule domainであるDEMやTAFであることを支持するものである。以上からMicrotubule domainは自身の分子を供給源としながら構造の形成と崩壊を繰り返しながら、最終的にはCAMPを形成する。これらの構造は常にmyoplasmと時空間的に密接な関係を示しており、それぞれの構造が特有の機能を持って細胞質再配置に寄与するものであると考えられる。このように、機能的かつ柔軟性を有したMicrotubule domainが、適切な領域で適切な時期に特徴的な構造を順次形成していくことで、それぞれ特有の機能を発現して最終的にmyoplasmを後極へと移動させる一連

の輸送機構を考えることができる。本研究では、この一貫した輸送機構を細胞質再配置における“Translocational machinery”として提案する (Fig. 8-1)。また、Translocational machinery には微小管だけでなく後述のようにアクチン繊維の役割も重要であると考えられる。

未受精卵あるいは第 1 細胞質再配置中においては、myoplasm がアクチン繊維と相互作用を持っていることが単離表層や阻害剤を用いた実験から明らかにされている (Chiba et al., 1999; Roegiers et al., 1999; Prodon et al., 2005)。一方本研究では、第 1 細胞質再配置により TAF が形成されることやアクチン繊維が細胞質再配置全体を通して CAMP の形成領域や配向性を制御していることを明らかにしている。これらの知見は、Translocational machinery にはアクチン繊維が密接に関わっていることを示唆するものである。第 1 細胞質再配置以降、植物極におけるアクチン繊維の局在は発生と共進の進行と共に減衰し、第 2 細胞質再配置においてはその局在は認められなかった。一方で、Prophase II から前核形成期にかけて精子星状体の発達や TAF、CAMP の形成のように微小管の重合が逐次的に活発化する。したがって、第 2 減数分裂期は微小管とアクチン繊維の重合度合いが交差する時期であると見ることができる。この時期は第 1 細胞質再配置と第 2 細胞質再配置の間にあたり、これまで myoplasm に関して特に明確な観察や記述はなされてこなかったが、この細胞骨格間の遷移状態に応じて myoplasm がアクチン繊維から微小管へ乗り移ると考えることで細胞質再配置の重要な時期として捉えることができる。

本研究で提案した Translocational machinery は、“アクチン依存的な第 1 段階と微小管依存的な第 2 段階により myoplasm の後極への移動が完了する”といった細胞質再配置のこれまでの概論的な理解から分子メカニズムの理解へと飛躍させるものである。Translocational machinery では、アクチン繊維や逐次的に様々な形で形成される微小管構造など複数の細胞骨格成分が連続的にかつ特異的な機能を発現する (Fig.8-1)。これにより myoplasm 内の個々のオルガネラや mRNA が輸送されることで、巨大な細胞である卵の中で細胞質という境界が不明瞭である塊が短時間で適切な場所に移動することを可能にする。この Translocational machinery は、これまで培養細胞などで考えられてきた物質輸送とは全く異なる大規模で複雑な様式と考えられ、細胞質再配置の理解が進むことは、細胞内物質輸送に関する新しいメカニズムの発見にもつながると期待される。

8-5. Translocational Machinery の制御系

本研究で提案した複雑な物質輸送である Translocational Machinery は、どのように制御されているのか？この問いに対して総論する。前述のように第 1 細胞

質再配置に関しては、先行研究から卵の賦活化を制御するシグナル分子により制御されていることが明らかにされている (Yoshida et al., 2003)。一方で、第1から第2細胞質再配置への移行期(アクチン繊維から微小管への遷移)や第2細胞質再配置に関しては不明であった。前述のように、アクチン繊維から微小管への遷移および第2細胞質再配置はそれぞれ第2減数分裂期、Interphaseから体細胞分裂期において見られる現象である。そのため、第2減数分裂期から体細胞分裂期の間でのシグナル分子の活性変化が、アクチン繊維から微小管への遷移や第2細胞質再配置を制御していることが予想される。ホヤでは、第2減数分裂期から体細胞分裂期への移行期に見られるシグナル分子の活性変化としてMPFとMAPKの活性抑制が報告されている (Dumollard et al., 2011; Sensui et al., 2012)。また、他の動物卵では、Interphase Cyclin/CDK複合体の活性がこの時期に上昇することも報告されている (Longo et al., 2008; Kishimoto, 2018)。これらのシグナル分子はシグナル伝達における“Signal cascade”を引き起こすものであり、それぞれの下流には様々な分子が存在する (Errico et al., 2010)。また、それらの下流分子がアクチン繊維や微小管を制御していることも報告されている (Errico et al., 2010)。本研究では、このような背景から、CAMPとCyclin/CDK複合体またはMAPKとの関係を解析した結果、Interphase Cyclin/CDK複合体は正に、MAPKは負にCAMPの形成を制御することを明らかにした。以上から、Cyclin/CDK複合体およびMAPKは減数分裂期から体細胞分裂期への移行と並行して、myoplasmのアクチン繊維から微小管への乗り移りを制御していることが支持される。減数分裂期から体細胞分裂期への移行は卵から胚への移行であると考えられている。一方で、myoplasmのアクチン繊維から微小管への乗り移りは、後極へと移動することで胚軸を決定するためであり、上述の細胞周期の変化と同様に胚軸形成を行うものである。したがって、これら二つの現象は共に“卵から胚への移行”を意味するものであり、卵の賦活化を制御するシグナル分子はこれらのMaster regulatorとして働いているとすることができる。

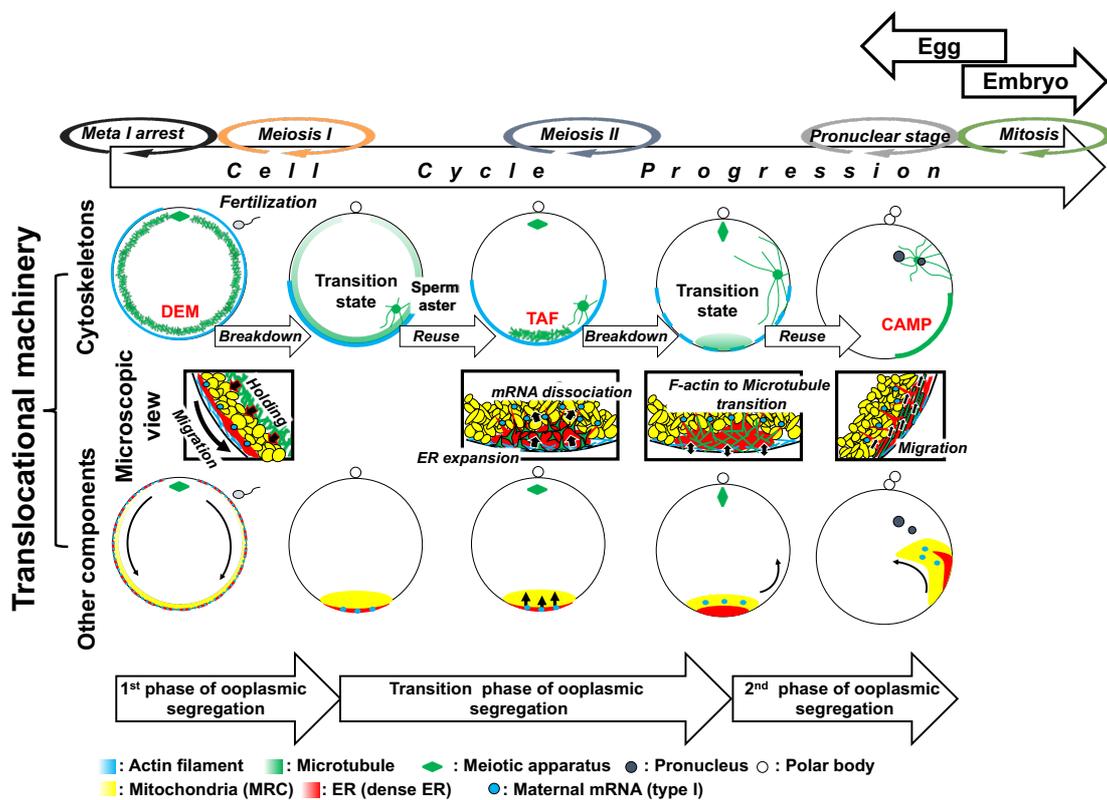


Figure 8-1. 本研究で提案した Translocational machinery と細胞質再配置の模式図

8-6. 胚軸決定メカニズムの種間共通性

ホヤの細胞質再配置による胚軸決定メカニズムと他の動物卵における胚軸決定メカニズムと比較することにより、胚軸決定の種間共通性に関して考察する。特に、ホヤと同様に1細胞期で微小管依存的な胚軸決定が行われるカエル (*Xenopus*) と硬骨魚類であるゼブラフィッシュ (*Danio*) において、胚軸決定に関わる母性因子、および Translocational Machinery、その制御メカニズムに関して比較する。

・母性因子の共通性

Xenopus では *Wnt11* mRNA、Dishevelled protein、GSK3-binding protein (GBP)、*Danio* では *Wnt8a* mRNA、*Grip2a* mRNA、Syntabulin protein が背側に移動する母性因子として報告されている (Weaver and Kimelman, 2004; Lu et al., 2011; Nojima

分子を精査し、物質輸送の分子メカニズムを明らかにすることで、種間の共通性や違いを考える上で重要な知見を得られることが期待される。

・ Translocational Machinery の制御メカニズムの共通性

前項で論述したように母性因子を輸送する微小管構造は非常に保存性が高いものである。これらの構造は形態だけでなく形成時期に関しても共通性をもつ。ホヤと *Xenopus* においては減数分裂終了後の Interphase、*Danio* では第一卵卵割前に形成されることが報告されている (Houliston and Elinson, 1992; Tran et al., 2012)。したがって、*Xenopus* や *Danio* においても、ホヤと同様に卵の賦活化を制御するシグナル分子により微小管構造の形成が制御されている可能性が考えられる。また、*Xenopus* や *Danio* において、ホヤの第 1 細胞質再配置のようなアクチン繊維の局在やアクチン繊維が微小管構造の形成に重要であることは報告されていない。一方で、*Xenopus* においては中間系フィラメントの一種であるサイトケラチンが表層で微小管構造付近に局在することが報告されている (Houliston and Elinson, 1991)。したがって、相互作用する細胞骨格の種類は異なるものの、細胞骨格間相互作用により微小管構造の形成が制御されていることが期待される。以上のように、1 細胞期における表層微小管構造の形成やその制御メカニズムには種間共通性が見出される。一方で、微小管構造に輸送される母性因子やその輸送様式には一部共通性が見られるものの非常に多様性がある。このような胚軸決定の多様性や共通性の理解は、生物の進化を考えるうえで非常に重要なものとなる。

8-7. 母性 mRNA の発現制御

母性因子が正常に機能するためには前述のように適切な位置に局在することが重要である。また、母性因子が mRNA である場合は適切な時間に翻訳され機能発現することも重要であり、逆説的には、翻訳が必要な時間まで安定化および翻訳活性の抑制が必要である。つまり、ホヤの母性 mRNA が正常に機能するためには上記二点に関して厳密に制御されることが重要であると考えている。すでに前者の母性 mRNA の時空間制御に関しては Translocational machinery が重要であることを述べており、本節では後者の翻訳制御に関して論述する。本研究で、Type I mRNA は第 2 細胞質再配置から第 2 卵割まで一過的に dense ER から乖離することを明らかにしている (第 5 章)。この現象に関して、どのようなメカニズムで乖離するのか？なぜ乖離が必要であるのか？という問いを考察することで、ホヤの母性 mRNA の翻訳制御メカニズムに関して推論する。

まず、前者の乖離メカニズムに関して考察する。第2細胞質再配置まで Type I mRNA と Ribosome は dense ER に局在を示していることが報告されている (Paix et al., 2011)。したがって、Type I mRNA は翻訳開始複合体として dense ER 上に存在し、第2細胞質再配置までには、一過的にこの翻訳開始複合体が ER 膜から乖離することで、遊離の mRNA-Ribosome 複合体として局在していることが予想される。一方で、乖離メカニズムにはアクチン繊維および微小管が関係している (第6章)。分裂酵母の cER を含め ER の移動には微小管が関係していることが報告されている (Hermesh and Jansen, 2013)。また、カエルの卵抽出液を用いた実験では、星状体の発達に伴い ER が移動し、この移動にはアクチン繊維が関係していることも報告されている (Pelletier et al., 2020)。本研究から、Type I mRNA の乖離は精子星状体が著しく発達する第2減数分裂期から Interphase の間であることが示唆されている。さらに、dense ER から MRC 側へと伸びる連続的な Loosely extended ER について明確にしている。以上から、精子星状体の発達や移動に伴い Type I mRNA が局在する dense ER の一部分が Loosely extended ER として MRC 側に引き込まれていることも予想される。

一方で、乖離する理由に関しては、確定的な知見を得ることに至っておらず、不明のままである。そのため、ここでは乖離する理由を先行研究から組み立てた以下の3つの仮説に基づいて推論する。

- ・ mRNA が MRC 側で翻訳されていることで、何らかの機能を発現している。
- ・ ER と mRNA の結合が ER の移動に対する何らかの障害となっている。
- ・ mRNA が後極へ移動する間に翻訳が抑制されることで、翻訳産物の局在がより局所なものとなる。

まず1つ目の仮説に関して論述する。Type I に属する *pem1* の翻訳産物は卵割期における分裂装置の回転に重要であることが報告されている (Negishi et al., 2007)。そこで、Type I mRNA は精子星状体近傍の MRC 側へと移動した後に翻訳されることで、精子星状体に関して何らかの役割を果たしていることが予想される。また、その場合 MRC 側への移動時には翻訳活性が高い状態であり、Type I mRNA が翻訳されていることが前提となる。第5章では、Type I mRNA は第2細胞質再配置までは dense ER と共局在し、dense ER と同様のネットワーク様の局在パターンを示す一方で、dense ER から乖離している間は顆粒状の局在パターンを示すことを記載している。この顆粒状の局在は、mRNA と結合する messenger ribonucleoproteins (mRNPs) などと複合体を形成し、液-液相分離 (Liquid-liquid phase separation: LLPS) によって RNP 顆粒を形成していることが予想される。RNP 顆粒は生体膜を有さないオルガネラとして存在し、RNP 顆粒内の mRNA の翻訳は抑制状態にあるとされている (Protter and Parker, 2016)。第2細胞質再配置における Type I mRNA や Type II mRNA の顆粒状の局在パターンは、細胞質

内の RNP 顆粒の観察像と酷似している (An et al., 2021)。また、ホヤの第 2 細胞質再配置において RNA 結合タンパク質である Y-box binding protein (YB1) が *pem-1* と共局在していることが報告されている (Tanaka et al., 2004)。YB1 は RNA histone と呼ばれ翻訳の抑制や RNP 顆粒の形成に関係していることも明らかにされている (Guarino et al., 2019)。したがって、第 2 細胞質再配置において母性 mRNA の翻訳活性は RNP 顆粒の形成に伴い抑制状態にあることが予想され、1 つ目の仮説が乖離の理由となる可能性は低いと考えられる。

2 つ目の説では、ER に mRNA が結合していることで第 2 細胞質再配置における ER の移動に何らかの形で障害となるため、一過的に乖離することを予測している。前述のように、dense ER の移動には微小管構造である CAMP が関わっていることを明らかにしている。そのため、dense ER が CAMP により移動するためには、ER 膜表面上の分子と微小管とが結合する必要がある (Gurel et al., 2014)。したがって、Ribosome や mRNA など巨大な分子がこの結合に対して立体的な障害になりうるということが予想される。第 2 細胞質再配置において、mRNA が dense ER から遊離状態で乖離あるいは Loosely extended ER と共に MRC へ移行することにより、CAMP の微小管が dense ER へアクセスし、結合できるような状態へと変化していることが考えられる。

3 つ目の説では、翻訳産物の局在がより限局されたものになるように、mRNA が後極へ移動する間に翻訳が抑制されることを予想している。前述のように、dense ER に局在する *pem-1* は第 2 細胞質再配置までに翻訳されている (Paix et al., 2011)。もし、第 2 細胞質再配置の間も dense ER 上に *pem-1* が局在し、翻訳されているのであれば、その翻訳産物の局在は移動の軌跡に従った広いものとなる。したがって、何らかの形で翻訳場となる dense ER から離れることで翻訳活性を抑制し、1 細胞期における翻訳産物の局在領域をより限局していると考えられる。その理由として、翻訳産物の局在領域や量は極めて厳密に制御される必要があることが挙げられる。例えば、*pem-1* は卵割期において分裂装置の回転を制御する (Negishi et al., 2007)。そのため、翻訳産物の局在領域や量が異常となり、分裂装置の方向性に乱れが生じると、卵割が異常となるため正常発生が行えないと考えられる。したがって、1 細胞期の適切な時期でのみ翻訳を開始させるメカニズムが存在していると考えられ、母性 mRNA の dense ER からの乖離はその役割を担っていると予想される。

第 2 細胞質再配置における Type I mRNA の乖離は、仮説 2 や 3 のように RNP 顆粒の形成あるいは何らかの形で翻訳抑制を受けつつ、遊離状態または Loosely extended ER と共に MRC へ移行することにより、翻訳産物の局在や dense ER の移動に寄与するものであると考えている。さらに、上述のように Microtubule domain が ER や母性 mRNA の局在を制御していると考えられることから、この

翻訳制御系には Translocational machinery との協調性があると考えられ、その相互作用にも興味を持たれる。

8-8. 本研究で得られた知見が他分野へもたらす影響の可能性

細胞質再配置は、巨大な細胞である卵の中で細胞質の塊が 1 細胞期という短時間で適切な場所に移動する現象である。本研究では、この移動は Translocational machinery により達成されることを提案した。Translocational machinery は、これまで培養細胞で考えられてきた物質輸送とは全く異なる大規模で複雑な様式であると考えられる。そのため、卵に特徴的な現象であると考えられる一方で、非常に壮大なスケールで行われる現象であることから、培養細胞のスケールでは発見に至らなかった未知の現象が顕在化されていることが期待される。また、オルガネラや mRNA、細胞骨格はホヤ卵に限らず全ての真核細胞で高度に保存されたものである。したがって、Translocational machinery と他の細胞で見られる現象との間で共通の分子メカニズムが存在していることが予想される。例えば、近年、一般的に知られる分裂装置の他に神経細胞の軸索伸長 (King et al., 2014) や上皮細胞の細胞極性維持 (Noordstra et al., 2016) などに関わる微小管構造の機能や形成メカニズムが注目されている。これらの構造は分裂装置とは異なり中心体を持たない中心体非依存的な微小管構造である。したがって、中心体非依存的な微小管構造の分子メカニズムを明らかにすることは様々な生命現象の理解につながることを期待されるが、未だ不明瞭な点が多いのが現状である。一方で、卵では前述のようにすでに古くから中心体非依存的な微小管構造としてレール様の表層微小管構造が発見されており (Elinson and Rowning, 1988)、その形成メカニズムや機能が明らかにされつつある (Weaver and Kimelman 2004)。また、体細胞 (Akhmanova and Yap, 2008; Tanaka et al., 2012; Dong et al., 2017) と卵 (Marrari et al., 2004; Cuykendall et al., 2009; Olson et al., 2015) において、それぞれの中心体非依存的な微小管構造では共通の分子が働いていることが報告されている。本研究では、ホヤ卵で発見した 3 つの新規微小管構造も中心体非依存的な微小管構造であることを明らかにしており (第 4 章)、Translocational machinery の分子メカニズム解明は多種の細胞における細胞骨格に依存的な生命現象の理解に貢献することが期待される。

8-9. 本研究で開発された可視化技術が他分野へもたらす影響の可能性

“百聞は一見にしかず“という言葉のように、生命現象の謎を明らかにするうえでバイオイメーキング手法による直接的な観測は必要不可欠である。2014 年に

ノーベル化学賞を受賞した超解像度顕微鏡の研究を筆頭に、イメージング手法の技術は日々進歩している。しかし、可視化技術（プローブや染色手法など）や観測するためのイメージング機器（顕微鏡、CT など）にはそれぞれの制約があり、依然として観測することに至らない生命現象も多く残されている。例えば、厚みのある試料では深部の情報を取得することが困難であり、一方で薄切試料では三次元情報を著しく損なうことになる。そこで近年、様々な透明化試薬が開発され、厚みのある試料においても深部まで観察することが可能となっている（Richardson and Lichtman, 2015）。しかし、厚みのある試料では抗体の浸透性が問題となり深部に存在する分子の標識が困難であるため、透明化試薬を用いた観察の多くでは抗体染色ではなく蛍光タンパク質の強制発現系や *Transgenic Animal* を試料として用いる。したがって、内在性分子の観察や複数分子の同時観察が困難となる。本研究で開発した可視化技術は、培養細胞とは異なり卵という不透明でかつ巨大な細胞を用いて、困難とされていた複数分子を同時に標識し、高精細に三次元観察することを可能とした革新的な技術である。また、開発した可視化手法は全て固定や染色、封入といった試料作製のプロトコルを改良したものであり、超解像度顕微鏡や多光子顕微鏡といった高度な顕微鏡を必要としないものであるためコストを要さない。この技術と透明化試薬を組み合わせることで、脳といった大きな組織全体や大きな固形腫瘍全体の標本など厚みのある組織試料において内在性分子の観察や複数分子の同時観察が可能となることが期待される。以上のように、可視化技術の改良を中心にした本研究における技術やそこから得られた知見は、ホヤの形態形成の理解だけに留まらず、様々な生命現象の謎や疾患の病理メカニズムの解明に貢献することも期待される非常に意義のある研究成果である。

謝辞

文部科学省ナショナル・バイオリソース・プロジェクト（NBRP）においてカタユレイボヤを提供していただきました、京都大学大学院理学研究科の佐藤ゆたか 准教授ならびに平山和子氏、東京大学大学院理学研究科附属三崎臨海実験所の吉田学 准教授ならびに幸塚愛氏、そしてご協力いただいた皆様に、深くお礼申し上げます。ホヤ飼育用の海水を提供していただきました神戸市立須磨海浜水族園の皆様に深く感謝致します。

東京工業大学大学院生命理工学研究科 立花和則 准教授には、卵の活性化に寄与するシグナル分子の活性についてご助言いただきました。深くお礼申し上げます。大阪大学大学院理学研究科 西田宏記 教授、ならびに京都大学大学院理学研究科 佐藤ゆたか 准教授、名古屋大学大学院理学研究科 白江-倉林 麻貴 氏には、*in situ hybridization* 法および電子顕微鏡試料作成に関するご助言いただきました。深くお礼申し上げます。

また、甲南大学フロンティアサイエンス学部 腫瘍分子学研究室 川内敬子 准教授および生物無機化学研究室 藤井敏司教授、ならびに神戸大学バイオシグナル総合研究センター 岩崎哲史助教には、本稿の精読と批評をしていただきました。深く感謝いたします。

最後に本研究を遂行するにあたり、指導教官として適切なお指導、ご助言をいただき、また本稿の精読と批評をしていただきました甲南大学フロンティアサイエンス学部分子細胞発生学研究室 西方敬人 教授に心よりお礼申し上げます。

参考文献

- Abraham VC, Miller AL, Fluck RA. Microtubule arrays during ooplasmic segregation in the medaka fish egg (*Oryzias latipes*), *Biol Bull*, 188: 136-145; 1995.
- Akhmanova A, Yap AS. Organizing junctions at the cell-cell interface, *Cell*, 135: 791-793; 2008.
- Akhmanova A, Steinmetz MO. Microtubule +TIPs at a glance, *J Cell Sci*, 123: 3415-3419; 2010.
- Akhmanova A, Steinmetz MO. Microtubule minus-end regulation at a glance, *J Cell Sci*, 132: jcs227850. doi: 10.1242/jcs.227850.; 2019.
- An H, de Meritens CR, Shelkownikova TA. Connecting the "dots": RNP granule network in health and disease, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1868: 119058. doi: 10.1016/j.bbamcr.2021.119058.; 2021.
- Aze A, Fayet C, Lapasset L, Genevière AM. Replication origins are already licensed in G1 arrested unfertilized sea urchin eggs, *Dev Biol*. 340: 557-570; 2010.
- Baines A.J, Bignone PA, King MD. A, Maggs AM, Bennett PM, Pinder JC, Phillios GW, The CKK domain (DUF1781) binds microtubules and defines the CAMSAP/ssp4 family of animal proteins. *Mol Biol Evol*, 26: 2005-2014; 2009.
- Becker KA, Hart NH. Reorganization of filamentous actin and myosin-II in zebrafish eggs correlates temporally and spatially with cortical granule exocytosis, *J Cell Sci*, 112: 97-110; 1999.
- Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization, *Nature*, 508: 483-487; 2014.
- Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility, *Physiol Rev*, 94: 235-263; 2014
- Callender JA, Newton AC. Conventional protein kinase C in the brain: 40 years later, *Neuro Signal*, 1: NS20160005; 2017.
- Chiba S, Miki Y, Ashida K, Wada MR, Tanaka KJ, Shibata Y, Nakamori R, Nishikata T. Interactions between cytoskeletal components during myoplasm rearrangement in ascidian eggs, *Dev Growth Differ*, 41: 265-272;1999.
- Chang P, Torres J, Lewis RA, Mowry KL, Houliston E, King ML. Localization of RNAs to the mitochondrial cloud in *Xenopus* oocytes through entrapment and association with endoplasmic reticulum, *Mol Biol Cell*, 15: 4669-4681; 2004.

- Chenevert J, Pruliere G, Ishii H, Sardet C, Nishikata T. Purification of Mitochondrial Proteins HSP60 and ATP Synthase From Ascidian Eggs: Implications for Antibody Specificity, *PLOS ONE*, 8: e52996; 2013.
- Conklin EG. The organization and cell lineage of the ascidian egg, *J Acad Nat Sci Phila*, 13: 1–119; 1905.
- Correas I, Díaz-Nido J, Avila J. Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain, *J Biol Chem*, 267: 15721-15728; 1992.
- Costache V, McDougall A, Dumollard R. Cell cycle arrest and activation of development in marine invertebrate deuterostomes, *Biochem Biophys Res Commun*, 450: 1175-1181; 2014.
- Costache V, Hebras C, Pruliere G, Besnardeau L, Failla M, Copley RR, Burgess D, Chenevert J, McDougall A. Kif2 localizes to a subdomain of cortical endoplasmic reticulum that drives asymmetric spindle position, *Nat Commun*, 8: 917. doi: 10.1038/s41467-017-01048-8.; 2017.
- Cuykendall TN, Houston DW. Vegetally localized *Xenopus* trim36 regulates cortical rotation and dorsal axis formation. *Development*, 136: 3057-3065; 2009.
- Dansereau DA, Lasko P. The development of germline stem cells in *Drosophila*. *Methods Mol Biol*, 450: 3-26; 2008.
- De Robertis EM, Larraín J, Oelgeschläger M, Wessely O. The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo, *Nat Rev Genet*, 1: 171-181; 2000.
- Dehal P, Satou Y, Campbell RK, Chapman J, Degnan B, De Tomaso A, Davidson B, Di Gregorio A, Gelpke M, Goodstein DM, Harafuji N, Hastings KE, Ho I, Hotta K, Huang W, Kawashima T, Lemaire P, Martinez D, Meinertzhagen IA, Necula S, Nonaka M, Putnam N, Rash S, Saiga H, Satake M, Terry A, Yamada L, Wang HG, Awazu S, Azumi K, Boore J, Branno M, Chin-Bow S, DeSantis R, Doyle S, Francino P, Keys DN, Haga S, Hayashi H, Hino K, Imai KS, Inaba K, Kano S, Kobayashi K, Kobayashi M, Lee BI, Makabe KW, Manohar C, Matassi G, Medina M, Mochizuki Y, Mount S, Morishita T, Miura S, Nakayama A, Nishizaka S, Nomoto H, Ohta F, Oishi K, Rigoutsos I, Sano M, Sasaki A, Sasakura Y, Shoguchi E, Shin-i T, Spagnuolo A, Stainier D, Suzuki MM, Tassy O, Takatori N, Tokuoka M, Yagi K, Yoshizaki F, Wada S, Zhang C, Hyatt PD, Larimer F, Detter C, Doggett N, Glavina T, Hawkins T, Richardson P, Lucas S, Kohara Y, Levine M, Satoh N, Rokhsar DS. The draft genome of *Ciona*

- intestinalis: insights into chordate and vertebrate origins. *Science*, 293: 2157-2167; 2002.
- Dogterom M, Koenderink GH. Actin-Microtubule Crosstalk in Cell Biology, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20: 38–54; 2019,
- Dong C, Xu H, Zhang R, Tanaka N, Takeichi M, Meng W. CAMSAP3 accumulates in the pericentrosomal area and accompanies microtubule release from the centrosome via katanin, *J Cell Sci*, 130: 1709-1715; 2017.
- Ducibella T, Fissore R. The roles of Ca²⁺, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development, *Dev Biol*, 315: 257-279; 2007. doi:10.1016/j.ydbio.2007. 12.012.
- Dumollard R, McDougall A, Rouvière C, Sardet C. Fertilisation calcium signals in the ascidian egg, *Biol Cell*, 96: 29-36; 2004.
- Dumollard R, Levasseur M, Hebras C, Huitorel P, Carroll M, Chambon JP, McDougall A. Mos limits the number of meiotic divisions in urochordate eggs, *Development*, 138: 885-895; 2011.
- Elinson RP, Rowning B. A transient array of parallel microtubules in frog eggs: potential tracks for a cytoplasmic rotation that specifies the dorso-ventral axis, *Dev Biol*, 128: 185-197; 1988.
- Elinson RP, Ninomiya H. Parallel microtubules and other conserved elements of dorsal axial specification in the direct developing frog, *Eleutherodactylus coqui*, *Dev Genes Evol*, 213: 28-34; 2003.
- Eliyahu E, Tsaadon A, Shtraizent N, Shalgi R. The involvement of protein kinase C and actin filaments in cortical granule exocytosis in the rat. *Reproduction*, 129: 161-170; 2005.
- Errico A, Deshmukh K, Tanaka Y, Pozniakovsky A, Hunt T. Identification of substrates for cyclin dependent kinases, *Adv Enzyme Regul*, 50: 375-399; 2010.
- Estrada P, Kim J, Coleman J, Walker L, Dunn B, Takizawa P, Novick P, Ferro-Novick S. Myo4p and She3p are required for cortical ER inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Cell Biol*, 163: 1255-1266; 2003
- Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase, *J Biol Chem*, 273: 18623-18632; 1998.
- Ferrell JE Jr. *Xenopus* oocyte maturation: new lessons from a good egg, *Bioessays*, 21: 833-842; 1999.

- Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton, *Nature*, 463: 485-492; 2010.
- Fox PD, Haberkorn CJ, Weigel AV, Higgins JL, Akin EJ, Kennedy MJ, Krapf D, Tamkun MM. Plasma membrane domains enriched in cortical endoplasmic reticulum function as membrane protein trafficking hubs, *Mol Biol Cell*, 24: 2703-1713; 2013.
- Ge X, Grotjahn D, Welch E, Lyman-Gingerich J, Holguin C, Dimitrova E, Abrams EW, Gupta T, Marlow FL, Yabe T, Adler A, Mullins MC, Pelegri F. Hecate/Grip2a acts to reorganize the cytoskeleton in the symmetry-breaking event of embryonic axis induction, *PLoS Genet*, 10: e1004422. doi: 10.1371/journal.pgen.1004422.; 2014.
- Georgadaki K, Khoury N, Spandidos DA, Zoumpourlis V. The molecular basis of fertilization, *Int J Mol Med*, 38: 979-986; 2016.
- Gerhart J, Danilchik M, Doniach T, Roberts S, Rowning B, Stewart R. Cortical rotation of the *Xenopus* egg: consequences for the anteroposterior pattern of embryonic dorsal development. *Development*, 107: 37-51; 1989.
- Goodson HV, Jonasson EM. Microtubules and Microtubule-Associated Proteins, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10: a022608. doi: 10.1101/cshperspect.a022608.; 2018.
- Goto T, Kanda K, Nishikata T. Non-centrosomal microtubule structures regulated by egg activation signaling contribute to cytoplasmic and cortical reorganization in the ascidian egg. *Dev Biol*, 448: 161-172; 2019.
- Goto T, Torii S, Kondo A, Kawakami J, Yagi H, Suekane M, Kataoka Y, Nishikata T. Dynamic changes in the association between maternal mRNAs and endoplasmic reticulum during ascidian early embryogenesis. *Dev. Genes. Evol*, doi: 10.1007/s00427-021-00683-y. Epub ahead of print. PMID: 34921621.; 2021.
- Goto T, Torii S, Kondo A, Kanda K, Kawakami J, Kataoka Y, Nishikata T. Actin filament in the first cell cycle contributes to the determination of the anteroposterior axis in ascidian development. *Journal of Developmental Biology*: in press; 2022.
- Grandin N, Charbonneau M. Intracellular pH and intracellular free calcium responses to protein kinase C activators and inhibitors in *Xenopus* eggs. *Development*, 112: 461-470; 1991.
- Guarino AM, Mauro GD, Ruggiero G, Geyer N, Delicato A, Foulkes NS, Vallone D, Calabrò V. YB-1 recruitment to stress granules in zebrafish cells reveals a

- differential adaptive response to stress, *Sci Rep*, 9: 9059. doi: 10.1038/s41598-019-45468-6.; 2019.
- Gurel PS, Hatch AL, Higgs HN. Connecting the cytoskeleton to the endoplasmic reticulum and Golgi, *Curr Biol*, 24: 660-672; 2014.
- Hama H, Kurokawa H, Kawano H, Ando R, Shimogori T, Noda H, Fukami K, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci*, 14: 1481–1488; 2011.
- Hannigan MM, Hoffman AM, Thompson JW, Zheng T, Nicchitta CV. Quantitative Proteomics Links the LRRC59 Interactome to mRNA Translation on the ER Membrane. *Mol Cell Proteomics*, 19: 1826-1849; 2020.
- Hayashi T, Lewis A, Hayashi E, Betenbaugh MJ, Su TP. Antigen retrieval to improve the immunocytochemistry detection of sigma-1 receptors and ER chaperones. *Histochem Cell Biol*, 135: 627-637; 2011.
- Hermesh O, Jansen RP. Take the (RN)A-train: localization of mRNA to the endoplasmic reticulum, *Biochim Biophys Acta*, 1833: 2519-2525; 2013.
- Horner VL, Wolfner MF. Transitioning from egg to embryo: triggers and mechanisms of egg activation, *Dev Dyn*, 237: 527-544; 2008.
- Hoshino Y, Sato Y, Sakai C, Sato E. The Signal Transduction of Meiotic Progression in Mammalian Oocytes, *J Mamm Ova Res*, 27: 21-26; 2010.
- Houliston E, Elinson RP. Patterns of microtubule polymerization relating to cortical rotation in *Xenopus laevis* eggs, *Development*, 112: 107-117; 1991.
- Houliston E, Elinson RP. Microtubules and cytoplasmic reorganization in the frog egg, *Curr Top Dev Biol*, 26: 53–70; 1992.
- Ishii H, Kunihiro S, Tanaka M, Hatano K, Nishikata T. Cytosolic subunits of ATP synthase are localized to the cortical endoplasmic reticulum-rich domain of the ascidian egg myoplasm, *Dev Growth Differ*, 54: 753–766; 2012.
- Ishii H, Shirai T, Makino C, Nishikata T. Mitochondrial inhibitor sodium azide inhibits the reorganization of mitochondria-rich cytoplasm and the establishment of the anteroposterior axis in ascidian embryo, *Dev Growth Differ*, 56: 175–188; 2014.
- Ishii H, Goto T, Nishikata T. Microtubule array observed in the posterior-vegetal cortex during cytoplasmic and cortical reorganization of the ascidian egg, *Dev Growth Differ*, 59: 648-656; 2017.
- Iwao Y, Shiga K, Shiroshita A, Yoshikawa T, Sakiie M, Ueno T, Ueno S, Ijiri TW, Sato K. The need of MMP-2 on the sperm surface for *Xenopus* fertilization: its role in a fast electrical block to polyspermy. *Mech Dev*, 134: 80-95; 2014.

- Iwashita J, Hayano Y, Sagata N. Essential role of germinal vesicle material in the meiotic cell cycle of *Xenopus* oocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 4392-4397; 1998.
- Jaffe LA. The fast block to polyspermy: New insight into a century-old problem. *J Gen Physiol*, 150: 1233-1234; 2018.
- Jeffery WR. Development and evolution of an egg cytoskeletal domain in ascidians. *Curr Top Dev Biol*, 3: 243-276; 1995.
- Jesuthasan S, Strähle U. Dynamic microtubules and specification of the zebrafish embryonic axis, *Curr Biol*, 7: 31–42; 1997.
- Johnson AD, Alberio R. Primordial germ cells: the first cell lineage or the last cells standing? *Development*, 142: 2730-2739; 2015.
- Kashir J, Deguchi R, Jones C, Coward K, Stricker SA. Comparative biology of sperm factors and fertilization-induced calcium signals across the animal kingdom. *Mol Reprod Dev*, 80: 787-815; 2013.
- Ke MT, Fujimoto S, Imai T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci*, 16: 1154-1161; 2013.
- King MD. A, Phillios GW, Bignone PA, Hayes NV. L, Pinder JC, Baines AJ. A conserved sequence in calmodulin regulated spectrin-associated protein 1 links its interaction with spectrin and calmodulin to neurite outgrowth. *J Neurochem*, 128: 391-402; 2014.
- Kishimoto T. Entry into mitosis: a solution to the decades-long enigma of MPF. *Chromosoma*, 124: 417-428; 2015.
- Kishimoto T. MPF-based meiotic cell cycle control: Half a century of lessons from starfish oocytes. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 94: 180-203; 2018.
- Kline D, Mehlmann L, Fox C, Terasaki M. The cortical endoplasmic reticulum (ER) of the mouse egg: localization of ER clusters in relation to the generation of repetitive calcium waves, *Dev Biol*, 215: 431–442; 1999.
- Kloc M, Etkin LD. Apparent continuity between the messenger transport organizer and late RNA localization pathways during oogenesis in *Xenopus*. *Mech Dev*, 73: 95-106; 1998.
- Kumano G, Kawai N, Nishida H. Macho-1 regulates unequal cell divisions independently of its function as a muscle determinant, *Dev Biol*, 344: 284–292; 2010.

- Lasser M, Tiber J, Lowery LA. The Role of the Microtubule Cytoskeleton in Neurodevelopmental Disorders. *Front Cell Neurosci*, 12: 165. doi: 10.3389/fncel.2018.00165; 2018.
- Lefebvre C, Terret ME, Djiane A, Rassinier P, Maro B, Verlhac MH. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate, *J Cell Biol*, 157: 603-613; 2002.
- Leguia M, Conner S, Berg L, Wessel GM. Synaptotagmin I is involved in the regulation of cortical granule exocytosis in the sea urchin. *Mol Reprod Dev*, 73: 895-905; 2006.
- Levasseur M, Carroll M, Jones KT, McDougall A. A novel mechanism controls the Ca²⁺ oscillations triggered by activation of ascidian eggs and has an absolute requirement for Cdk1 activity. *J Cell Sci*, 120: 1763-1771; 2007.
- Levasseur M, Dumollard R, Chambon JP, Hebras C, Sinclair M, Whitaker M, McDougall A. Release from meiotic arrest in ascidian eggs requires the activity of two phosphatases but not CaMKII, *Development*, 140: 4583-4593; 2013.
- Li R, Leblanc J, He K, Liu XJ. Spindle function in *Xenopus* oocytes involves possible nanodomain calcium signaling, *Mol Biol Cell*, 27: 3273-3283; 2016.
- Longo VD, Lieber MR, Vijg J. Turning anti-ageing genes against cancer, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 903-910; 2008.
- Lu FI, Thisse C, Thisse B. Identification and mechanism of regulation of the zebrafish dorsal determinant, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108:15876-15880; 2011.
- Lyczak R, Gomes JE, Bowerman B. Heads or tails: cell polarity and axis formation in the early *Caenorhabditis elegans* embryo, *Dev Cell*, 3:157-166; 2002.
- Lynes EM, Simmen T. Urban planning of the endoplasmic reticulum (ER): how diverse mechanisms segregate the many functions of the ER, *Biochim Biophys Acta*, 1813: 1893-1905; 2011.
- Marino M, Wilding M, Dale B. Interaction of cell cycle kinases, microtubules, and chromatin in ascidian oocytes during meiosis, *Mol Reprod Dev*, 56: 155-162; 2000.
- Marrari Y, Terasaki M, Arrowsmith V, Houlston E. Local inhibition of cortical rotation in *Xenopus* eggs by an anti-KRP antibody. *Dev Biol*, 224: 250-226; 2000.
- Marrari Y, Rouviere C, Houlston E. Complementary roles for dynein and kinesins in the *Xenopus* egg cortical rotation. *Dev Biol*, 271: 38-48; 2004.
- Marston AL, Amon A. Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 983-997; 2004.

- McDougall A, Sardet C. Function and characteristics of repetitive calcium waves associated with meiosis. *Curr Biol*, 5: 318-328; 1995.
- Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong JP, Blow JJ, Inagaki N, Inagaki M, Delcros JG, Moulinoux JP. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5, *Eur J Biochem*, 243: 527-536, 1997.
- Miller JR, Rowning BA, Larabell CA, Yang-Snyder JA, Bates RL, Moon RT. Establishment of the dorsal-ventral axis in *Xenopus* embryos coincides with the dorsal enrichment of dishevelled that is dependent on cortical rotation, *J Cell Biol*, 146: 427-437; 1999.
- Moriwaki K, Nakagawa T, Nakaya F, Hirohashi N, Chiba K. Arrest at metaphase of meiosis I in starfish oocytes in the ovary is maintained by high CO₂ and low O₂ concentrations in extracellular fluid, *Zoolog Sci*, 30: 975-984; 2013.
- Nagae S, Meng W, Takeichi M. Non-centrosomal microtubules regulate F-actin organization through the suppression of GEF-H1 activity. *Genes Cells*, 18: 387-396; 2013.
- Nance J, Zallen JA. Elaborating polarity: PAR proteins and the cytoskeleton. *Development*. 138: 799-809; 2011.
- Negishi T, Takada T, Kawai N, Nishida H. Localized PEM mRNA and protein are involved in cleavage-plane orientation and unequal cell divisions in ascidians. *Curr Biol*, 17:1014-1025; 2007.
- Nishida H. Localization of determinants for formation of the anterior-posterior axis in eggs of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Development*, 120: 3093-3104; 1994.
- Nishida H. Cell fate specification by localized cytoplasmic determinants and cell interactions in ascidian embryos. *Int Rev Cytol*, 176: 245-306; 1997.
- Nishida H, Sawada K. macho-1 encodes a localized mRNA in ascidian eggs that specifies muscle fate during embryogenesis, *Nature*, 409: 724-729; 2001.
- Nishida H. Specification of embryonic axis and mosaic development in ascidians. *Dev Dyn* 233: 1177-1193; 2005.
- Nishikata T, Hibino T, Nishida H. The centrosome-attracting body, microtubule system, and posterior egg cytoplasm are involved in positioning of cleavage planes in the ascidian embryo. *Dev Biol*. 209: 72-85; 1999.
- Nojima H, Rothhämel S, Shimizu T, Kim CH, Yonemura S, Marlow FL, Hibi M. Syntabulin, a motor protein linker, controls dorsal determination, *Development*, 137: 923-933; 2010.

- Noordstra I., Liu Q., Nijenhuis W., Hua S., Jiang K., Baars M., Remmelzwaal S., Martin M., Kapitein L. C., Akhmanova A. Control of apico-basal epithelial polarity by the microtubule minus-end-binding protein CAMSAP3 and spectraplakins ACF7. *J Cell Sci*, 129: 4278-4288; 2016.
- O'Brien ET, Salmon ED, Erickson HP. How calcium causes microtubule depolymerization. *Cell Motil Cytoskeleton*, 36: 125-135; 1997.
- Okano-Uchida T, Okumura E, Iwashita M, Yoshida H, Tachibana K, Kishimoto T. Distinct regulators for Plk1 activation in starfish meiotic and early embryonic cycles. *EMBO J*, 22: 5633-5642; 2003.
- Olson DJ, Oh D, Houston DW. The dynamics of plus end polarization and microtubule assembly during *Xenopus* cortical rotation. *Dev Biol*, 401: 249-263; 2015.
- Paix A, Yamada L, Dru P, Lecordier H, Pruliere G, Chenevert J, Satoh N, Sardet C. Cortical anchorages and cell type segregations of maternal postplasmic/PEM RNAs in ascidians, *Dev Biol*, 336: 96–111; 2009.
- Paix A, Le Nguyen PN, Sardet C. Bi-polarized translation of ascidian maternal mRNA determinant pem-1 associated with regulators of the translation machinery on cortical Endoplasmic Reticulum (cER). *Dev Biol*, 357: 211-226; 2011.
- Parrington J, Davis LC, Galione A, Wessel G. Flipping the switch: how a sperm activates the egg at fertilization. *Dev Dyn*. 236: 2027-2038; 2007.
- Pelletier JF, Field CM, Fürthauer S, Sonnett M, Mitchison TJ. Co-movement of astral microtubules, organelles and F-actin by dynein and actomyosin forces in frog egg cytoplasm, *Elife*, 9: e60047. doi: 10.7554/eLife.60047.; 2020.
- Pollard TD, Goldman RD. Overview of the Cytoskeleton from an Evolutionary Perspective, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10: a030288. doi: 10.1101/cshperspect.a030288.; 2018.
- Prodon F, Dru P, Roegiers F, Sardet C. Polarity of the ascidian egg cortex and relocation of cER and mRNAs in the early embryo. *J Cell Sci*. 118: 2393-2404; 2005.
- Prodon F, Chenevert J, Sardet C. Establishment of animal-vegetal polarity during maturation in ascidian oocytes. *Dev Biol*. 290: 297-311; 2006.
- Prodon F, Yamada L, Shirae-Kurabayashi M, Nakamura Y, Sasakura Y. Postplasmic/PEM RNAs: a class of localized maternal mRNAs with multiple roles in cell polarity and development in ascidian embryos, *Dev Dyn*, 236: 1698–1715; 2007.

- Prodon F, Sardet C, Nishida H. Cortical and cytoplasmic flows driven by actin microfilaments polarize the cortical ER-mRNA domain along the a-v axis in ascidian oocytes. *Dev Biol*, 313: 682-699; 2008.
- Prodon F, Hanawa K, Nishida H. Actin microfilaments guide the polarized transport of nuclear pore complexes and the cytoplasmic dispersal of Vasa mRNA during GVBD in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Dev Biol*, 330: 377-388; 2009.
- Protter DSW, Parker R. Principles and Properties of Stress Granules, *Trends Cell Biol*, 26: 668-679; 2016.
- Quon E, Sere YY, Chauhan N, Johansen J, Sullivan DP, Dittman JS, Rice WJ, Chan RB, Di Paolo G, Beh CT, Menon AK. Endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites integrate sterol and phospholipid regulation, *PLoS Biol*, 16: e2003864. doi: 10.1371/journal.pbio.2003864.; 2018.
- Rangel-Mata F, Méndez-Márquez R, Martínez-Cadena G, López-Godínez J, Nishigaki T, Darszon A, García-Soto J. Rho, Rho-kinase, and the actin cytoskeleton regulate the Na⁺ -H⁺ exchanger in sea urchin eggs, *Biochem Biophys Res Commun*, 352: 264-269; 2007.
- Raz E. The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development, *Genome Biol*, 1: REVIEWS1017. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-3-reviews1017>; 2000.
- Reid DW, Nicchitta CV. Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16: 221–231; 2015.
- Richardson DS, Lichtman JW. Clarifying Tissue Clearing, *Cell*, 162: 246-257; 2015.
- Roegiers F, McDougall A, Sardet C. The sperm entry point defines the orientation of the calcium-induced contraction wavethat directs the first phase of cytoplasmic reorganization in the ascidian egg. *Development*, 121: 3457-3466; 1995.
- Roegiers F, Djediat C, Dumollard R, Rouvière C, Sardet C. Phases of cytoplasmic and cortical reorganizations of the ascidian zygote between fertilization and first division, *Development*, 126: 3101–3117; 1999.
- Ronneberger O, Fischer P, Brox T. U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015*. MICCAI 2015. Lecture Notes in Computer Science, 9351: https://doi.org/10.1007/978-3-319-24574-4_28; 2015
- Russo GL, Kyojuka K, Antonazzo L, Tosti E, Dale B. Maturation promoting factor in ascidian oocytes is regulated by different intracellular signals at meiosis I and II, *Development*, 122: 1995-2003; 1996.

- Russo GL, Bilotto S, Ciarcia G, Tosti E. Phylogenetic conservation of cytostatic factor related genes in the ascidian *Ciona intestinalis*, *Gene*, 429: 104-111; 2009.
- Saitou M, Yamaji M. Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4: a008375; 2012.
- Sanghvi-Shah R, Weber GF. Intermediate Filaments at the Junction of Mechanotransduction, Migration, and Development, *Front Cell Dev Biol*, 5: 81. doi: 10.3389/fcell.2017.00081.; 2017.
- Sardet C, Speksnijder J, Inoue S, Jaffe L. Fertilization and ooplasmic movements in the ascidian egg, *Development*, 105: 237–249; 1989.
- Sardet C, Speksnijder J, Terasaki M, Chang P. Polarity of the ascidian egg cortex before fertilization. *Development*, 115: 221-237; 1992.
- Sardet C, Nishida H, Prodon F, Sawada K. Maternal mRNAs of PEM and macho 1, the ascidian muscle determinant, associate and move with a rough endoplasmic reticulum network in the egg cortex, *Development*, 130: 5839–5849; 2003.
- Sardet C, Dru P, Prodon F. Maternal determinants and mRNAs in the cortex of ascidian oocytes, zygotes and embryos. *Biol Cell*, 97: 35-49; 2005.
- Sardet C, Paix A, Prodon F, Dru P, Chenevert J. From oocyte to 16-cell stage: cytoplasmic and cortical reorganizations that pattern the ascidian embryo, *Dev Dyn*, 236: 1716–1731; 2007.
- Sardet C, McDougall A, Yasuo H, Chenevert J, Pruliere G, Dumollard R, Hudson C, Hebras C, Le Nguyen N, Paix A. Embryological methods in ascidians: the Villefranche-sur-Mer protocols. *Methods Mol Biol*, 770: 365-400; 2011.
- Sasakura Y, Ogasawara M, Makabe KW. Two pathways of maternal RNA localization at the posterior-vegetal cytoplasm in early ascidian embryos, *Dev Biol*, 220: 365–378; 2000.
- Sato K. Transmembrane signal transduction in oocyte maturation and fertilization: focusing on *Xenopus laevis* as a model animal, *Int J Mol Sci*, 16: 114-134; 2014.
- Sawada T, Schatten G. Microtubules in ascidian eggs during meiosis, fertilization, and mitosis, *Cell Motil Cytoskeleton*, 9: 219–230; 1988.
- Sawada T, Schatten G. Effects of cytoskeletal inhibitors on ooplasmic segregation and microtubule organization during fertilization and early development in the ascidian *Molgula occidentalis*, *Dev Biol*, 132: 331–342; 1989.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat Methods*, 9: 676-682; 2012.

- Schroeder MM, Gard DL. Organization and regulation of cortical microtubules during the first cell cycle of *Xenopus* eggs. *Development*, 114: 699-709; 1992.
- Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling, *Cell Mol Life Sci*, 73: 79–94; 2016.
- Sensui N, Yoshida M, Tachibana K. Role of Mos/MEK/ERK cascade and cdk1 in Ca²⁺ oscillations in fertilized ascidian eggs, *Dev Biol*, 367: 208-215; 2012.
- Sharma P, Alsharif S, Fallatah A, Chung BM. Intermediate Filaments as Effectors of Cancer Development and Metastasis: A Focus on Keratins, Vimentin, and Nestin, *Cells*, 8: 497. doi: 10.3390/cells8050497.; 2019.
- Shirae-Kurabayashi M, Nishikata T, Takamura K, Tanaka KJ, Nakamoto C, Nakamura A. Dynamic redistribution of vasa homolog and exclusion of somatic cell determinants during germ cell specification in *Ciona intestinalis*. *Development*. 133: 2683-2693; 2006.
- Shirae-Kurabayashi M, Matsuda K, Nakamura A. Ci-Pem-1 localizes to the nucleus and represses somatic gene transcription in the germline of *Ciona intestinalis* embryos. *Development*, 138: 2871-2881; 2011.
- Spiller C, Koopman P, Bowles J. Sex Determination in the Mammalian Germline, *Annu Rev Genet*, 51: 265-285; 2017.
- Speksnijder JE, Terasaki M, Hage WJ, Jaffe LF, Sardet C. Polarity and reorganization of the endoplasmic reticulum during fertilization and ooplasmic segregation in the ascidian egg, *J Cell Biol*, 120: 1337-1346; 1993.
- Steger C. An unbiased detector of curvilinear structures, *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*, 20: 113–125; 1998.
- Stricker SA. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals, *Dev Biol*, 211: 157-176; 1999.
- Takaoka K, Nishimura H, Hamada H. Both Nodal signalling and stochasticity select for prospective distal visceral endoderm in mouse embryos. *Nat Commun*, 8:1492. doi: 10.1038/s41467-017-01625-x; 2017.
- Tanaka KJ, Matsumoto K, Tsujimoto M, Nishikata T. CiYB1 is a major component of storage mRNPs in ascidian oocytes: implications in translational regulation of localized mRNAs, *Dev Biol*, 272: 217-230; 2004.
- Tanaka N, Meng W, Nagae S, Takeichi M. Nezha/CAMSAP3 and CAMSAP2 cooperate in epithelial-specific organization of noncentrosomal microtubules, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 20029-20034; 2012.

- Tao Q, Yokota C, Puck H, Kofron M, Birsoy B, Yan D, Asashima M, Wylie CC, Lin X, Heasman J. Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos, *Cell*, 120: 857-871; 2005.
- Tavassoli S, Chao JT, Young BP, Cox RC, Prinz WA, de Kroon AI, Loewen CJ. Plasma membrane--endoplasmic reticulum contact sites regulate phosphatidylcholine synthesis, *EMBO Rep*, 14: 434-440; 2013.
- Terasaki M, Chen LB, Fujiwara K. Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J Cell Biol*, 103: 1557-1568; 1986.
- Terasaki M, Jaffe LA. Organization of the sea urchin egg endoplasmic reticulum and its reorganization at fertilization, *J Cell Biol*, 114: 929-940; 1991.
- Terasaki M, Reese TS. Characterization of endoplasmic reticulum by co-localization of BiP and dicarbocyanine dyes. *J Cell Sci*, 101: 315-22; 1992.
- Tokmakov AA, Stefanov VE, Iwasaki T, Sato K, Fukami Y. Calcium signaling and meiotic exit at fertilization in *Xenopus* egg, *Int J Mol Sci*, 15: 18659-18676; 2014.
- Tran LD, Hino H, Quach H, Lim S, Shindo A, Mimori-Kiyosue Y, Mione M, Ueno N, Winkler C, Hibi M, Sampath K. Dynamic microtubules at the vegetal cortex predict the embryonic axis in zebrafish, *Development*, 139: 3644-3652; 2012.
- Tripathi A, Kumar KV, Chaube SK. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes, *J Cell Physiol*, 223: 592-600; 2010.
- Khuc Trong P, Doerflinger H, Dunkel J, St Johnston D, Goldstein RE. Cortical microtubule nucleation can organise the cytoskeleton of *Drosophila* oocytes to define the anteroposterior axis, *Elife*, 4: e06088. doi: 10.7554/eLife.06088.; 2015.
- Vukušić K, Buđa R, Tolić IM. Force-generating mechanisms of anaphase in human cells. *J Cell Sci*, 132: jcs231985. doi: 10.1242/jcs.231985; 2019.
- Waterman-Storer C, Duey DY, Weber KL, Keech J, Cheney RE, Salmon ED, Bement WM. Microtubules remodel actomyosin networks in *Xenopus* egg extracts via two mechanisms of F-actin transport, *J Cell Biol*, 150: 361-376; 2000.
- Weaver C, Kimelman D. Move it or lose it: axis specification in *Xenopus*. *Development*, 131: 3491-3499; 2004.
- Westrate LM, Lee JE, Prinz WA, Voeltz GK. Form follows function: the importance of endoplasmic reticulum shape, *Annu Rev Biochem*, 84: 791-811; 2015.
- Whitaker M. Control of meiotic arrest, *Rev Reprod*, 1: 127-135; 1996.
- Winkler MM, Steinhardt RA, Grainger JL, Minning L. Dual ionic controls for the activation of protein synthesis at fertilization. *Nature*, 287: 558-560; 1980.

- Woehlke G, Schliwa M. Walking on two heads: the many talents of kinesin, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1: 50-58; 2000.
- Wozniak KL, Carlson AE. Ion channels and signaling pathways used in the fast polyspermy block, *Mol Reprod Dev*, 87: 350-357; 2020.
- Yamada L. Embryonic expression profiles and conserved localization mechanisms of pem/postplasmic mRNAs of two species of ascidian, *Ciona intestinalis* and *Ciona savignyi*, *Dev Biol*, 296: 524–536; 2006.
- Yoshida S, Marikawa Y, Satoh N. Posterior end mark, a novel maternal gene encoding a localized factor in the ascidian embryo, *Development*, 122: 2005-2012; 1996.
- Yoshida M, Sensui N, Inoue T, Morisawa M, Mikoshiba K. Role of two series of Ca²⁺ oscillations in activation of ascidian eggs, *Dev Biol*, 203: 122-133; 1998.
- Yoshida M, Horiuchi Y, Sensui N, Morisawa M. Signaling pathway from [Ca²⁺]_i transients to ooplasmic segregation involves small GTPase rho in the ascidian egg. *Dev Growth Differ*, 45: 275-281; 2003.

業績リスト

公表論文（副論文）リスト

1. Hirokazu Ishii*, **Toshiyuki Goto***, Takahito Nishikata, Microtubule array observed in the posterior-vegetal cortex during cytoplasmic and cortical reorganization of the ascidian egg. *Development Growth & Differentiation*. **59**, 648-656 (2017) *Equal contribution
2. **Toshiyuki Goto**, Kazumasa Kanda, Takahito Nishikata, Non-centrosomal microtubule structures regulated by egg activation signaling contribute to cytoplasmic and cortical reorganization in the ascidian egg. *Developmental Biology*. **488**, 161-172 (2019)
3. **Toshiyuki Goto**, Shuhei Torii, Aoi Kondo, Junji Kawakami, Haruka Yagi, Masato Suekane, Yosky Kataoka, Takahito Nishikata, Dynamic changes in the association between maternal mRNAs and endoplasmic reticulum during ascidian early embryogenesis. *Development Genes and Evolution*. In press (2021)
4. **Toshiyuki Goto**, Shuhei Torii, Aoi Kondo, Kazumasa Kanda, Junji Kawakami, Yosky Kataoka, Takahito Nishikata, Actin filament in the first cell cycle contributes to the determination of the anteroposterior axis in ascidian development. *Journal of Developmental Biology*. In press (2022)

参考論文リスト

1. Takahito Nishikata, **Toshiyuki Goto**, Haruka Yagi, Hirokazu Ishii, Massive cytoplasmic transport and microtubule organization in fertilized chordate eggs. *Developmental Biology*. 488:154-160, (2019)

国内学会等における口頭発表

1. 後藤俊志、西方敬人：ホヤ卵細胞質再配置における新規微小管構造の発見、第6回生命機能研究会、龍谷大学大阪梅田キャンパス（2015年9月）
2. 後藤俊志、西方敬人：細胞質再配置における表層微小管構造の機能解析、第3回ホヤ研究会、大阪大学（2016年10月）
3. 西方敬人、後藤俊志：免疫染色と in situ との二重染色、ホヤ研究を中心とした技術研究会、大阪大学南部陽一郎ホール（2019年3月）
4. Takahito Nishikata, Hirokazu Ishii, Akihito Oji, Naoto Kobayashi, Shuhei Torii, Toshiyuki Goto：卵内における細胞骨格のダイナミックな制御と初期発生における役割”Control of dynamic movements of egg cytoskeletal structures and their developmental roles”、第42回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場（2019年12月）

国内学会等におけるポスター発表

1. 後藤俊志：ホヤ卵における免疫蛍光染色鮮明化条件の最適化および新規微小管構造の発見、神戸国際会議場、第4回サイエンスインカレ（2015年2月）
2. 八木春香、後藤俊志、神田一将、西方敬人：カタユウレイボヤ卵において人為的に誘導される cytoplasmic aster の形成メカニズム、日本動物学会第88回富山大会、富山県民会館（2017年9月）
3. 後藤俊志、神田一将、石井宏和、西方敬人：Analysis of mechanism for the formation of cortical microtubule structure during cytoplasmic and cortical reorganization in ascidian egg. 第40回分子生物学会年会、兵庫（2017年12月）
4. 神田一将、後藤俊志、西方敬人：Analysis on the interaction between microfilaments and microtubules during cytoplasmic and cortical reorganization in ascidian egg. 第40回分子生物学会年会、兵庫（2017年12月）神戸国際展示場（神戸）
5. 後藤俊志、神田一将、西方敬人：Analysis in regulatory mechanism of microtubule structures during ascidian 1st cell cycle. 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会（2018年6月）
6. 八木春香、後藤俊志、大路章仁、西方敬人：Paclitaxel によりカタユウレイボヤ卵に誘導される新規微小管構造について”Novel microtubule structures induced by the Paclitaxel treatment in Ciona intestinalis egg”、日本動物学会第89回札幌大会、SORA 札幌コンベンションセンター（2018年9月）

7. Haruka Yagi, **Toshiyuki Goto**, Takahito Nishikata : The meaning of the novel Paclitaxel-induced microtubule structure in the ascidian egg (Paclitaxelによりホヤ卵に誘導される新規微小管構造の意味するところ)、第41回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (2018年11月)
8. 團野紗莉、**後藤俊志**、中野真行、Anna Wrabel、阪上-沢野朝子、安藤亮子、宮脇敦史、船曳和雄、片岡洋祐：光ファイバー型顕微内視鏡システムをもちいた in vivo イメージング法の開発、第60回日本組織細胞化学会総会学術集会・第13回日中合同組織細胞化学セミナー合同大会、神戸商工会議所 (2019年9月)
9. **Toshiyuki Goto** : Innovative in vivo imaging of cancer macro- and microenvironments using micro-endoscopy. 2019 RIKEN summer school、千葉 (2019年10月)
10. **後藤俊志**、鳥居柊平、西方敬人 : ER translocation directed by cortical microtubule structures contributes to the antero-posterior axis formation in ascidian egg. 第42回分子生物学会年会、福岡 (2019年12月)
11. **Toshiyuki Goto** : Innovative in vivo imaging of heterogeneous cancer environments using micro-endoscope. RIKEN Life Science Retreat 2020、静岡 (2020年2月)
12. **後藤俊志** : 可視化手法の改良によるホヤ胚形成における新規知見の記載、2021年度 甲南大学大学院 自然科学研究科 研究成果発表会、甲南大学、神戸 (2021年11月)
13. **Toshiyuki Goto**, Masayuki Nakano, Asako Sakaue-Sawano, Ryoko Ando, Atsushi Miyawaki, Sally Danno, Ichiro Nakahara, Takahito Nishikata, Yasuhisa Tamura, Yosky Kataoka, Kazuo Funabiki, : Innovative imaging system using fiber bundle-based micro-endoscope for the investigation of tumor environments and evolution of cancer therapies. 第44回分子生物学会年会、神奈川 (2021年12月)
14. 近藤 葵, **後藤 俊志**, 鳥居柊平, 川上 純司, 西方 敬人: Verification of translational activity in unfertilized eggs of *Ciona intestinalis* using antisense nucleic acid. 第44回分子生物学会年会、神奈川 (2021年12月)
15. Shuhei Torii, **Toshiyuki Goto**, Aoi Kondo, Takahito Nishikata: Spatio-temporal analysis of ER and maternal mRNAs in the ascidian egg. 第44回分子生物学会年会、神奈川 (2021年12月)
16. **後藤 俊志**: バイオイメージングが明かす卵の中の世界、甲南大学リサーチフェスタ 2021、zoom 開催(2021年12月)
17. **Toshiyuki Goto**, Masayuki Nakano, Sally Danno, Asako Sakaue-Sawano,

Ryoko Ando, Keiko Shoda, Atsushi Miyawaki, Anna Wrabel, Ichiro Nakahara, Takahito Nishikata, Yasuhisa Tamura, Yosky Kataoka, Kazuo Funabiki : Visualization of cancer cell proliferation in vivo using fiber bundle-based micro-endoscopy, RIKEN BDR Retreat 2021, Online meeting (2021 年 12 月)

国際学会等における口頭発表

1. **Toshiyuki Goto**, Takahito Nishikata : Analysis of spatio-temporal interaction between microtubule and ER or maternal mRNA in ciona egg using new high resolution double staining methods, The 10 th International Tunicate Meeting, Citadel, Villefranche sur mer, France (2019 年 7 月)
2. **Toshiyuki Goto** : Analysis of ER transport microtubule structure dependent in ascidian body axis formation, International joint meeting for biosystems, Kobe, Japan (2020 年 12 月)

国際学会等におけるポスター発表

1. **Toshiyuki Goto**, Hirokazu Ishii, Tomomi Tani, Takahito Nishikata : A novel microtubule structure on the posterior-vegetal egg cortex during the cytoplasmic and cortical reorganizations, The 8 th International Tunicate Meeting, Aomori city cultural hall, Aomori, Japan (2015 年 7 月)
2. **Toshiyuki Goto**, Kazumasa Kanda, Hirokazu Ishii, Tomomi Tani, and Takahito Nishikata : Mechanism of CAMP (cortical array of microtubule in posterior vegetal region) formation during cytoplasmic and cortical reorganizations in the ascidian egg. The 9 th International Tunicate Meeting, New York, United States of America (2017 年 7 月)
3. Haruka Yagi, **Toshiyuki Goto**, Kazumasa Kanda, and Takahito Nishikata : Induced Cytoplasmic Aster in ascidian Ciona intestinalis egg, 9th International Tunicate Meeting, Kimmel Center, New York, United States of America (2017 月 7 月)

その他、臨床実績・症例報告実績、著作、特許、受賞等

- 1.受賞歴:第四回サイエンス・インカレ ポスター発表部門 サイエンス・インカレ奨励表彰(2015 年)
- 2.受賞歴:ナノバイオ卒業研究 最優秀賞(2017 年)

- 3.受賞歴:修士論文発表会 最優秀賞(2019 年)
- 4.受賞歴: International joint meeting for biosystems, Excellent Presentation Award (2020 年)
- 5.特許:特願 2021-060196 (2021 年)