

総 説

## 哺乳動物卵における微小管，マイクロフィラメントならびに 中間径線維の分布と機能

鈴木 裕之\*

弘前大学農学生命科学部  
青森県弘前市文京町3番地 〒036-8561

Hiroyuki SUZUKI

Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University  
3 Bunkyo-cho, Hirosaki, Aomori 036-8561, Japan

**Keyword:** Mammalian oocytes, Embryos, Cytoskeleton, Functional distribution

2016年11月26日受付，2016年11月28日受理

### 1. はじめに

減数分裂時には，染色体の挙動を中心に，染色体凝集，紡錘体形成，染色体の移動・分離，細胞質分裂などのいろいろな現象が相互に関連して時空間的に統合されて起こることは古くから指摘されていたが (Rhoades, 1961)，これらのほとんどの現象には細胞骨格が関与している (Gallo and Tosti, 2015)。細胞骨格には，分子サイズやタンパク質成分の差から3つの主要な種類がある。微小管は直径が約25 nmの最も太い繊維で， $\alpha$ -チューブリンと $\beta$ -チューブリンから構成される。微小管は間期には細胞核の周囲に放射状に分布し，分裂期には紡錘体として染色体の分離に関わる。その他，繊毛や鞭毛の構成要素でもある。マイクロフィラメントは最も細く，直径は約6 nmでアクチンから構成される。マイクロフィラメントは細胞の形態維持や細胞質分裂時の収縮環形成に関与している。卵母細胞の成熟中には，紡錘体形成，

染色体分離，極体放出，ならびに細胞小器官の移動などが卵細胞質で起こり，その後の受精や初期発生に重要である (Suzuki ら, 1999, 2000, 2002a,b, 2005, 2006; Suzuki と Saito, 2006)。これらの事象の進行には細胞骨格の中でも微小管とマイクロフィラメントが重要な働きをしている。これに対して，卵の中間径線維に関する情報については前二者に比べると十分検討されているとは言い難い。中間径線維は，骨格筋の研究によりアクチンとミオシンの中間の太さ約10 nmであったことから命名された線維である (Ishikawa ら, 1968)。微小管やマイクロフィラメントと異なり，中間径線維は多くの異なるサブユニットタンパク質から構成されている (表1)。本稿では，哺乳動物卵における微小管やマイクロフィラメント

表1. 組織特異的に局在する中間径線維の種類

組 織	IF タンパク質
上皮細胞	ケラチン
間葉細胞	ビメンチン
筋細胞	デスミン
神経細胞	ニューロフィラメント
グリア細胞	GFAP
核膜	ラミン A, B, C

GFAP, グリア細胞線維性酸性タンパク質

\* 連絡者：鈴木裕之 (すずき ひろゆき)  
(弘前大学農学生命科学部)  
〒036-8561 青森県弘前市文京町3番地  
Tel: 0172-39-3805, Fax: 0172-39-3750  
E-mail: suzuki@hirosaki-u.ac.jp

トの機能を概説し、数種類の間径線維の分布と機能に関する最近の知見を紹介したい。これらのテーマに関しては、筆者が最近まとめた総説 (Suzuki, 2015a,b) もあるので、参照頂ければ幸いです。

## 2. 卵成熟における微小管とマイクロフィラメントの分布変化

卵成熟における微小管とマイクロフィラメントの分布変化を図1に示した。卵核胞 (GV) 期にはGV周辺に微小管が一様に分布し (図1a-2)、卵丘細胞から透明帯を貫通して伸びる突起にマイクロフィラメントが検出されている (図1a-3) (Suzuki ら, 2000)。卵細胞膜直下には、マイクロフィラメントがリング状に分布し、卵の形態を維持している (Suzuki ら, 2000; Combelles ら, 2002; Suzuki と Saito, 2006; Gumus ら, 2010)。MII 期卵では、マイクロフィラメントは紡錘体の真上の細胞膜下に強染され、また第1極体と細胞膜の接着部分にとくに強い染色性が見られる (図1b-3)。微小管はMI期とMII期では紡錘体に集中する (図1b-2)。分裂装置の位置と配向、極体放出、表層顆粒の開口分泌、精子の取り込みと前核の移動にはマイクロフィラメントが関与している (Kim ら, 1998; Gumus ら, 2010)。Rho 関連タンパク質キナーゼ (ROCK) の特異的抑制剤である Y-27632 により、第1極体放出と卵核胞崩壊が抑止されることも知られている (Suzuki ら, 2011)。

## 3. ミトコンドリアの配置変化に関わる微小管とマイクロフィラメントの役割

卵成熟中に、ミトコンドリアの配置が劇的に変化する

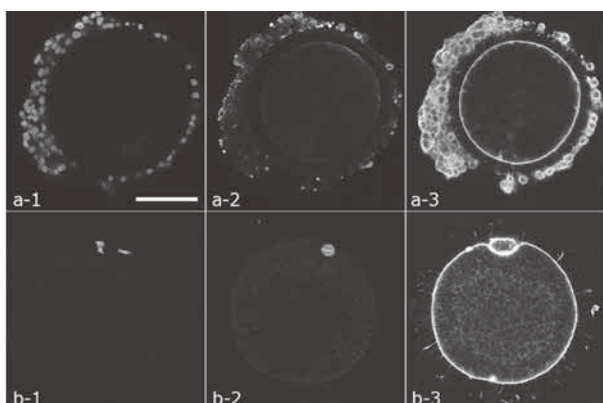


図1. ブタ卵母細胞の微小管とマイクロフィラメントの分布変化

a, GV 期卵。b, MII 期卵。左から DNA (a-1, b-1)、微小管 (a-2, b-2) ならびにマイクロフィラメント (a-3, b-3) のシグナルを示す。a-1 のバーは 50  $\mu\text{m}$ 。

ることが報告されている (Suzuki ら, 2005; Kabashima ら, 2007)。図2には、卵成熟中、前核期、2細胞期胚におけるミトコンドリアの局在を模式的に示した。マウスとブタ卵を用いた研究では、ミトコンドリアの配置は微小管によって制御され (van Blerkom, 1991; Tokura ら, 1993; Sun ら, 2001)、これに対してハムスター2細胞期胚に用いた研究ではマイクロフィラメントがミトコンドリアの配置に影響を与えているとされ (Barnett ら, 19978, 1997)、見解が一致していない。我々の研究では、細胞周期の間期では微小管とマイクロフィラメントの両方が協働してミトコンドリアの配置を制御し、分裂期ではマイクロフィラメントのみが作用していることを明らかにした (Kabashima ら, 2007)。これらの仕組みについては、既報の総説 (Suzuki, 2015a) に詳説している。また間期では微小管が核周囲のミトコンドリアの移動を、マイクロフィラメントが表層のミトコンドリアの移動に関与している。図3には既報 (Kabashima ら, 2007) を元に、これらの協働関係を模式的に示した。

## 4. 微小管とマイクロフィラメントの機能に影響を及ぼす要因

### (1) 卵母細胞の微小管とマイクロフィラメントに及ぼす低温感作の影響

低温感作により微小管の脱重合が部分的に起こり、紡錘体の形態が変化することが、マウス (Magistrini と Szöllösi, 1980; Pickering と Johnson, 1987; Sun ら,

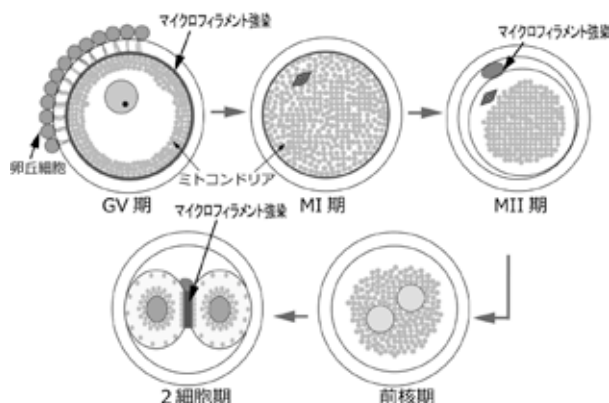


図2. 卵成熟から2細胞期胚までのミトコンドリアの局在の変化

GV 期では、卵細胞質表層に集積してみられ、卵丘細胞から伸びる細胞質突起を介した物質輸送に必要なエネルギーの供給に機能しているようである。MI 期ではミトコンドリアは細胞質全域に分布するようになり、MII 期では卵の中央に集中し始める。受精直後の前核期では前核周辺のみみられ、2細胞期胚では核周辺と表層に局在するようになる。とくに興味深いのは割球の接着面にミトコンドリアが集中して認められるようになる。

2004), ウシ (Aman と Parks, 1994), ブタ (Liu ら, 2003; Suzuki ら, 2007), ヒツジ (Moor と Crosby, 1985), ヒト (Sathananthan ら, 1988; Pickering ら, 1990; Almeida と Bolton, 1995) の卵母細胞で報告されている。ブタ MII 期卵を 4–5℃ に暴露すると紡錘体構造と表層のマイクロフィラメントに悪影響が起こり、とくに微小管への影響が 18 または 24℃ に比べて大きい (Liu ら, 2003; Suzuki ら, 2007)。マウス卵母細胞では、低温感作後 37℃ で 60 分間再加温すると紡錘体形態が回復するが (Magistrini と Szöllösi, 1980; Pickering と Johnson, 1987; Sun ら, 2004), ウシ (Aman と Parks, 1994), ブタ (Suzuki ら, 2007), ヒツジ (Moor と Crosby, 1985) ならびにヒト (Sathananthan ら, 1988; Pickering ら, 1990; Almeida と Bolton, 1995) では完全には回復しない。したがって、マウス卵母細胞の紡錘体微小管は何らかの理由で低温耐性を獲得している可能性がある。

## (2) 紡錘体形態へ及ぼす低温感作の影響

ブタ MII 期卵を 5℃ へ低温感作すると、紡錘体形状が正常の樽形 (barrel-shaped) から、両紡錘極が赤道面方向に拡張した箱形 (box-shaped) に変化する (Suzuki ら, 2007)。次いで紡錘極間が短縮する。また、“単極”の紡錘体、すなわち卵の外側の紡錘極のみが観察された。したがって、紡錘体が脱重合する場合には、まず卵の内側の紡錘体が消失し、次いで外側の紡錘体の脱重合に進行するものと推察された (Suzuki ら, 2007)。

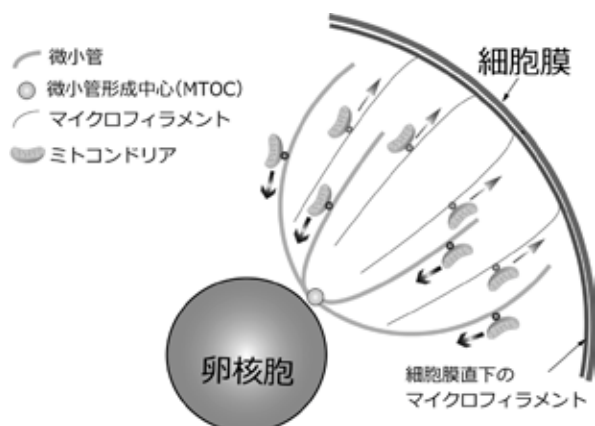


図3. ミトコンドリアの配置を制御する細胞骨格の役割 (間期)

細胞周期の間期には微小管とマイクロフィラメントが協働して関与する。微小管は核周囲におけるミトコンドリアのアンカーとして、マイクロフィラメントは細胞質表層におけるミトコンドリアのアンカーとして機能する。

## (3) 卵母細胞の微小管とマイクロフィラメントに及ぼす昇温 (暑熱ショック) の影響

暑熱ストレスに曝された雌家畜で、胚死亡が増加することはよく知られている。暑熱ストレスを加えたマウスから回収された卵母細胞では、紡錘体機能が阻害され染色体異常の割合が増大する (Baumgartner と Christian, 1981)。ウシとブタ卵母細胞を昇温感作 (41–42℃ で 2–4 時間) すると、中期染色体が凝集または離散する (Ju と Tseng, 2004; Ju, 2005)。これらの卵では、マイクロフィラメントの密度変化も起こっている。また、短時間の暑熱ショック (42℃, 30 分間) でもウシ卵母細胞の表面微細構造を変化させてしまう (Suzuki ら, 1998)。

## (4) 卵の微小管とマイクロフィラメントに及ぼす培養環境の影響

哺乳動物卵を体外で培養できるようになったのは、動物バイオテクノロジーの発展の基礎となっていることは間違いない。しかし、培養環境の変化が卵のミトコンドリアの配置を変化させてしまうことがマウス (Muggleton-Harris と Brown, 1988; Tokura ら, 1993), ハムスター (Barnett ら, 1996; Lane と Bavister, 1998), ならびにウシ (Krisher と Bavister, 1998; Abe ら, 1999) で報告されている。ハムスター 2 細胞期胚を体外培養すると、核周辺からミトコンドリアが離散するなどの現象が観察されている (Barnett ら, 1997; Lane と Bavister, 1998)。後期 8 細胞期ハムスター胚では、核周囲だけではなく、胚の緊密化 (コンパクション) に必要なエネルギー供給と利用のために細胞と細胞の接着部位にもミトコンドリアが集中するが、体外培養された胚ではこの様なミトコンドリアの配置転換が正常に進行しない (Suzuki ら, 2006)。すなわち、体外培養されたハムスター胚では微小管とマイクロフィラメントのネットワークの密度が低下して、ミトコンドリアの正常な配置に到らないのが原因と考えられる。ハムスター初期胚は培養環境の変化に非常に敏感で、体外に取り出した胚の生存性は著しく低い (Bavister, 2000)。ハムスター初期胚に必要なエネルギー要求源はマウス胚とは大いに異なるようで、初期発生に必要なエネルギー代謝の詳細については不明な点が多い。

## (5) 卵母細胞の微小管とマイクロフィラメントに及ぼす加齢の影響

卵の加齢が生じる要因として、母体の高齢化による卵の老化、排卵遅延や受精遅延による卵の過熟などが考えられる (Suzuki ら, 1995, 1996)。受精能保有時間との

関連は受精後の胚発生にとって重要であり、限界を超えると異常受精や染色体の不分離などにより胚発生能に悪影響がでる。ここでは、卵の加齢、すなわち①卵胞内での加齢、②成熟後の加齢、さらには③母体の高齢化の影響に伴う細胞骨格の分布の変化についてまとめた。

### 1) 卵胞内における卵の加齢

家畜繁殖の分野では、小型胞状卵胞由来の未成熟卵が体外成熟培養後に利用されている。核相は第1減数分裂前期であるものの、卵丘細胞の付着の悪い卵は良い卵に比べ加齢している可能性が示唆され、成熟率が一般的に低い。そこで、卵丘細胞の付着の程度により、ブタ卵丘細胞-卵母細胞複合体をグレード1（4層以上の卵丘細胞が付着）、グレード2（2-3層の卵丘細胞が付着）、グレード3（部分的に欠落し、透明帯が一部露出）ならびにグレード4（透明帯がほとんど裸化）に分類し（各区 n=20-30）、成熟中の細胞骨格の分布と染色強度を比較した（Suzuki と Saito, 2006）。結果は以下の通り。

グレード1卵のほとんどでは、マイクロフィラメントからなる卵丘細胞突起（CCP）が均一に、かつ高密度でみられたが、グレード2卵の約40%ではCCPが部分的に消失し、グレード3-4では大部分の卵（82-88%）でCCPが消失していた。また、卵細胞膜直下のマイクロフィラメントはグレード1卵では強染されるが、グレード2-4卵では密度低下が見られ、さらに細胞質にマイクロフィラメントの凝集塊が偏在した。一方、微小管はグレード1卵では細胞質全域にわたり均一に分布していたが、グレード2-4卵では表層の微小管の染色強度が低下した卵の割合が増大した。

### 2) 成熟後の卵の加齢（長時間培養）の影響

ブタ卵母細胞では、体外成熟培養を66時間まで延長しても（成熟後22-26時間経過に相当）、自発的活性化は起こらなかった（50時間, n=40; 60時間, n=38; 66時間, n=36）。これに対し、ハムスター卵では排卵10時間後から第2減数分裂後期（AII）卵が認められ（39.5%, n=38）、同18時間後では活性卵が高率に観察された（AII卵が21.4%, 前核期卵が59.5%, n=42）。なお、自発的活性化した前核形成卵では、卵細胞質内の微小管の再配置は完了していた。

#### ①ブタ卵母細胞の細胞骨格における変化

正常なMII期卵では、マイクロフィラメントは卵細胞質に均一に分布し、とくに卵細胞膜直下ならびに第1極体との接着面で強染し、細胞質中の微小管は紡錘体に集中している（図1b-2, b-3）。ブタ卵では紡錘体極の軸方向は卵細胞膜に垂直に（図1b-2）、一方、ハムスター卵では卵細胞膜に平行に配置している（図4a-1）。成熟培養を長時間継続したブタ加齢卵では、細胞膜直下のマ

イクロフィラメントの分布密度が低下し、さらに一部の卵では細胞質内のマイクロフィラメントが部分的に凝集し偏在していた。また、細胞質の微小管は、加齢により短く太い繊維状に凝集する傾向が認められた。これらの現象は培養時間を延長するほど顕著となった。また、ブタ加齢卵では紡錘極間が伸張する傾向が認められた。

#### ②ハムスター体内成熟・加齢の卵細胞骨格における変化

排卵10時間後から、ブタ卵で認められたような卵細胞質のマイクロフィラメント、ならびに微小管の凝集が観察された（図4）。排卵18時間後にはその傾向が顕著となり、さらに前核形成卵が見られ、ブタ卵ではなかった自発的な活性化が高率に起こった。とくに、排卵10

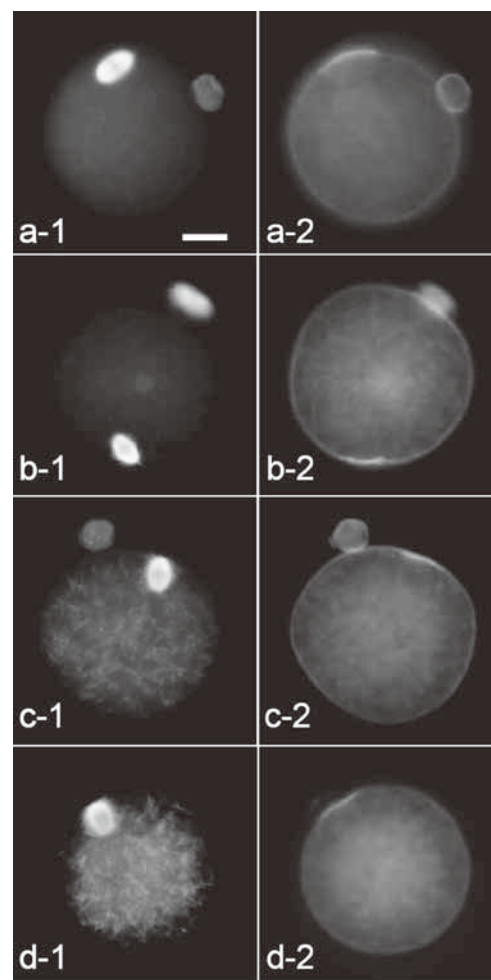


図4. ハムスター卵母細胞の細胞骨格に対する加齢の影響

a, 排卵2時間後の卵母細胞、正常形態を示す紡錘体（a-1）は卵表面に対して水平に位置しその真上にマイクロフィラメントの強染した領域が見られる（a-2）。bとc, 排卵10時間後。紡錘体の形態が変化し、やや小型化している（b-1）。また、別の卵では細胞質に微小管が析出し始めている（c-1）。分裂装置の軸が回転して、卵表面に対して垂直に位置していた（c-1）。マイクロフィラメントの分布に顕著な変化はない（b-2, c-2）。d, 排卵18時間後。分裂装置の軸が回転の他に、紡錘極が拡散していた（d-1）。a-1のバーは20 μm。

時間以降のハムスター卵では紡錘体を形成する微小管の形状が変化し、紡錘体が放射状となる異常形態や染色体の迷走を示す卵の割合が増大した (図5)。

### 3) 加齢雌ハムスターにおける体内成熟卵 (排卵卵子)

加齢雌の排卵卵子におけるマイクロフィラメントは若齢雌のそれと分布はほぼ同様であったが、染色強度が約85%に低下していた。また、微小管は排卵 (~6時間) 後まもなく、紡錘体の形状変化や細胞質内における短く太い繊維状の凝集など、前項で示した加齢卵と同様の変化が高率に観察された (図5)。以上から、母体の高齢化の影響はマイクロフィラメントよりも微小管の形態維持に対して、より顕著に影響する可能性が示唆された。また、これらが母体の高齢化にともなって発生頻度が増大する染色体不分離の要因と考えられた。母体の加齢と卵の加齢が卵の細胞骨格系へ及ぼす影響を表2にまとめた。

## 5. 卵成熟における中間径線維の分布と機能

### (1) 卵母細胞におけるケラチンの分布

マウスとヒト卵母細胞を用いた多くの研究では、ケラチンを検出したとの報告 (Lehtonen ら, 1983; Lehtonen, 1985; Santini ら, 1993; Gallicano ら, 1994; Khan-Dawood ら, 1996) と、検出できなかったとした報告 (Czernobilsky ら, 1985; Fridmacher ら, 1992; Appert ら, 1998; Hummitzsch ら, 2013) があり、結果が一致していない。さらに、動物種差もあり、ケラチンタンパク質はヒツジ (Gall ら, 1989) とハムスター (Plancha ら, 1989; Plancha, 1996; Kabashima ら, 2010) では検出されているが、ウシ、ブタ、ラットでは確認できていない (Fridmacher ら, 1992; van den Hurk ら, 1995; Suzuki ら, 未発表)。

我々は、ハムスター卵母細胞における卵成熟中のケラチンの分布変化を追究し、さらに maturation/M-phase promoting factor (MPF) と mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) の抑制剤の影響を免疫蛍光染色法により検討した (Kabashima ら, 2010)。GV 期では、非線維状ケラチンが表層に貯留しているのが特徴で、貯留域は大型で楕円状を形成し卵の表層に数個観察される (図6a)。一方、GV 周辺や卵中央には線維化し始めたケラチンが低量ながら認められる。MI 期では、大型

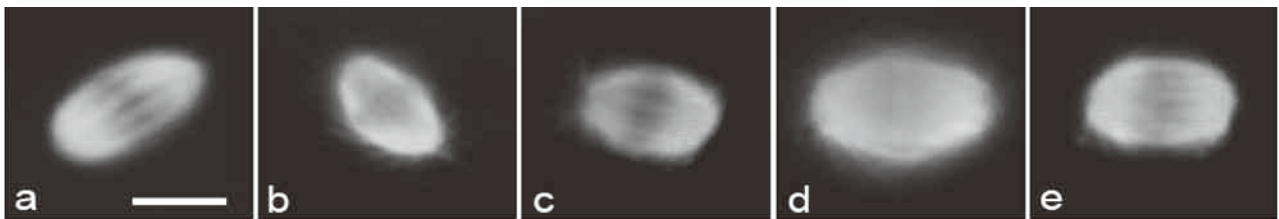


図5. 加齢に伴うハムスター卵母細胞の分裂装置の形態変化

a, 排卵2時間後の卵母細胞, 正常な紡錘体が観察される。b, c, 排卵10時間後の卵母細胞, 外側へ放射状に伸張する微小管が出現する。極間の短縮 (b) や紡錘極の拡散 (c) が認められる。d, e, 加齢ハムスターから回収された卵母細胞, 外側へ放射状に伸張する微小管を有する形態 (d) が頻出し、赤道面の染色体の配列も乱れ、迷走した染色体 (e) も観察される。a のバーは 10  $\mu$ m。

表2. 母体の加齢と卵の加齢が卵の細胞骨格系へ及ぼす影響

現象	母体の加齢 ハムスター	卵の加齢	
		ハムスター	ブタ
卵丘細胞突起のマイクロフィラメント消失	-	-	○
卵細胞膜直下のマイクロフィラメント密度低下	☉	○	○
卵細胞質内マイクロフィラメント密度低下	☉	○	○
MII 紡錘体の分断ならびに構造変化	☉	○	○
MII 期紡錘極間の短縮	-	○	× (伸張する)
染色体分散	○	○	-
MII 期卵細胞質内にチューブリン系繊維出現	☉	○	○
自発的活性化	-	○ (18時間以降)	×
極体の放出無し	○	-	-

注) ○, 起こる。×, 起こらない。-, 観察なし。☉, 排卵後早期に出現する傾向あり。

の貯留域が細分化しながら、ケラチンの線維化が進行している (図 6b)。MII 期では、線維化したケラチンがほぼ卵細胞質全域に分布しながら、貯留域のケラチンはスポット状に縮小して点在するにすぎない (図 6c)。この様に中間径線維ケラチンがハムスター卵に存在して、卵成熟に伴い分布が変化することは確かなのだが、その機能的な役割については十分に解明されていない。卵母細胞が排卵された後の物理的なストレスに対する構造的な補強の意味だけなのか、あるいは他の機能的な役割があるのかは興味深い点である。また各種抑制剤の検討から、MPF と MAPKK の細胞周期制御因子がケラチン線維の構築に関与していることを明らかにしている (図 7)。これまで検討してきたブタとハムスター卵における中間径線維の局在を表 3 にまとめた。

## (2) 卵母細胞におけるビメンチンの分布

マウス (Lehtonen ら, 1983; Gallicano ら, 1994), ラット (Czernobilsky ら, 1985), ブタ (Czernobilsky ら, 1985), ウシ (van den Hurk ら, 1995; Wendl ら, 2012), サル (Khan-Dawood ら, 1996) ならびにヒト (Czernobilsky ら, 1985; Santini ら, 1993; Khan-Dawood ら, 1996) において多数の研究があるものの、卵母細胞にビメンチンを検出している報告はほとんど見られない。Mora ら (2012) がマウス卵母細胞に検出しているのみである。興味深いことに、放射冠細胞からビメンチン陽性の細胞突起が伸張し透明帯を貫通して卵母細胞に結合しているのが、ウシ (van den Hurk ら, 1995) とブタ (Da Silva-Buttkus, 2003; Suzuki ら, 未発表) で観察されている。これらの細胞質突起に中間径線維が存在することを透過型電子顕微鏡によっても観察されている (Thibault ら, 1987)。これらの細胞骨格は、細胞間の接着、細胞間の物質輸送ならびに物理的な刺激を各種の信号に変換して伝達する (Paramio と Jorcano, 2002; Chang と Goldman, 2004; Goldman ら, 2008) などの重要な細胞活性に

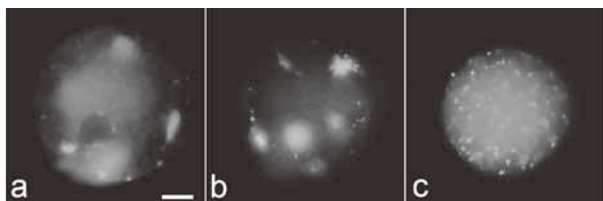


図 6. ハムスター卵母細胞における中間径線維ケラチンの分布変化

a. GV 期, 大きな塊状のケラチンが表層に局在し, GV 周辺にわずかに線維状のケラチンが認められる。b. MI 期, 小さな塊状に分かれながら, 線維状のケラチンが増量している。c. MII 期, ケラチンの強染領域がスポット状に縮小している一方で, 線維状のケラチンがほぼ卵細胞質全域に分布していた。

役立っていると思われる。

ギャップ結合を介して細胞間コミュニケーションを取っている例が卵胞発育中の卵母細胞と卵丘細胞間に認められる細胞突起で報告されている (Anderson と Albertini, 1976; Allworth と Albertini, 1993)。卵丘細胞から卵母細胞の方向に伸張して結合しているこれらの細胞質突起は, GV 期で顕著に認められ, アクチンシグナル陽性である (Suzuki ら, 2000)。

## (3) 卵母細胞におけるデスミンの分布

ウシ (van den Hurk ら, 1995; Wendl ら, 2012), ブタ (Czernobilsky ら, 1985), ヒツジ (Marettová と Marettová, 2002), ラット (Czernobilsky ら, 1985), サル (Khan-Dawood ら, 1996) ならびにヒト卵巣 (Czernobilsky ら, 1985; Santini ら, 1993; Khan-Dawood ら, 1996) に関して多くの報告があるが, 顆粒層細胞と卵母細胞の両方で免疫化学的にデスミンを検出できていない。しかし, ブタとハムスター卵母細胞を用いた我々の研究では, 卵母細胞と卵丘細胞の両方にデスミン陽性のシグナルを検出している。抗デスミン抗体による蛍光

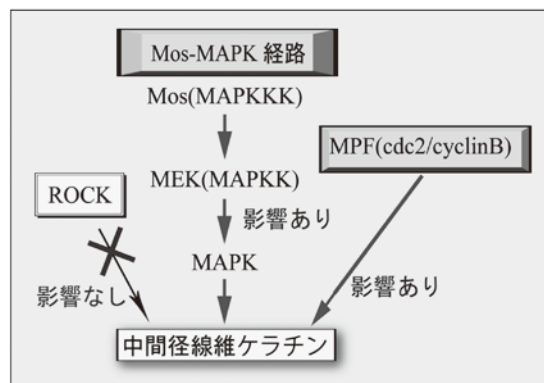


図 7. ケラチンの分布に対するシグナル伝達経路の検討結果

MAPK, mitogen-activated protein kinase; MPF, maturation/M-phase promoting factor; ROCK, Rho-associated protein kinase.

注) MAPK は MEK (MAPK kinase) を介して Mos (MAPK kinase) の機能により活性化される。

表 3. ブタとハムスター卵における中間径線維の局在

分類	中間径線維	局在の有無*			
		ブタ		ハムスター	
		卵母細胞	卵丘細胞	卵母細胞	卵丘細胞
I & II	ケラチン	-	-	+	+
III	ビメンチン	±	+	-	+
III	デスミン	+	+	+	+
III	GFAP	+	+	+	±
IV	NF	+	+	+	+
VI	ネスチン	+	-	-	-

GFAP, グリア細胞線維性酸性タンパク質; NF, ニューロフィラメント

\*, +局在あり; -局在なし; ± 要再検討

染色性は低いが、卵の成熟に伴い蛍光強度が増加していた (Suzuki ら, 未発表)。中間径線維デスミンは表層のアクチンとミオシンの相互作用があるので (Suzuki ら, 未発表), 囲卵腔の形成に何らかの役割を果たしているものと考えている。

#### (4) 卵母細胞におけるネスチンの分布

ネスチンは幹細胞マーカーとして広く使用されている (Wiese ら, 2004)。ネスチンは, ビメンチン (Marvin ら, 1998; Eliasson ら, 1999; Steinert ら, 1999) やデスミン (Sjöberg ら, 1994) のような他の中間径線維と協働することも知られている。体細胞においては, 初期の発生段階や再生過程でネスチンが発現する (Wiese ら, 2004)。

GV 期, MI 期ならびに MII 期ブタ卵のネスチンの局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ, ネスチンの蛍光強度は卵の成熟が進行するにつれ低下していた (Suzuki ら, 未発表)。したがって, 卵成熟よりはむしろ卵胞の発育に関与するものと推察された。Takahashi ら (2008) によると, ネスチンはラット発育卵胞の内卵胞膜細胞の脈管系の内皮細胞で主に発現し, その発現は卵胞の発育に伴い, あるいはまたヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) 投与により増大することが示されている。このことから, ネスチンは発育卵胞の血管形成に関与しているようで, 卵胞の成熟と排卵につながる過程で重要な役割を果たしている可能性がある。

#### (5) 卵母細胞におけるニューロフィラメントと GFAP の分布

ニューロフィラメント (NF) はニューロンにおける主要な細胞骨格成分である。分子量によって3つのタイプに分類され, それぞれ NF-L, NF-M ならびに NF-H と呼ばれている。NF タンパク質はラット (Takahashi と Ishizuka, 2012) とヒト (Khan-Dawood ら, 1996) の卵母細胞で免疫組織化学的に検出されているが, マウス卵母細胞では検出できていない (Lehtonen ら, 1983)。ラットを用いた研究で, NF-H は一次卵胞の卵母細胞で初めて発現し, 受精後の1細胞期まで継続するが, 2細胞期胚で消失することが報告されている (Takahashi と Ishizuka, 2012)。我々はブタとハムスター卵母細胞において, 免疫蛍光染色法により NF-H と NF-L の局在を確認しているが, NF-M は検出できなかった。ブタ卵母細胞には脂肪滴が多いのが特徴であるが, NF シグナルは卵母細胞の脂肪滴の位置しない領域に網目状に検出された。興味深いことに, ブタとハムスターの MII 期卵の紡錘体が NF-H シグナルと強染していた卵が観察された。また, MI 期卵の紡錘体には NF-H の共染は全く認められなかった。

#### (6) 卵母細胞における GFAP の分布

GFAP は中枢神経に見られるグリア細胞の中間径線維の主要タンパク質である。マウス卵母細胞と初期胚では GFAP は検出できていないが (Lehtonen ら, 1983), ブタとハムスター卵母細胞では, GV 期, MI 期ならびに MII 期卵で検出している (Suzuki ら, 未発表)。発育中の神経系では, ビメンチンがグリア予定細胞と神経予定細胞の両方が発現してから, 発生の途中で組織特異的な NF, GFAP ならびにネスチンが発現することが知られている (Herrmann と Aebi, 2000; Paramio ら, 2002; Magin ら, 2007)。これまで見てきたネスチン, NF と GFAP の神経系に関係する中間径線維が共通して卵母細胞の細胞質にメッシュ構造を構築しているのが観察されている。したがって, これらの線維タンパク質が哺乳動物卵において共存したり, 相互に置換したりというように協働している可能性が示唆される。さらに, 我々はブタ卵の卵丘細胞から伸びている細胞質突起に, 抗 GFAP, 抗デスミンならびに抗ビメンチン抗体陽性のシグナルを検出している。神経系に特異的なこれらの中間径線維は, 哺乳動物卵において, これまで知られていない機能を果たしている可能性が示唆される。

## 6. 初期胚における中間径線維ケラチンの分布変化

図8に示したように, ハムスター初期胚においても中間径線維ケラチンの局在が確認された。2細胞期胚では, 核の周囲にケラチンが集中し (図8a-1), さらに細胞膜下から核へと続くケラチンが太い線維構造を示していた (図8a-2)。4細胞期胚でも, 核周囲のケラチン (図4b-1) と割球表層の太い繊維構造が観察された (図8b-2)。しかしながら, 初期8細胞期胚では表層の太い繊維構造は観察されず, 割球接着面にわずかに集中して認められた (図8c)。後期8細胞期胚と桑実胚では割球接着面へケラチンが集中していた (それぞれ図8d と 8e)。興味深いことに, 桑実胚の外部割球の頭頂部に顆粒状のケラチンが集積していた (図8e)。後期8細胞期同様に割球接着面へ集中し, 胚最外側の細胞膜下での密度が増加していた。初期胚盤胞期では, 胚最外側の細胞膜下にケラチンが集積していて, あたかも外壁を構築するように観察された (図8f)。

2細胞期から4細胞期胚ではケラチンが核周辺と, 表層には太い線維構造を示すのが特徴的であった。割球サイズが小さくなるにつれて減少することから, 割球が大型の時に物理的抵抗性を付与する構造的特徴なのかもしれない。あるいはまた, 最近, 特定の細胞骨格において

報告されているような mechanosensor の因子として機能している可能性もある (Gregor ら, 2014)。細胞膜直下に構築されたケラチンのネットワークが核にシグナルを伝達している構造とも受け取れ、大変興味深い。

一方, 8細胞期以降, とくに胚の緊密化 (コンパクトン) が開始する後期8細胞期以降には割球接着面にケラチンが集中していたので, コンパクトンの過程にケラチンが関与している可能性が示唆された。ケラチンが集積することにより割球の物理的な密着性が增强されるのかもしれない。そして, 胚盤胞では栄養膜外胚葉の膜直下にケラチンが集積し, 密着結合への結合様式の変遷とも相まって外部環境に対する抵抗性を增强しているものと推察される。密着結合で連結された栄養膜外胚葉細胞は胞胚腔の形成にも関与している (Kwon ら, 2016)。

## 7. おわりに

微小管やマイクロフィラメントと異なり, 中間径線維は多様なタンパク質から構成され, 機能も広範にわたっている。また, 中間径線維は極性がない構造なので, 特異的なモータータンパク質ももたないとされている。細胞骨格という名称には静的で堅牢なイメージがあるが, 細胞質内で劇的に配置転換するので, 物理的抵抗性を単に付与しているだけではなさそうである。中間径線維に関する最近の研究では, 細胞成長, 細胞小器官の再配置, シグナル伝達ならびに遺伝子発現に関与することが示唆されている。中間径線維タンパク質は微小管やマイクロ

フィラメントとも協働している事例も報告されており, またキネシン, ダイニンやミオシンなどのモータータンパク質の供用の可能性も捨てきれない。したがって, 哺乳動物卵においても中間径線維タンパク質が他の細胞骨格系タンパク質とどのように相互作用しているのかを, 今後明らかにしていく必要がある。

## 謝 辞

実験遂行に協力いただいた研究室歴代の学生諸氏に感謝いたします。本研究は JSPS 科学研究費補助金 (課題番号 17580243, 21580340, 24580403) の支援を受けた。

## 引用文献

- Abe H, Otoi T, Tachikawa S, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. *Anat. Embryol.*, 199:519-527. 1999.
- Almeida PA, Bolton VN. The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organization and chromosomal constitution of the human oocyte. *Zygote*, 3: 357-365. 1995.
- Allworth AE, Albertini DF. Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Dev. Biol.*, 158: 101-112. 1993.
- Aman RR, Parks JE. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro matured

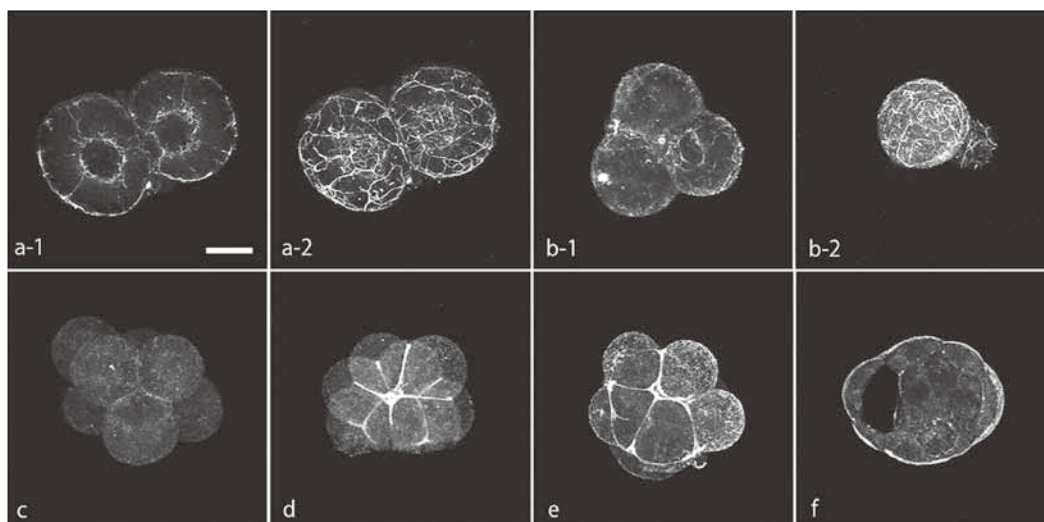


図8. ハムスター初期胚における中間径線維ケラチンの局在

a-1, 核周辺に焦点を合わせた2細胞期胚。a-2, a-1と同一の胚で表層のケラチン局在も示す。b-1, 核周辺に焦点を合わせた4細胞期胚のうちの3割球。b-2, b-1と同一の胚の1割球で, 割球表層のケラチン局在を示す。割球表層に比較的太いケラチン線維が観察される (a-2とb-2)。c, 初期8細胞期胚, 表層には太いケラチン線維は認められない。d, 後期8細胞期胚。e, 桑実期胚。割球間にケラチンが強染していた (d, e)。f, 初期胚盤胞, 胚の外表面にケラチンが集中していた。

- bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 50: 103-110. 1994.
110. Anderson E, Albertini DF. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J. Cell Biol.*, 71: 680-686. 1976.
- Appert A, Fridmacher V, Locquet O, Magre S. Patterns of keratins 8, 18 and 19 during gonadal differentiation in the mouse: sex- and time-dependent expression of keratin 19. *Differentiation*, 63: 273-284. 1998.
- Baumgartner AP, Chrisman CL. Cytogenetic analysis of ovulated mouse oocytes following hyperthermic stress during meiotic maturation. *Exp. Cell Res.*, 132: 359-366. 1981.
- Barnett DK, Kimura J, Bavister BD. Translocation of active mitochondria during hamster preimplantation embryo development studied by confocal laser microscopy. *Dev. Dyn.*, 205: 64-72. 1996.
- Barnett DK, Clayton MK, Kimura J, Bavister BD. Glucose and phosphate toxicity in hamster preimplantation embryos involves disruption of cellular organization, including distribution of active mitochondria. *Mol. Reprod. Dev.*, 48: 227-237. 1997.
- Bavister BD. Interactions between embryos and the culture milieu. *Theriogenology*, 53: 619-626. 2000.
- Chang L, Goldman RD. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5: 601-613. 2004.
- Combelles CMH, Cekleniak NA, Racowsky C, Albertini DF. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. *Hum. Reprod.*, 17:1006-1016. 2002.
- Czernobilsky B, Moll R, Levy R, Franke WW. Co-expression of cytokeratin and vimentin filaments in mesothelial, granulosa and rete ovarii cells of the human ovary. *Eur. J. Cell Biol.*, 37: 175-190. 1985.
- Da Silva-Buttkus P, van den Hurk R, te Velde ER, Taverne MAM. Ovarian development in intrauterine growth-retarded and normally developed piglets originating from the same litter. *Reproduction*, 126: 249-258. 2003.
- Eliasson C, Sahlgren C, Berthold CH, Stakeberg J, Celis JE, Betsholtz C, Eriksson JE, Pekny M. Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J. Biol. Chem.*, 274: 23996-24006. 1999.
- Fridmacher V, Locquet O, Magre S. Differential expression of acidic cytokeratins 18 and 19 during sexual differentiation of the rat gonad. *Development*, 115: 503-517. 1992.
- Gall L, Le Guen P, Huneau D. Cytokeratin-like proteins in the sheep oocyte. *Cell Differ. Dev.*, 28: 95-104. 1989.
- Gallicano GI, Larabell CA, McGaughey RW, Capco DG. Novel cytoskeletal elements in mammalian eggs are composed of a unique arrangement of intermediate filaments. *Mech. Dev.*, 45: 211-226. 1994.
- Gallo A, Tosi, E. Cytoskeletal elements and the reproductive success in animals. In *The Cytoskeleton in Health and Disease* (Schatten H. ed.), 147-166. Springer, New York. 2015.
- Goldman RD, Grin B, Mendez MG, Kuczmarowski ER. Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 20: 28-34. 2008.
- Gregor M, Osmanagic-Myers S, Burgstaller G, Wolfram M, Fischer I, Walko G, Resch GP, Jörgl A, Herrmann H, Wiche G. Mechanosensing through focal adhesion-anchored intermediate filaments. *FASEB. J.*, 28: 715-729. 2014.
- Gumus E, Bulut HE, Kaloglu C. Cytoskeletal changes in oocytes and early embryos during in vitro fertilization process in mice. *Anat. Histol. Embryol.*, 39: 51-58. 2010.
- Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12: 79-90. 2000.
- Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Hatzirodos N, Bonner W, Sabatier L, Reinhardt DP, Sado Y, Ninomiya Y, Wilhelm D, Rodgers RJ. A new model of development of the mammalian ovary and follicles. *PLoS One*, 8(2): e55578. doi: 10.1371/journal.pone.0055578. 2013.
- Ishikawa, H., Bischoff, R. and Holtzer, H. Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, 38: 538-555. 1968.
- Ju JC, Tseng JK. Nuclear and cytoskeletal alterations of in vitro matured porcine oocytes under hyperthermia. *Mol. Reprod. Dev.*, 68: 125-133. 2004.
- Ju JC. Cellular responses of oocytes and embryos under thermal stress: hints to molecular signaling. *Anim. Reprod.*, 2: 79-90. 2005.
- Kabashima K, Matsuzaki M, Suzuki H. Both microtubules and microfilaments mutually control the distribution of mitochondria in two-cell embryos of golden hamsters. *J. Mamm. Ova Res.*, 24: 120-125. 2007.
- Kabashima K, Matsuzaki M, Suzuki H. Intermediate filament keratin dynamics during oocyte maturation requires maturation/M-phase promoting factor and mitogen-activated protein kinase activities in the hamster. *Reprod. Domest. Anim.*, 45: e184-e188. 2010.

- Khan-Dawood FS, Yusoff Dawood M, Tabibzadeh S. Immunohistochemical analysis of the microanatomy of primate ovary. *Biol. Reprod.*, 54: 734-742. 1996.
- Kim NH, Chung HM, Cha KY, Chung KS. Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. *Hum. Reprod.*, 13:2217-2222. 1998.
- Krisher RL, Bavister BD. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*, 49: 103-114. 1998.
- Kwon J, Kim, NH. Choi I. ROCK activity regulates functional tight junction assembly during blastocyst formation in porcine parthenogenetic embryos. *Peer J.* 2016 Apr 11;4:e1914. doi: 10.7717/peerj.1914. eCollection.
- Lane M, Bavister BD. Calcium homeostasis in early hamster preimplantation embryos. *Biol Reprod* 59: 1000-1007. 1998.
- Lehtonen E, Lehto VP, Vartio T, Badley RA, Virtanen I. Expression of cytokeratin polypeptides in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev. Biol.*, 100: 158-165. 1983.
- Lehtonen E. A monoclonal antibody against mouse oocyte cytoskeleton recognizing cytokeratin-type filaments. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 90: 197-209. 1985.
- Liu RH, Sun QY, Li YH, Jiao LH, Wang WH. Effects of cooling on meiotic spindle structure and chromosome alignment within in vitro matured porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 65: 212-218. 2003.
- Magin TM, Vijayaraj P, Leube RE. Structural and regulatory functions of keratins. *Exp. Cell Res.*, 313: 2021-2032. 2007.
- Magistrini M, Szöllösi D. Effects of cold and isopropyl-N-phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocytes. *Eur. J. Cell Biol.*, 22: 699-707. 1980.
- Marettová E, Marett M. Demonstration of intermediate filaments in sheep ovary. *Acta. Histochem.*, 104: 431-434. 2002.
- Marvin MJ, Dahlstrand J, Lendahl U, McKay RD. A rod end deletion in the intermediate filament protein nestin alters its subcellular localization in neuroepithelial cells of transgenic mice. *J. Cell Sci.*, 111: 1951-1961. 1998.
- Moor RM, Crosby IM. Temperature induced abnormalities in sheep oocytes during maturation. *J. Reprod. Fertil.*, 75: 467-473. 1985.
- Mora JM, Fenwick MA, Castle L, Baithun M, Ryder TA, Mobberley M, Carzaniga R, Franks S, Hardy K. Characterization and significance of adhesion and junction-related proteins in mouse ovarian follicles. *Biol. Reprod.*, 86: 153, 1-14. 2012.
- Muggleton-Harris AL, Brown JJ. Cytoplasmic factors influence mitochondrial reorganization and resumption of cleavage during culture of early mouse embryos. *Hum. Reprod.*, 3: 1020-1028. 1988.
- Paramio JM, Jorcano JL. Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling? *Bioessays*, 24: 836-844. 2002.
- Pickering SJ, Johnson MH. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocytes. *Hum. Reprod.*, 2: 207-216. 1987.
- Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil. Steril.*, 54: 102-108. 1990.
- Plancha CE, Carmo-Fonseca M, David-Ferreira JF. Cytokeratin filaments are present in golden hamster oocytes and early embryos. *Differentiation*, 42: 1-9. 1989.
- Plancha CE. Cytokeratin dynamics during oocyte maturation in the hamster requires reaching of metaphase I. *Differentiation*, 60: 87-98. 1996.
- Rhoades MM. Meiosis. In *The Cell* vol. 3. (Brachet J, Mirsky AE eds.), 1-75. Academic Press, New York. 1961.
- Santini D, Ceccarelli C, Mazzoleni G, Pasquinelli G, Jasonni VM, Martinelli GN. Demonstration of cytokeratin intermediate filaments in oocytes of the developing and adult human ovary. *Histochemistry*, 99: 311-319. 1993.
- Sathananthan AH, Trounson A, Freemann L, Brady T. The effects of cooling human oocytes. *Hum. Reprod.*, 3: 968-977. 1988.
- Sjöberg G, Jiang WQ, Ringertz NR, Lendahl U, Sejersen T. Colocalization of nestin and vimentin/desmin in skeletal muscle cells demonstrated by three-dimensional fluorescence digital imaging microscopy. *Exp. Cell Res.*, 214: 447-458. 1994.
- Steinert PM, Chou YH, Prahlad V, Parry DA, Marekov LN, Wu KC, Jang SI, Goldman RD. A high molecular weight intermediate filament-associated protein in BHK-21 cells is nestin, a type VI intermediate filament protein. *J. Biol. Chem.*, 274: 9881-9890. 1999.
- Sun QY, Wu GM, Lai L, Park KW, Cabot R, Cheong HT, Day BN, Prather RS, Schatten H. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction*, 122:155-163. 2001.

- Sun XF, Zhang WH, Chen XJ, Xiao GH, Mai WY, Wang WH. Spindle dynamics in living mouse oocytes during meiotic maturation, ageing, cooling and overheating: a study by polarized light microscopy. *Zygote*, 12:241-249. 2004.
- Suzuki H, Kida R, Moriguchi M. Effects of age and repeatedly mating on litter size in golden hamsters. *Bull. Fac. Agric. Hirosaki Univ.*, 59: 88-97. 1995.
- Suzuki H, Moriguchi M, Kida R, Moro Y. Delay in ovulation and fertilization and asynchronous pronuclear development in aged hamsters. *J. Reprod. Dev.*, 42: 15-22. 1996.
- Suzuki H, Ju JC, Parks JE, Yang X. Surface ultrastructural characteristics of bovine oocytes following heat shock. *J. Reprod. Dev.*, 44: 345-351. 1998.
- Suzuki H, Azuma T, Koyama H, Yang, X. Development of cellular polarity of hamster embryos during compaction. *Biol. Reprod.*, 61: 521-526. 1999.
- Suzuki H, Jeong B-S, Yang X. Dynamic changes of cumulus-oocyte cell communication during in vitro maturation of porcine oocytes. *Biol. Reprod.*, 63: 723-729. 2000.
- Suzuki H, Kagawa N, Toyokawa K. Parthenogenetic development and pronuclear migration and cytoskeletal organization of porcine oocytes activated by various stimuli. *J. Mamm. Ova Res.*, 19: 96-103. 2002a.
- Suzuki H, Takashima Y, Toyokawa K. Parthenogenetic development and cytoskeletal distribution of porcine oocytes treated by means of electric pulses and cytochalasin D. *J. Mamm. Ova Res.*, 19: 6-11. 2002b.
- Suzuki H, Satoh M, Toyokawa K. Changes in distribution of active mitochondria during oocyte maturation and fertilization in the hamster. *J. Mamm. Ova Res.*, 22: 163-169. 2005.
- Suzuki H, Saito Y. Cumulus cells affect distribution and function of the cytoskeleton and organelles in porcine oocytes. *Reprod. Med. Biol.*, 5: 183-194. 2006.
- Suzuki H, Satoh M, Kabashima K. Distributions of mitochondria and the cytoskeleton in hamster embryos developed in vivo and in vitro. *J. Mamm. Ova Res.*, 23: 128-134. 2006.
- Suzuki H, Kumai T, Matsuzaki M. Effect of temperature decline on the cytoskeletal organization of the porcine oocyte. *J. Mamm. Ova Res.*, 24: 107-113. 2007.
- Suzuki H, Koyama K, Kabashima K, Fang J, Matsuzaki M. Temporary inhibition of germinal vesicle breakdown by Rho kinase inhibitor Y-27632 is detrimental to oocyte maturation. *J. Mamm. Ova Res.*, 28: 126-130. 2011.
- Suzuki H. Cytoskeleton and regulation of mitochondrial translocation in mammalian eggs. In *The Cytoskeleton in Health and Disease* (Schatten H. ed.), 169-186. Springer, New York. 2015a.
- Suzuki H. Possible functions of intermediate filaments in mammalian ovarian follicles and oocytes. In *The Cytoskeleton in Health and Disease* (Schatten H. ed.), 307-333. Springer, New York. 2015b.
- Takahashi N, Itoh MT, Ishizuka B. Human chorionic gonadotropin induces nestin expression in endothelial cells of the ovary via vascular endothelial growth factor signaling. *Endocrinology*, 149: 253-260. 2008.
- Takahashi N, Ishizuka B. The involvement of neurofilament heavy chain phosphorylation in the maturation and degeneration of rat oocytes. *Endocrinology* 153:1990-1998. 2012.
- Thibault C, Szölosi D, Gérard M. Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Dev.*, 27: 865-896. 1987.
- Tokura T, Noda Y, Goto Y, Mori T. Sequential observation of mitochondrial distribution in mouse oocytes and embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 10: 417-426. 1993.
- van Blerkom J. Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5031-5035. 1991.
- van den Hurk R, Dijkstra G, van Mil FN, Hulshof SC, van den Ingh TS. Distribution of the intermediate filament proteins vimentin, keratin, and desmin in the bovine ovary. *Mol. Reprod. Dev* 41: 459-467. 1995.
- Wendl J, Ebach K, Rodler D, Kennigott RA. Immunocytochemical localization of cytoplasmic and nuclear intermediate filaments in the bovine ovary during folliculogenesis. *Anat. Histol. Embryol.*, 41: 190-201. 2012.
- Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM. Nestin expression: a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol. Life Sci.*, 61: 2510-2522. 2004.