

ブタ卵胞内卵子の体外成熟分裂に伴う タンパク質合成

山内 伸彦・佐々田 比呂志・菅原 七郎

東北大学農学部動物生殖科学講座 宮城県仙台市 〒981

要旨. ブタ卵胞内卵子の体外成熟分裂の進行とタンパク質合成の関係を明らかにするために、タンパク質合成阻害剤である cycloheximide (10 μg/ml) を用い検討した。その結果、タンパク質の合成阻害によって、卵核胞崩壊および第一減数分裂から第二減数分裂への移行が妨げられた。また、培養 24 および 30 時間での処理によって、前核形成がみられた。さらに、^{[35]S} methionine を用いた SDS-PAGE により、対外成熟過程中のタンパク質合成の変化を経時的に調べた。その結果、培養 0~18 時間では 27, 47, 49 および 70kDa のタンパク質が特異的に合成され、培養 24 時間以降では 25 および 63kDa のタンパク質が特徴的に現われた。また、39 および 92kDa のタンパク質は全ての時間帯で合成された。これらの結果から、ブタ卵子の成熟分裂の進行には卵核胞崩壊と第一減数分裂から第二減数分裂への移行にタンパク質の合成が必要であり、培養 18~24 時間で合成パターンが変化することが明らかとなった。

キーワード：ブタ、成熟分裂、タンパク質合成、シクロヘキシミド。

多くの哺乳動物において、卵子の減数分裂の進行とタンパク質の合成との関係が、特に GVBD (germinal vesicle breakdown) の点において研究されてきた；ヒツジおよびウシではタンパク質の合成を阻害すると GVBD が妨げられ [3, 8]、マウスでは GVBD にタンパク質の合成を必要としない [12]。ブタ卵子では、Kubelka ら (1988) は、染色体の凝縮および仁の消失はタンパク質合成を必要としないが、核膜の消失には必要であることを報告している。最近の研究で、ブタ卵子で M1 期への移行に成熟促進因子 (MPF; [7]) の活性上昇が必要であること [10] が示唆されている。一方、アフリカツメガエルでは、M2 期では細胞分裂抑制因子 (CSF; [6]) が

機能して減数分裂を停止させていることが明らかにされており [11]、哺乳類卵子でも同様の機能を持った物質が成熟中に合成されていることが考えられている。このように、減数分裂の進行に伴うタンパク質の合成の関与が明らかにされているものの、ブタ卵子において GVBD 以降の核ステージ (M1 期, A1・T1 期および M2 期) への進行とタンパク質合成の関係についてはほとんど検討されていない。

本研究では、ブタ卵子の体外成熟分裂の進行とタンパク質合成の関係を明らかにするために、タンパク質合成阻害剤である cycloheximide を用い検討した。さらに、^{[35]S} methionine を用いた SDS-PAGE により、体外成熟過程中のタンパク質合成の変化を経時的に調べた。

材料および方法

卵胞内卵子の採取：未経産ブタより採取した卵巢を約 37°C の温水中に保温し、屠殺後 1 時間以内に屠場より実験室へ持ち帰った。卵胞内卵子を、18G の注射針を取り付けた 10 ml 用の注射器で、直径 3~5 mm の卵胞より吸引採取した。採取後卵子を実体顕微鏡下で観察し、卵丘細胞が 2~3 層以上密着し、卵細胞質が均一な卵子のみを選別し、以下の実験に用いた。

培養液と培養条件：卵胞内卵子の成熟培地として、sodium pyruvate 100 mg/l, glucose 550 mg/l, calcium lactate 900 mg/l, NaHCO₃ 2,106 mg/l, dibecacin sulphate 100 mg/l (明治製薬), 性ホルモン (ピーメックス 10 IU/ml : 三共ゾーキ, hCG 10 IU/ml : 農水省動植物研究提供, oestradiol-17β 1 μg/ml : Sigma) および 10% 牛胎子血清 (FCS : Flow Lab.) を添加した修正 TCM199 (ニッスイ) を用いた。35 mm の培養用ディッシュ (住友メディカル) に成熟培地 100 μl のドロップを作製し、ミネラルオイル (SQUIBB) で覆い、1 ドロップ中に卵胞内卵子を 20~30 個入れ培養した。培養は 39°C, 5% CO₂, 95% Air および高湿度の条件下で行った。

(受付 1994 年 12 月 19 日／受理 1995 年 1 月 4 日)

別刷請求先：〒981 仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1
東北大学農学部動物生殖科学講座

タンパク質合成阻害: 培養開始0, 6, 12, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 および42時間で卵子を cycloheximide (Sigma) を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加した成熟培地に移し、それぞれ培養開始後48時間まで継続培養した。培養終了後、0.2% ヒアルロニダーゼ-PBS（-）溶液中で卵丘細胞を除去し、アセトエタノール（酢酸:エタノール=1:3）で4~5日間常温で固定後、0.1% アセトオルセインで染色しホールマウント標本を作製した。一部の卵子を、培養開始0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 および48時間で直ちに固定・染色し、減数分裂の進行を調べた。

合成タンパク質の検出: 合成タンパク質を検出するため、卵子を培養48時間中6時間間隔で取り出し、 $[^{35}\text{S}]$ methionine (Amersham), 37 MBq/ml を含むmPBS [8] で3時間培養した。終了後、卵丘細胞を除去し10個の卵子を $30 \mu\text{l}$ の SDS 溶液 [5] に溶解した。

標識タンパク質は SDS-PAGE で分離した [5]。分離ゲル中のアクリルアミド濃度は 12.5%とした。標準物質として、 $20 \mu\text{l}$ の Rainbow Protein Molecular Markers (Amer-sham) を用いた。泳動後、ゲルを Amplify (Amersham) で 15~30 分処理し、フルオログラフィーを行った。ゲルは乾燥後、Kodak-XAR5 フィルムに7~10日暴露した (-80°C)。

結果

体外培養条件下での減数成熟分裂の進行: 減数分裂の進行を、卵核胞期 (GV 期), 第一成熟分裂中期 (M1 期), 第一成熟分裂後期・終期 (A1・T1 期) および第二成熟分裂中期 (M2 期) の四つに分類し、核相の状態を判定した。その結果 (Fig. 1), 培養開始0時間では、全ての卵子が GV 期の核相であった。培養開始12時間までほとんどの卵子は GV 期の核相のままであったが、18時間からその割合は減少し、30時間でほとんど見られなかった。

M1 期の核相の卵子は培養開始後6時間から現われ、24時間で 70% 以上の卵子が M1 期の核相であった。M1 期と M2 期の移行期である A1・T1 期の核相は 24 時間および 30 時間でみられ、その割合はそれぞれ 10.8% および 35.7% であった。M2 期の核相を持った卵子は培養開始から 24 時間まで見られなかつたが、30 時間でその割合は 28.6% となり、36 時間では 68.8% まで急激に増加し、42 時間でほぼ一定の高い値に達した (70~80%)。

タンパク質合成阻害の影響: Cycloheximide ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) を培地に添加し、減数分裂の進行におけるタンパク質合成の関与を調べた (Table 1)。培養0時間からの添加区、すなわち48時間連続暴露で、全ての卵子で染色体凝縮と仁の消失は見られたが、核膜の消失はみられず、GVBD は起こらなかつた。0時間からの添加区以外のいずれの区で GVBD が起こり M1 期の卵子が見られ、M2 期への進行は経時に増加した。A1・T1 期の卵子はどの添

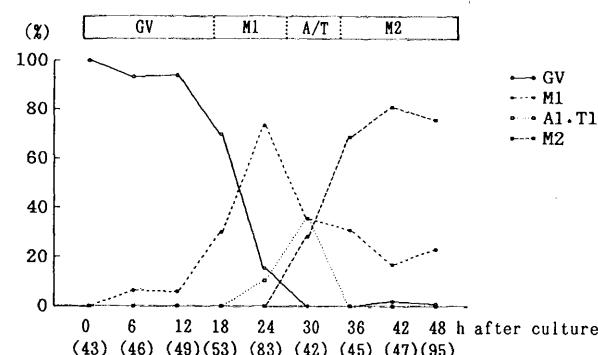


Fig. 1. Changes in nuclear status of porcine oocytes matured *in vitro*. Results are expressed as percentage of oocytes with each stage of maturation at each time. A typical time course of nuclear status is indicated by the horizontal bar. The number of oocytes examined is shown in the parenthesis at bottom of each time.

Table 1. Nuclear status of porcine oocytes matured *in vitro*, followed by subsequent culture with cycloheximide

Nuclear status of oocytes	Time(h) of cycloheximide addition ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)											
	0	6	12	18	21	24	27	30	33	36	42	48 ²
Germlinal vesicle-stage	100*	73	49	42	18	1	2	—	—	1	1	1
Metaphase I	—	27	51	50	68	44	11	4	22	15	17	23
Ana. I + Tel. I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Metaphase II	—	—	—	3	10	39	63	60	61	74	80	76
P.N. ¹ formation	—	—	—	5	4	16	24	36	17	10	2	—
Total no. of oocytes examined	79	85	88	89	95	77	89	84	85	93	91	95

* Values in each nuclear status are expressed as % of the oocytes.

¹ P.N.= pronucleus.

² Control with no addition.

加区でも見られなかった。M2期に達した卵子は36時間以降の添加区でほぼ一定の値であり(70~80%)、阻害剤無添加区の成熟率と有意差はなかった。また、18~42時間の区で前核を形成した卵子が見られ、30時間でその割合は35.7%であった。

成熟過程におけるタンパク質合成: 培養48時間中のタンパク質合成パターンを6時間間隔で調べた(Fig. 2)。成熟培養0~18時間にかけて27, 47, 49および70kDaに相当するタンパク質の合成がみられたが、それ以後の成熟過程では認められなかった。培養24時間以降では25および63kDaのタンパク質が新たに合成された。一方、39および92kDaのタンパク質は成熟過程の全ての時間帯で合成されていることが認められた。

考 察

ブタ卵子の減数分裂の進行におけるタンパク質合成の関与を検討した結果、GVBDとM1期からM2期への移行に、それぞれタンパク質合成が必要であることが、本研究で明らかになった。すなわち、GV期からGVBDへの移行で染色体凝縮と仁の消失が完了していたが、核膜の崩壊が見られなかった。この結果は、Kubelkaら(1988)の結果と一致する。現在までに、この因子は同定されていないが、GV期からM1期へ移行するときにMPF活性の上昇が起こることがNaito & Toyoda(1991)によって

報告されている。したがって、MPFあるいはそれに関連したタンパク質がこの時期に合成された場合、GVBDを引き起こす因子として作用する可能性が示唆される。

培養開始後6時間から24時間でタンパク質合成を阻害した場合、48時間後でM1期で減数分裂を停止している卵子の割合が高かった。さらに、A1・T1期の卵子が全く出現しなかった。このことは、無処理の卵子で24時間以降M1期からA1・T1期へ進行することを考え合わせると、M1期からM2期への移行にタンパク質合成が必要であることを示している。マウス卵子では、タンパク質の合成を阻害すると、M1期からM2期への移行が阻害される[12]。ウシおよびヤギ卵子においても、cycloheximideを用いた解析によって同様の結果が得られており[2, 14]、M1期からM2期への移行に関する因子やメカニズムに関して、哺乳類で共通した機構が存在することが示唆される。この点については今後解明することが課題であろう。

培養開始後30時間前後のタンパク質合成阻害では、48時間までの培養で前核を形成した卵子が見られた。マウスではM2期に達した卵子のタンパク質の合成を阻害すると、前核を形成し活性化が誘起されることが報告されている[13]。本研究の結果では、培養30時間でM2期に達した卵子の割合は28.6%であり(Fig. 1)、これらの卵子がタンパク質合成阻害により活性化されたことが考えられるが、この培養時間ではA1・T1期の卵

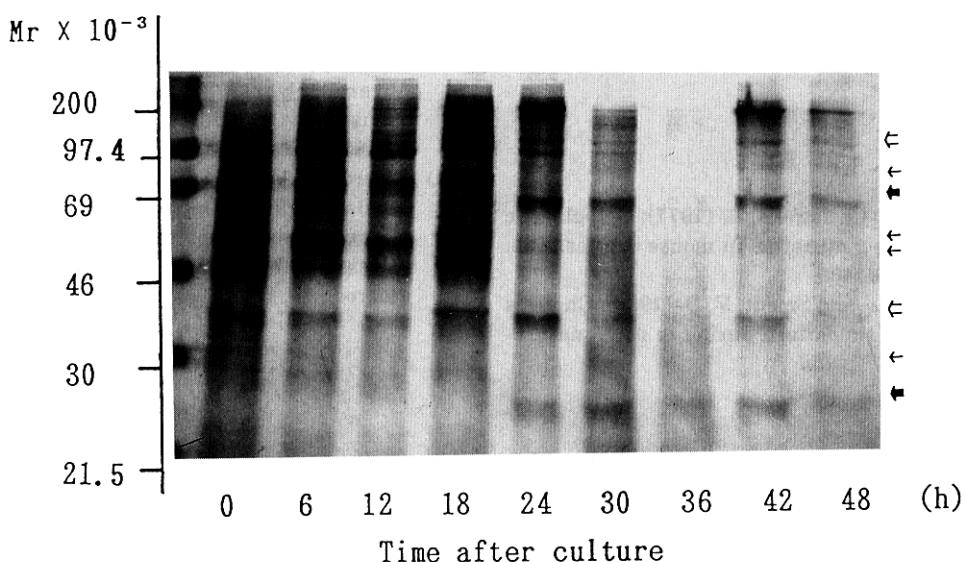


Fig. 2. Fluorogram of $[^{35}\text{S}]$ -labelled polypeptides in porcine oocytes during *in vitro* meiotic maturation. Typical protein synthesis patterns are revealed at Mr 27000, 47000, 49000 and 70000 between 0~18 h (\leftarrow), at Mr 25000 and 63000 between 24~48 h (\Rightarrow) and at Mr 39000 and 92000 between 0~48 h ($\Leftarrow\rightleftharpoons$).

子の割合が最も高い。また、M2期の卵子の割合が80%以上である培養42時間で合成を阻害しても、前核を形成した卵子の割合はほとんど見られなかった。これらの実験結果から、ブタ卵子ではM2期以前のA1・T1期でタンパク質合成を阻害することによって前核形成が起こることが考えられる。ウシおよびヤギ卵子において同様の傾向があることが報告されている[2, 14]。さらに、M2期では細胞分裂抑制因子(CSF)が存在し、減数分裂をM2期で停止させていることが、アフリカツメガエル[6]およびマウス[1]の卵子で明らかにされている。本実験の結果で、前核形成の見られた卵子は減数分裂がM2期で停止せず進行していたことを示しており、ブタ卵子でA1・T1期にCSFに関連した因子が合成されている可能性が示唆される。

多くの動物種で、卵子の成熟過程でタンパク質合成の再構成が起こることが確かめられているが、核ステージとタンパク質合成パターンの関係については詳細な検討はなされていない。ブタでは、GV期とM2期での合成パターンが異なることが明らかにされているに過ぎない[9]。本研究では、培養開始から48時間まで6時間間隔で合成タンパク質を標識し、合成パターンの経時的な変化を解析した。その結果、培養後18~24時間にかけて明白な変化が認められた(Fig. 2)。この時期の卵子は減数分裂のM1期に相当する(Fig. 1)ことから、M1期にタンパク質合成の再構成が起こることが示唆された。さらに、これらの合成されたタンパク質が前述したM1期からM2期に進行する過程で重要な役割を持っていることが推察される。今後、これらのタンパク質の同定をし、成熟分裂進行過程における役割を明らかにする必要がある。

文 献

- 1) Balakier, H. and Czolowska, R. (1977): Cytoplasmic control of nuclear maturation in mouse oocytes. *Exp. Cell Res.*, 110, 466–469.
- 2) Gal, F. L., Gall, L. and Smedt, V. D. (1992): Changes in protein synthesis pattern during *in vitro* maturation of goat oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 32, 1–8.
- 3) Hunter, A. G. and Moor, R. M. (1987): Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. *J. Dairy. Sci.*, 70, 1646–1652.
- 4) Kubelka, M., Motlik, J., Fulka, J. Jr., Prochazka, R., Rimkevicova, Z. and Fulka, J. (1988): Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. *Gamete Res.*, 19, 423–431.
- 5) Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- 6) Masui, Y. and Markert, C. (1971): Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.*, 177, 129–146.
- 7) Masui, Y. and Clarke, H. J. (1979): Oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.*, 57, 185–282.
- 8) Moor, R. M. and Crosby, I. M. (1986): Protein requirements for germinal vesicle breakdown in ovine oocytes. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 94, 207–220.
- 9) Moor, R. M., Mattioli, M., Ding, J. and Nagai, T. (1990): Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 40, 197–210.
- 10) Naito, K. and Toyoda, Y. (1991): Fluctuation of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 93, 467–473.
- 11) Sagata, N., Watanabe, N., Vande Woude, G. F. and Ikawa, Y. (1989): The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature*, 342, 512–518.
- 12) Schultz, R. M. and Wassarman, P. M. (1977): Biochemical studies of mammalian oogenesis: Protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *J. Cell Sci.*, 24, 167–194.
- 13) Siracusa, G., Whittingham, D. G., Molinaro, M. and Vivarelli, E. (1978): Parthenogenetic activation of mouse oocytes induced by inhibitors of protein synthesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 43, 157–166.
- 14) Sirard, M. A., Florman, H. M., Leibfried-Rutledge, M. L., Barnes, F. L., Sims, M. L. and First, N. L. (1989): Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 40, 1257–1263.

Protein Synthesis in Porcine Follicular Oocytes during In Vitro Meiotic Maturation

Nobuhiko Yamauchi, Hiroshi Sasada and Shichiro Sugawara

*Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture,
Tohoku University, Sendai 981, Japan*

To investigate protein synthesis associating with *in vitro* meiotic maturation in porcine oocytes, follicular oocytes were treated with cycloheximide (10 µg/ml) at 6 h intervals in the culture up to 48 h. Germinal vesicle breakdown(GVBD) but not chromatin condensation was blocked in the oocytes when they were treated at either 0, 6 or 12 h after culture. Also, the transition from metaphase-1(M1) to metaphase-2(M2) was prevented. Pronuclear formation was observed in the oocytes when treated at 24 to 30 h after culture. Using [³⁵S]methionine,

the profile of protein synthesis revealed that the proteins of 27, 47, 49 and 70kDa were detected only at 0 to 18 h and that new proteins of 25 and 63kDa were appeared from 24 to 48 h with presence of proteins of 39 and 92kDa throughout culture. These results suggest that in porcine oocytes GVBD and the transition from M1 to M2 require protein synthesis and that the remodelling of protein synthesis occurs at 24 h after *in vitro* culture.

Key words: Pig, Meiotic maturation, Protein synthesis, Cycloheximide.