

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20170

研究課題名(和文) 加齢に伴うコンドロイチン硫酸の減少による多核割球形成機構の解析

研究課題名(英文) Reduction of Chondroitin sulfate chains with aging is involved in formation of multi-nucleated blastomeres in mouse

研究代表者

佐藤 伴 (SATO, BAN)

筑波大学・生命環境系・特任助教

研究者番号：90443126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：高齢の不妊患者の生殖補助医療後の胚では、多核割球が高頻度に形成され妊孕性低下の原因となっている。多核割球の形成機序を解明するために以下の二つの研究に着目した。コンドロイチン硫酸(CS)鎖の欠損胚では多核割球が形成され、さらに生体内においても骨格筋の分化過程でCS鎖の減少が多核化・融合の過程に重要である。加齢に伴うCS鎖の減少が、加齢疾患の原因となっている。本研究では、以上の二つの研究を基盤とし融合することで、加齢によるCS鎖の減少が多核割球形成の原因となっているという仮説を提唱し、検証した。その結果、CS鎖の減少は、細胞分裂の最終段階の不全を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Multi nucleated blastomeres (MNB) have been widely reported in in vitro cultured embryos derived from in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. The rate of chromosomal abnormalities increases as maternal age, resulting in a dramatically increased incidence of birth defects. Although the presence of MNB is considered abnormal and is possibly related various problem, the underlying mechanism of occurrence of MNB is poorly understood. To investigate the mechanism of MNB formation, we focused on two independent research topics. (1) The frequency of multinucleated blastomeres increases in chondroitin sulfate (CS) knockout embryos. (2) Several Age-related diseases cause by which the expression level of CS diminished with age. We hypothesized that formation of MNB is caused by reduction of CS chains with aging In this study, we revealed that CS chains moiety of CSPG decide the localization of abscission molecules in mouse preimplantation embryos by using live-cell imaging.

研究分野：生殖生物学

キーワード：マウス着床前胚 発生生物学 卵割 コンドロイチン硫酸 細胞質分裂

1. 研究開始当初の背景

高齢の不妊患者の生殖補助医療(ART) (IVF (人工授精) 及び ICSI (卵細胞質精子注入法))によって得られた着床前胚では、多核割球(MNB; Multi Nuclear Blastomere)が高頻度に形成され、流産率が高くなり、妊娠率が低下することが明らかとなっている (Staessen et al. Human Reproduction, 13, 1625-1631, 1998, Egil et al. J. Mamm. Ova. Res. 28, 118-125, 2011)。MNB がどのように形成されるかは、不適切な培養条件、低酸素状態の維持、遺伝的バックグラウンドなど様々な要因が考えられているが、不明な点が多く、回避策も確立されていない。そのため、MNB の形成機序を解明することは、不妊患者の軽減に貢献し、妊娠出産率の向上につながると思われる。本研究では、MNB 形成機序の解明のために、以下二つの事象に着目した。

(1) マウスや線虫では、プロテオグリカン(PG)上のコンドロイチン硫酸(CS)鎖が欠損したグルクロン酸転移酵素(GlcAT-1)ノックアウト(KO)胚や、着床前胚のCS鎖分解酵素(CSase)による消化によってMNBが形成され致死となることが所属研究室で明らかとなっている (Mizuguchi et al. Nature, 423, 443-448. 2003, Izumikawa et al. J. Biol. Chem., 285, 12190-12196, 2010)(図1)。さらに、骨格筋の分化過程においてもCS鎖の減少が多核化・融合に重要であるということが、最近明らかになっている (Mikami et al. J. Biol. Chem. 287, 38531-38542, 2012)。このように、CS鎖の減少そのものが、生体内において多核化を誘導する機構の一つとして提唱されている。

(2) さらに、一般に知られるように、CS鎖は加齢に伴って減少する。加齢に伴うCS

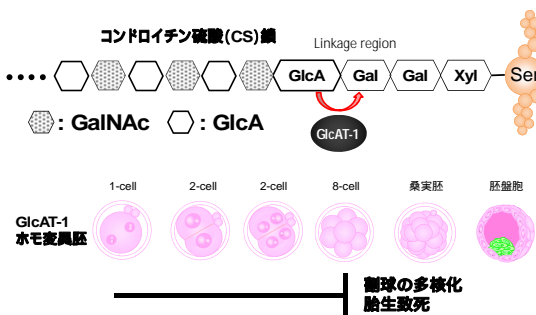


図1. CS鎖の生合成とGlcAT-1 KO マウス胚

鎖の減少は、加齢疾患である変形性関節症や、退行変性である皮膚の老化などの主要な原因だと考えられている。実際に、加齢に伴ってヒトの軟骨や皮膚組織中のCS鎖の鎖長が短くなり、その総量も減少していることが報告されている (Plaas et al. J. Biol. Chem., 272, 20603-20610., 1997, Carrino et al. Glycobiology, 21, 257-268., 2011)。生殖細胞において加齢に伴ってCS鎖の減少を示し

た報告は存在しないが、全身で加齢に伴いCS鎖が減少している可能性が想定される。

以上のことから、加齢に伴うCS鎖の減少が着床前期におけるMNB形成の原因となって妊孕性の低下に関与することが推察され、CS鎖欠損(GlcAT-1 KO)胚はMNB形成再現モデルになると着想した。

2. 研究の目的

本研究では、MNB形成再現モデルとしての卵特異的GlcAT-1KO胚、及び、研究代表者がこれまでに行ってきたライブイメージングを基軸とすることで、MNB形成機序の解明及び治療法の探索を目指す(Sato et al. BMC Dev. Biol, 11, 22, 2011)。(図2)

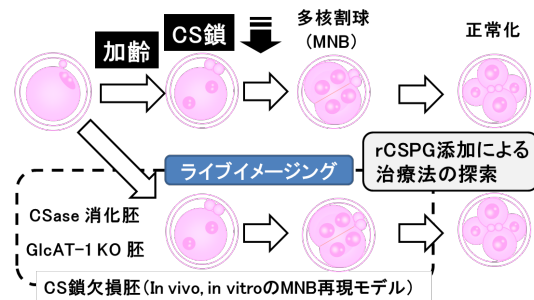


図2. 本研究の概要

3. 研究の方法

MNBの形成機構を解明するために以下の実験を行った。

(1) 細胞分裂最終段階に寄与するCSPGの探索

マウス着床前胚の網羅的遺伝子発現解析のデータベースより、1細胞期から4細胞期までに発現が確認されているCSPGをリストアップした。その後複数のCSPGについて免疫染色を行った。さらに、免疫染色によってMidbodyのCS鎖の局在が同じことが確認されたCSPGについては、mRNA発現系を構築し、マイクロインジェクション法によって1細胞期胚に導入し生細胞観察を行った。

(2) 細胞分裂関連因子の探索

過排卵処理を行った野生型及びGlcAT-1 KOマウスより2細胞期胚を採取後14時間後に4細胞期胚に到達している胚を選別し、2%パラフォルムアルデヒド溶液にて固定後、3%BSA-PBSにてブロッキングを行った。ブロッキング後以下の抗体を用い免疫染色を行った。一次抗体(anti-CS, anti-CSPG, anti-syntenin, anti-CHMP4b)。免疫染色後、共焦点顕微鏡にて観察した。

(3) CS鎖結合部位変異体CSPGの生細胞観察による動態解析

候補CSPGのcDNAをクローニングし、発現ベクターに挿入した。その後、部位特異的置換法を用いてCS鎖結合部位と考えられるセリン残基をアラニン残基に変換する

変異を導入した。複数存在する CS 鎖を一つのものにしたもの、すべて変換したものを作製した。作製した発現ベクターより *in vitro* にて mRNA を合成し、2 細胞期胚に導入し、生細胞観察によって卵割過程を観察した。

4. 研究成果

(1) 卵割最終段階に寄与する候補となる CSPG の探索

研究開始当初、候補として想定していたプロテオグリカンは、分裂最終段階に着床前胚において CS 鎖とは異なる局在を示したことから、新規の候補を探索する必要性が生じた(図3)。データベースを用いた解析によ

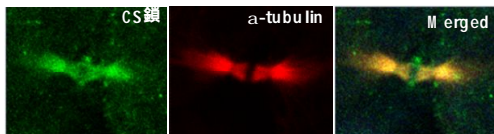


図3, CS 鎖の midbody への局在

て、新規の候補タンパク質を選抜し、それぞれの候補タンパクについて検討を行ったところ、CS の局在と同様の局在を示すプロテオグリカンの同定に成功した。これまでに、当該タンパク質と蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現する発現系を構築し、mRNA 作製後マウス着床前胚へマイクロインジェクション法によってマウス着床前胚に導入しタイムラプス観察を行った。その結果、当該タンパク質は卵割に伴って分裂溝へ集積すること、細胞質分裂の最終段階において細胞間架橋の中央体へ集積することを明らかにした。このことから、CS 鎖の付加されたプロテオグリカンは積極的に着床前胚の細胞質に関与している可能性が考えられた。

(2) 細胞分裂関連因子の局在解析

これまでに、GlcAT-1 KO マウスの着床前胚のライブイメージング解析によって、MNB の形成は細胞分裂最終段階の不全によって引き起こされることを明らかにしてきた。細胞分裂最終段階である細胞間の脱離 (Abcission) には、複数の細胞分裂関連因子が関与することが明らかとなっているが、その全貌はまだ明らかになっていない。Abcission は、細胞分裂の最終段階において細胞間に形成される Midbody が切断されるこという。この Midbody の切断の分子機構について、最近になっていくつかの分子が同定されたことが報告されている。本研究では、Abcission に関連する分子に着目し、それぞれ分子に対する抗体を用い免疫染色を行った。がん細胞を初めとした培養細胞において、Abcission は、Alix タンパク質及び Syntenin タンパク質を足場とすることで ESCRTIII が微小管を中心としてらせん状に重合することで、Midbody の一端を絞りきることで完了すると考えられている。しかしながら、Alix

や Syntenin の Abcission 時における局在の決定は、どのような分子が関わっているかについて不明のままである。そこで、本研究では、Alix, Syntenin, 及び ESCRTIII の構成タンパク質である CHMP4b の卵割時における局在を調べた。その結果、野生型では midbody 中心としてその周囲にそれぞれのタンパク質の局在が観察されたが、GlcAT-1 KO マウス胚では、各タンパク質の Midbody 中央部分へのリング状の集積が減少し、Midbody の両端に集積や細胞質全体への分布が観察された(図4)。

以上の結果は、CS 鎖を有する CSPG が Abcission 関連タンパク質の局在を決定している可能性が考えられた。

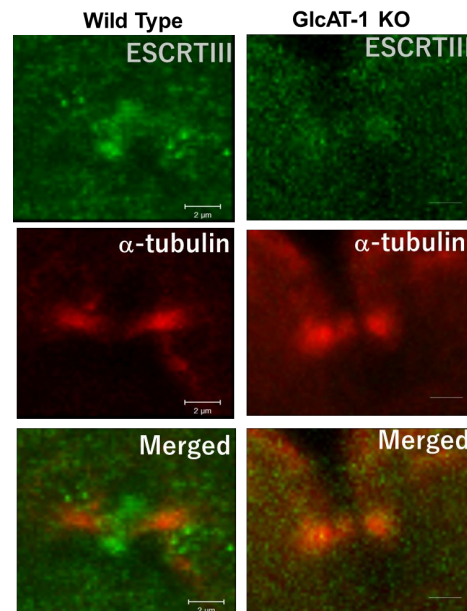


図4, Abcission 関連タンパク質の GlcAT-1 KO 胚での局在変化

(ESCRTIII)

(3) CS 鎖結合部位変異体 CSPG の生細胞観察による動態解析

一方で、これまでに CS 鎖の分解酵素でマウス着床前胚を消化した場合においても多核割球が形成されることが明らかとなっている。このことから、CS プロテオグリカンの CS 鎖が細胞質分裂に寄与していると考えられる。そこで、CS プロテオグリカン内のいずれの CS 鎖が CSPG の CS 鎖結合部位に変異を導入した変異体の作製を試み、複数の変異体のベクターの構築を行った。構築したベクターから mRNA を *in vitro* で合成し、マウス着床前胚に導入し生細胞観察を行ったところ、CS 結合部位の欠損によって、CSPG の中央体への集積が減弱し、Midbody とは反対の星状体へ移動することが明らかとなった。このことは、CS 鎖のコアタンパク質への結合は細胞内における CSPG の動態を制御する上で重要であることを示している。以上のことが

ら、CS鎖の有無が中央体への集積に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

1) 佐藤 伴、北川 裕之

「CS鎖の減少とマウス多核割球の形成」

第 88 回日本生化学会 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市) 2015 年 12 月 1 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 伴 (SATO, Ban)

筑波大学・生命環境系・特任助教

研究者番号：90443126