

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：38005

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06731

研究課題名(和文) マウス受精卵細胞周期と精子核 - 雄性前核変化素過程の協調

研究課題名(英文) Coordination between cell cycle and processes of sperm chromatin remodeling in mouse zygote.

研究代表者

添田 翔 (Shou, Soeda)

沖縄科学技術大学院大学・細胞シグナルユニット・研究員

研究者番号：40783858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、雄性前核形成時間制御の破綻により引き起こされる染色体異常の発生メカニズムを解明し、精子核リモデリングの時間制御の意義を解明すること、また、前核形成時間制御分子機構を明らかにすることを目標として研究を行った。哺乳類受精卵で前核形成に長時間を要することは、精子核リモデリングにおいてヒストン取り込み時間を保障する生理的意義があること、その分子基盤としてRSK-MASTL経路という本研究で発見した経路が働くこと、さらに、この機構の破綻は複製期依存的な雄性染色体の不安定性を引き起こすことがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this research project, I conducted the research aiming to reveal physiological importance of temporal regulation of cell cycle during sperm chromatin remodeling and molecular mechanism underlying the temporal regulation of pronuclear formation onset. To address these, I investigated the mechanism of chromosome abnormality caused by acceleration of paternal pronuclear formation onset and signaling pathway regulating mitotic exit. As a consequence, it was shown that delay in pronuclear formation onset in mammalian zygotes is required to facilitate maternal histone incorporation into sperm chromatin and to prevent replication dependent paternal chromosome instability and that RSK-MASTL pathway, I found in this study is involved in the regulation of the delay.

研究分野：細胞生物学

キーワード：受精 卵細胞 初期発生 染色体 細胞周期 細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

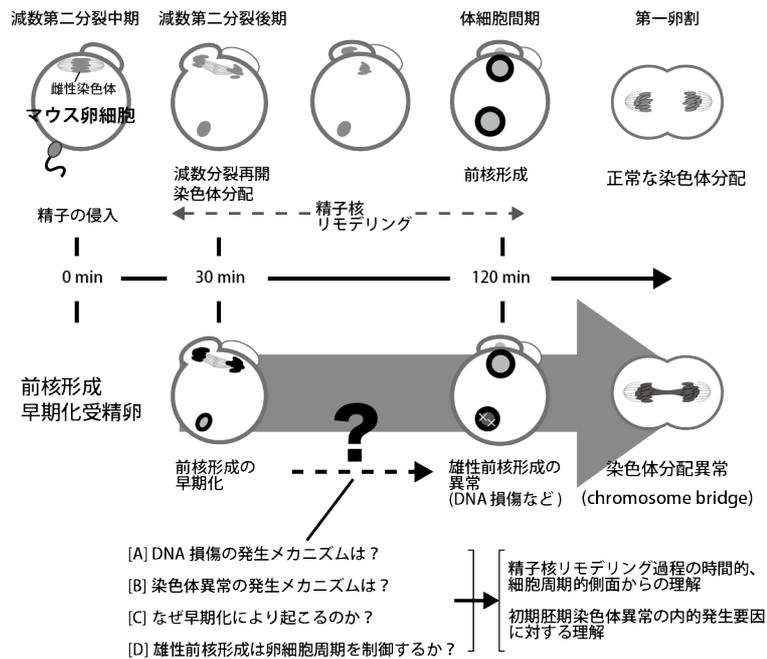
雄性染色体と雌性染色体は受精の開始時には全く異なるクロマチン状態であるが、同じ卵細胞内でそれぞれ異なる過程を経て雌雄の前核をそれぞれ形成する。精子核は卵細胞内に侵入後、プロタミンの放出、卵細胞由来ヒストンの取り込みといった大規模なクロマチンリモデリング過程を経て、核膜に覆われ雄性前核を形成する。一方で雌性染色体は、減数第二分裂中期で細胞周期を停止した卵細胞内にあり、紡錘体中で個々の染色体が凝集した分裂期染色体を形成している。精子核侵入後、卵細胞はただちに減数第二分裂後期へと進行し、雌性染色体の分配がなされ、雌性雄性同時に前核を形成する。哺乳類では多くの種で、精子侵入から前核形成までに、すなわち減数第二分裂後期に2時間程度の長時間を要することが知られる(図1)。体細胞において分裂後期の状態がこのように長時間維持される例は他になく、卵細胞では精子核リモデリングに要する時間を確保するために特殊な細胞周期制御がなされていることが予想されるが検証されていない。

タンパク質脱リン酸化酵素 PP1 の過剰発現、あるいは卵細胞分裂期を先に進行させたのちに精子核を注入する方法によって、精子侵入から前核形成までの時間を30分程度までに早めることにより雄性前核形成に異常が生じることを見出した。これらの方法により前核形成を早期化し得られた雄性前核では核サイズの矮小化、DNA二重鎖切断の指標である γ H2AXシグナルの増加が見られ、続く第一卵割で染色体不分離のひとつである chromosome bridge が高頻度に観察された(図1)。しかし、このような異常がどのような過程を経て引き起こされたか、(精子核リモデリングの不全、その後の過程の異常、各ステップの協調異常、あるいは雌雄前核間の協調の異常によるものなのか)は不明であり、すなわち雄性前核形成時間制御の具体的な意

義は未解明である。また、細胞周期の進行には、次のステップに必要な状態の変化がある場合には、その変化を監視するチェックポイント機構が存在する例が多数見られるが、雄性前核形成に対してそのような機構が存在するかは不明である。これらの問題を解明すべく本研究を計画した。

2. 研究の目的

図1. 前核形成の模式図と前核形成早期化の影響



上記の背景を踏まえ、本研究では、雄性前核形成時間制御の破綻により引き起こされる染色体異常の発生メカニズムを解明し、精子核リモデリングの時間制御の意義を解明することを目標とする。また、精子核リモデリングの進行が卵細胞周期に与える影響についても明らかにする。

[A] 前核形成を早期化することで精子核リモデリングのどのステップに異常が起き DNA 損傷が起こるかを解明する。またこの損傷に対する修復機構の応答、チェックポイントの挙動についても解析する。

[B] 前核形成を早期化することで第一卵割時に染色体不分離となる原因を解明する。DNA 損傷が原因である可能性と、それ以外の過程(プロタミン-ヒストン置換、ヒストン及び DNA の修飾、DNA 複製など)の異常に原

因がある可能性のどちらも考慮し検討する。
[C] [A, B]で解明したステップに必要な時間的あるいは細胞周期的要素を解明する。前核形成時間の短縮による影響は、精子核リモデリングが核膜が形成されると阻害されてしまうために起こるのか（リモデリング時間不足）、細胞周期が分裂期を脱出し間期に入ることが問題なのか（リモデリング過程の細胞周期依存性の問題）、複製起点ライセンスなどの次のステップが始まってしまうことが問題なのか（ステップ間の協調異常）、明らかにする。

3. 研究の方法

[A] 前核形成を早期化することでDNA損傷が起こる原因の解明、損傷応答の解析をする。前核形成を早期化させた受精卵でDNA損傷の入る時期、またその修復の時期を特定する。このために γ H2AXの挙動を、時間を追って観察する。観察時期を前核形成前、前核形成後G1期、S期、G2期と分けて観察し、各時期での γ H2AXシグナルを比較する。

前核形成早期化による染色体異常は第一卵割までの細胞周期進行に影響を与えるか検討する。このためにBrdU取り込み時期の測定によりS期進行や第一卵割の分裂期開始時期を計測する。

[B] 前核形成を早期化することで第一卵割時に染色体不分離となる原因を解明する。第一卵割での染色体分配異常がDNA損傷、修復以外、またはこれに加えて、精子核-雄性前核-分裂期染色体への変化過程の異常による可能性も考慮し、前核形成を早期化した受精卵の雄性前核で、これらの過程に異常が見られるかについても解析を行う。以下の点について観察を行う。プロタミンおよびヒストンの免疫染色により観察を行い、プロタミンの放出不全やヒストンの取り込み不全がないか調べる。雄性前核ではDNAのメチル化シトシンの脱メチル化、ヒストンH3K4、K9お

よびK27のメチル化上昇、K3K27アセチル化上昇が起こるが、これらの修飾に異常がないか免疫染色により観察する。(A-4)でDNA複製に異常の見られた場合、複製起点ライセンスについてMCM2-7やORCタンパク質などの複製開始因子がDNAに導入されているか免疫染色を行い調べる。

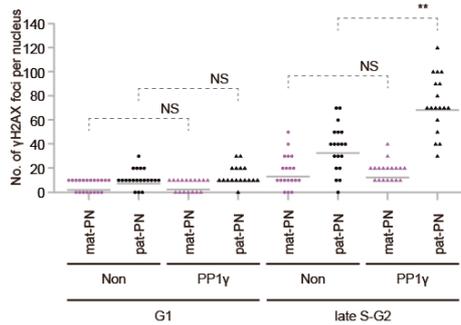
[C] [A, B]で解明したステップに必要な時間的あるいは細胞周期的要素を解明する。核膜形成により精子核リモデリング因子が働けなくなる可能性を検討する。核膜形成後に精子核リモデリング因子(Nucleoplasmin(プロタミンの放出)、HIRA(ヒストンH3.3シャペロン)、Nap1、FACT(ともにヒストンH2A、Bシャペロン)、Topo IIなど)が核外排出されていないか免疫染色により検討する。

前核形成後に起こるステップとしては複製前複合体の形成、DNA、ヒストン修飾の変化などが考えられる。これらのステップが始まることにより精子核リモデリングの過程が阻害されることを検証するために、これらをTET1(シトシンヒドロキシメチル化酵素)のRNAi、anacardic acid(HATの阻害剤;ヒストンアセチル化の阻害)処理、H3.3K4、K9、K27のアミノ酸置換変異体の過剰発現を用いたメチル化、アセチル化修飾の阻害、複製前複合体のRNAiなどを用いて阻害した場合に前核形成後も精子核リモデリングが進行するか効果を見る。

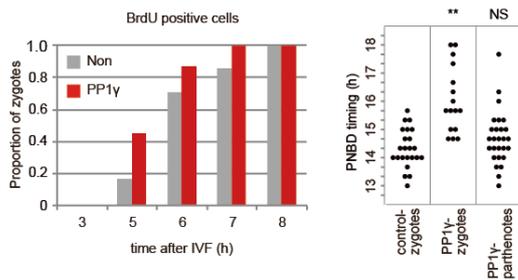
4. 研究成果

本研究では、雄性前核形成時間制御の破綻により引き起される染色体異常の発生メカニズムを解明し、精子核リモデリングの時間制御の意義を解明すること、目標として研究を開始した(1)。研究を進める中で、研究計画予定外に前核形成時間制御分子機構に関して進展があったため、この点についても解析を進めた(2)。

(1) 前核形成早期化によって引き起こされるDNA損傷の挙動を、発生の各ステージの受精卵をリン酸化H2AXをマーカーとした観察によって解析した結果、DNA複製期の後に男性染色体でDNA損傷が蓄積することがわかった。一方で女性染色体ではコントロールと比較したDNA損傷の増加はどのステージでも見られなかった。

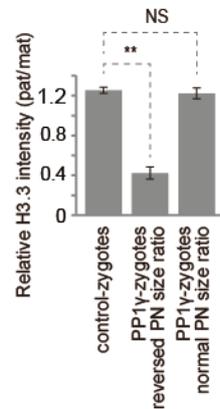


発生への影響として、DNA複製期から第一卵割分裂期開始までの間で細胞周期の遅延が生じること、前核形成早期化受精卵では早期化度合いが高いほど男性前核のサイズが小さいものができることが分かった。

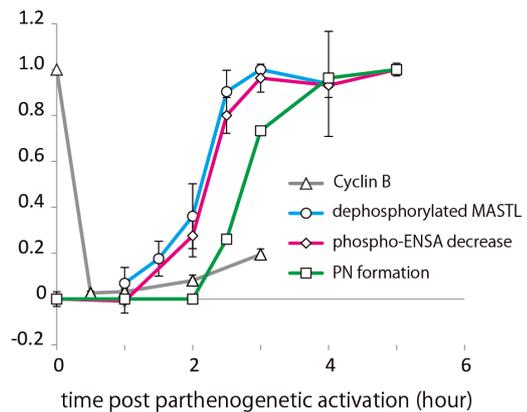


染色体不分離を起こす染色体には男性DNAマーカーが観察されることがわかった。これらの結果から、前核形成早期化受精卵ではDNA複製依存的に男性染色体にDNA損傷が蓄積し、結果として細胞周期遅延、男性染色体分配異常を引き起こすことが示唆された。前核形成早期化受精卵での精子核リモデリング過程を観察によって調べると、プロタミンの放出には影響が見られなかったが、ヒストンの取り込み量が減少している様子が見られ

た。一方で前核形成早期化受精卵での男性染色体のその他の特性に関しては、DNA修飾やヒストン修飾には影響は見られなかった。

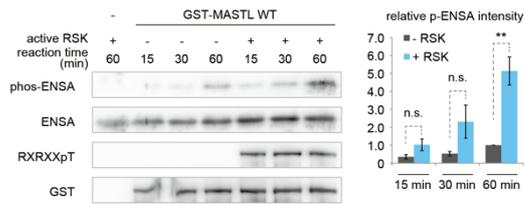


(2) 前核形成時間制御の分子機構に関して、脱リン酸化酵素PP2A阻害シグナル経路CDK-MASTL-ENSAが前核形成時間制御に働くことを見出した。



2つのシグナル経路の関わりが前核形成時間制御に働くことを見出した。すなわち、脱リン酸化酵素PP2A阻害シグナル経路CDK-MASTL-ENSAのMASTLがリン酸化酵素RSKによってリン酸化されることがわかった。前核形成時間制御の分子機構に関して、RSKによるMASTLリン酸化のMASTL活性に与える影響、さらに前核形成時間制御に対する役割を明らかにするために精製タンパク質を用いた活性測定、およびリン酸化ミミック変異体の発現の影響の解析を行った。結果としてRSKによるMASTLリン酸化はMASTLの活性を高め、前核形成時間を遅くする作用があることが明

らかとなった。



以上の結果より哺乳類受精卵で前2018核形成に長時間を要することは、精子核リモデリングにおいてヒストン取り込み時間を保障する生理的意義があること、その分子基盤としてRSK-MASTL経路という本研究で発見した経路が働くこと、さらに、この機構の破綻は複製期依存的な雄性染色体の不安定性を引き起こすことがわかった。課題採択期間内での論文発表には至らなかったが、研究内容をまとめ論文を投稿した。

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3件)

① Shou Soeda, Miho Ohsugi

Prolonged anaphase before pronuclear formation ensures sperm chromatin remodeling in mouse zygotes
10th 3R Symposium (国際学会)
2017年

② 添田翔、大杉美穂

受精開始から前核形成までの時間短縮による発生異常
第35回日本受精着床学会総会・学術講演会(招待講演)
2017年

③ 添田翔、大杉美穂

マウス受精卵における前核形成開始時間制御の分子機構とその生理的意義
2017年度生命科学系学会合同年次大会
2017年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

添田 翔 (Shou Soeda)

沖縄科学技術大学院大学・細胞シグナルユニット・研究員

研究者番号：40783858