

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06681

研究課題名(和文)細胞質流動が胚発生中のオルガネラ配置変化に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Analysis of the effect of cytoplasmic streaming on organelle positioning during early embryogenesis

研究代表者

木村 健二 (Kimura, Kenji)

関西学院大学・生命環境学部・講師

研究者番号：40644505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多くの動物の受精卵の中では、集団的な細胞質の流れ(細胞質流動)が生じることが知られている。細胞質流動には複数のタイプがあり、それぞれの流れが果たす役割の理解は未だ不十分である。本研究では、線虫の受精卵における流れる方向が確率的に変化する細胞質流動に注目し、その発生における影響を解析した。卵内に侵入した精子由来の核(精子核)の動きを調べたところ、細胞質流動により精子核が押し流されることが判明した。一部の精子核はその侵入点とは逆側まで流され、その結果として胚の前後軸極性が通常とは逆転することがわかった。今回の結果から細胞質流動の確率的なふるまいが細胞極性の決定に寄与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

需要が高まり続ける体外受精の分野では、活発な細胞質の流れ(細胞質流動)を示す受精卵の発生成成功率が高いことから、正常に発生する質の高い卵を選別する上での非侵襲的な指標として細胞質流動が注目されている。しかし、具体的にどのような流れが何のために必要なか未だ不明な部分が多く、指標としては不十分である。本研究により、線虫受精卵において細胞質流動の流れる向きが精子由来の核の配置を変えることで発生過程に重要な体軸の決定に影響することが初めて明らかになった。今回の成果により、卵の発生過程に細胞質流動が及ぼす効果の理解が進み、正常に発生する卵を見分ける上で細胞質流動が重要な指標となりうることで支持された。

研究成果の概要(英文)：Cytoplasmic streaming, the collective flow of the cytoplasm, occurs in the fertilized eggs of many animals. There are multiple types of cytoplasmic streaming. However, the role of each type of cytoplasmic streaming is poorly understood. In this study, the effect of cytoplasmic streaming, in which the direction of flow changes stochastically, on the development of *C. elegans* zygotes was analyzed. We found that sperm-derived pronucleus/centrosome complex (SPCC) drifted dynamically through cytoplasmic streaming after fertilization. Some of the SPCC were pushed away to the opposite side of the sperm entry point by cytoplasmic streaming, resulting in the reversal of the anterior-posterior polarity of the embryo. These results indicate that the stochastic behavior of cytoplasmic streaming contributes to the determination of cell polarity.

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞質流動 初期発生 極性形成 受精卵 キネシン 核配置

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の中では細胞内成分が一定方向へ集団的に流れるダイナミックな現象があり、細胞質流動と呼ばれている。細胞質流動は植物細胞では成長や代謝に寄与し、動物細胞ではヒトも含めて受精前後の卵で顕著に見られるため、発生過程に重要な役割を果たすと考えられている。流れ方は種や時期で異なり、あまり集団的に流れない“Agitation”、集団的だが途中で向きが変わる“Circulation”、安定した一方向への流れの“Rotation”と大まかに分類できる。例えば、受精前のショウジョウバエやマウスの卵母細胞では Rotation タイプに近い流れが生じており、その方向性の安定した流れにより、それぞれ細胞運命の決定に重要な極性形成と、減数分裂における極体放出に寄与することが報告されている。

しかし一方で、Agitation や Circulation タイプのような比較的不安定な細胞質流動の役割の理解は進んでいない。たとえば、線虫 *C. elegans* の受精卵では、細胞骨格の微小管とモータータンパク質であるキネシン(kinesin-1)に依存した細胞質流動が受精直後から約 10 分間断続的に生じる。これは最初の体軸である前後軸極性が確立する前のイベントである。その流れは集団的だがランダムに方向が変わり、急に逆流することもあるため Circulation タイプに近い。この不安定で確率的な流れの胚発生における役割は謎である。この流れの役割を解明することは、正常に発生する卵を選別する指標として細胞質流動を用いるために重要である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞質流動の安定性の違い(集団性や方向転換など)が細胞内に及ぼす効果を解析し、これまで不明であった不安定なタイプの流れの胚発生における役割を明らかにすることである。本研究では、線虫受精卵で生じる細胞質流動に着目し、その役割を解明することを目的とした。とくに、受精直後に生じる流れであるため、卵内に侵入した精子由来の核に注目し、その卵内における動態へ流れが及ぼす効果と発生過程における影響を中心に解析を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 受精卵における精子核配置の定量化

受精卵内における精子核の位置を可視化するため、受精卵の細胞膜と精子由来の染色体がそれぞれ蛍光タンパク質で標識された線虫株を用意し、共焦点レーザー顕微鏡(スピニングディスク型)を用いて、受精の前からタイムラプス撮影を行った。撮影データから各タイムポイントにおける精子核の座標を手動計測することで、卵内における精子核の位置変化を定量的に評価した。具体的には、楕円形である線虫受精卵の長軸における貯精囊側の極を 0、中心を 50、反対側の極を 100 に設定することで卵長軸の長さを 100 に換算し(図 1)、各タイムポイントにおける精子核が卵長軸上のどの位置にいるかを評価した。

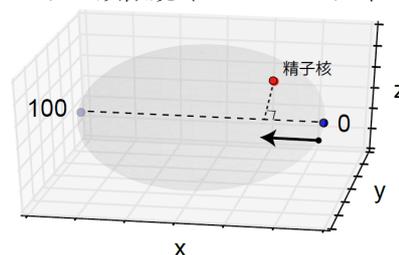


図 1. 精子核の位置の評価

#### (2) 細胞質流動の定量化

細胞質の流れを可視化するため、卵内の卵黄顆粒が蛍光タンパク質で標識された株を用いてタイムラプス撮影を行った。得られた撮影データを画像解析(オプティカルフロー解析)することで、細胞質流動の速度と向きを定量的に評価した。

#### (3) 細胞質流動の操作

細胞質流動を阻害するため、キネシンをコードする *unc-116* を RNAi 法で抑制した。細胞質流動を不安定な Agitation タイプにするため、*ret-1* と *yop-1* 遺伝子を RNAi 法で抑制した。この処理は小胞体のネットワーク構造を断片化することで、細胞質流動の集団性を失わせることができる。これらの状況下における精子核の動態を撮影データから解析し、細胞質流動が精子核配置へ及ぼす影響を評価した。また、細胞周期と細胞質流動の関係性を探るため、細胞周期の進行に関わる分子群を RNAi 法で抑制したときの細胞質流動への影響も評価した。

### 4. 研究成果

(1) 受精直後から精子核の経時的な細胞内配置の変化を調べた結果、まず精子核は必ず卵の貯精囊に近い側(卵長軸上の 0 付近)から侵入することがわかった。その後、細胞質流動が生じている間、精子核は静止しておらず、むしろ活発に位置を変えて徐々に侵入点から離れていく傾向にあることがわかった。この移動は卵ごとにばらつきのある大きな確率的な過程であった。6~7 割の精子核は精子侵入点付近(卵長軸上の 0-25 内の位置)に留まっており(図 2)、残りの精子核は大きく動き、一部は卵のセンターライン(卵長軸上の 50 以上の位置)を超えるものもあった(図 2)。雄との交配条件下では、約 1 割の精子が侵入点とは逆側(卵長軸上の 100 付近)まで移動し、精子侵入点側が卵の前後軸極性における前極となることを確認した。通常、線虫の前

後軸は受精から約 30 分後に精子核に付随する中心体により細胞表層部の張力が局所的に緩むことがきっかけとなり確立される。この時点での精子核の位置が前後軸極性における後極側となり、逆側が前極側となる。これまで受精後に精子核が動くことは知られていなかったため、精子の侵入点が前後軸の決定に関わっていると長年考えられていた。しかし、今回、精子核が前後軸極性の形成前に位置を変えることが判明した。すなわち、受精卵のどちら側が将来の前極あるいは後極となるかは、精子侵入点で決まるのではなく、その後の個体差の大きい精子核の移動の程度で決まっていることを初めて明らかにした。

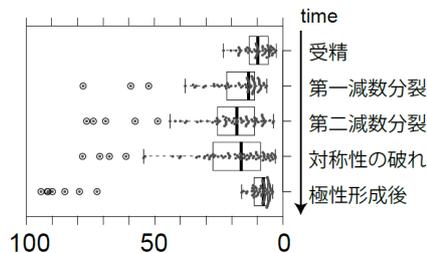


図 2. 精子核の位置の分布

(2) 上記で見られたような精子核の動きが細胞質流動によるものかどうかを明らかにするため、細胞質流動と精子核の位置変化の同時観察を行った。その結果、細胞質流動と精子核の移動方向および速度はほぼ一致することが

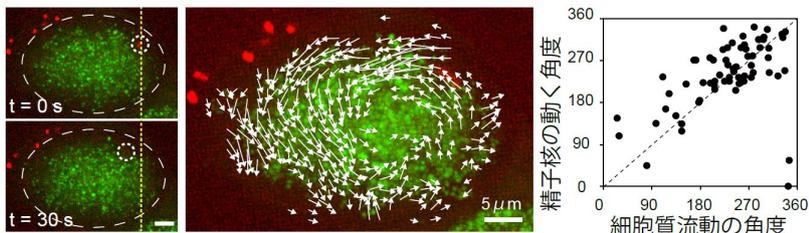


図 3. 精子核 (赤) と細胞質流動 (白矢印) の動き

判明し (図 3)、細胞質流動と精子核の動きに高い相関関係があることがわかった。キネシンの抑制(*unc-116* RNAi)で細胞質流動を止めたところ、精子核の移動は見られなくなった。また小胞体の断片化により流れの集団性を失わせた状態(*yop-1; ret-1* RNAi)にしても精子核の移動は見られなくなることがわかった (図 4)。これらの結果は、ある程度安定した集団的な細胞質流動が精子核を精子侵入点から押し流し、その細胞内配置を変えることを示している。上述のとおり、精子核配置は線虫胚の極性形成 (前後軸決定) に重要であるため、細胞質流動の確率論的なふるまいが細胞極性に影響することを示している (図 5)。

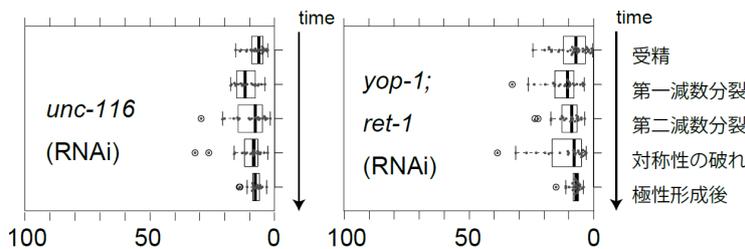


図 4. 細胞質流動を抑制したときの精子核分布

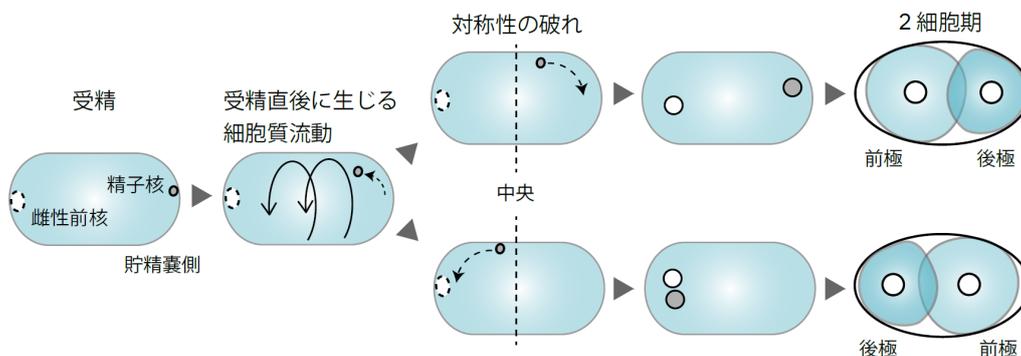


図 5. 細胞質流動が精子核配置を変えることで極性形成に寄与する

(3) 上述のとおり、線虫受精卵において受精直後に生じる細胞質流動が精子核の卵内における配置を大きく変えることで、線虫胚の極性形成 (前後軸決定) に影響することを初めて明らかにした。しかし、どのようにして細胞質流動が受精直後のタイミングで生じるのか、そのメカニズムは不明である。そこで受精に伴う細胞周期の再開に着目し、細胞周期に関わる分子群が細胞質流動に及ぼす影響について解析を行った。その結果、細胞周期の進行に重要な特定の分子がキネシンに依存した細胞質流動の開始に必要なことが見出された。この分子経路を詳しく解明することが今後の課題である。

以上の結果から、受精を合図として再開する細胞周期の進行が細胞質流動を発生させ、それにより精子核の細胞内配置を変えることで将来の極性形成に影響を及ぼすという一連の流れが線虫胚であることがわかった。本研究により初期発生における細胞質の流れの卵内に及ぼす効果の重要性が示された。細胞質流動は多くの動物の正常な受精卵の中でも生じており、胚発生に成功する質の高い卵であることと相関が見られることが知られている。本研究成果により、細胞質流動が正常に発生する受精卵を判別する上で重要な指標となり得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kimura Kenji, Motegi Fumio	4. 巻 120
2. 論文標題 Fluid flow dynamics in cellular patterning	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Seminars in Cell & Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 3~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.semcdb.2021.07.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Kenji, Kimura Akatsuki	4. 巻 31
2. 論文標題 Cytoplasmic streaming drifts the polarity cue and enables posteriorization of theCaenorhabditis eleganszygote at the side opposite of sperm entry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 1765~1773
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E20-01-0058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村健二
2. 発表標題 The polarity cue moves with two types of cytoplasmic streaming in the C. elegans zygote
3. 学会等名 第43会日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村健二
2. 発表標題 Functional analyses of cytoplasmic streaming on cell polarization in the C. elegans zygotes
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村健二
2. 発表標題 線虫受精卵における 細胞質流動のしくみと役割
3. 学会等名 関西地区線虫研究会(2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮浦千春
2. 発表標題 線虫受精卵における細胞質流動のタイミング制御
3. 学会等名 関西地区線虫研究会(2022)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関