

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03250

研究課題名（和文）受精卵への雌性ゲノム継承を保證する哺乳類特有の制御機構

研究課題名（英文）The Mammal-Specific Regulatory Mechanisms Ensuring Maternal Genome Inheritance in Zygotes

研究代表者

大杉 美穂 (Ohsugi, Miho)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：00332586

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000 円

研究成果の概要（和文）：脊椎動物では、受精により精子由来、卵由来の染色体を1組ずつもつ受精卵が作られ、次世代個体の発生が始まる。本研究はマウスを対象に「卵由来の染色体は、どのようにして受精卵に機能的に継承されるのか」という学術的問いに対し、哺乳類特有の制御機構に着目してその解明に取り組んだ。その結果、受精卵中の染色体の位置の制御にはたらく新たな細胞質流動およびその発生機序におけるカルシウム振動の重要性を明らかにした。また、雌性前核の多核化抑制因子であるKid/Kif22の分裂後期雌性染色体への局在化機構の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代の個体発生は、受精により精子由来、卵細胞由来の一組ずつの染色体を継承した受精卵が形成されることで始まる。特に卵細胞由来の染色体は受精開始後に分配され、一方は第二極体へと放出される必要があり、さらに発生に必要な細胞質因子を受精卵に多く保持させるため、第二極体は小さく形成されなければならない。本研究ではこの過程を保證する機構に、脊椎動物では哺乳類にのみ見られるカルシウム振動という現象が関わることを初めて見出した。さらに、卵細胞由来の染色体が単一の核を形成するためのメカニズムについて理解を深めた。

研究成果の概要（英文）：In vertebrates, fertilization creates a zygote with one set of chromosomes from the sperm and one set from the egg, initiating the development of the next generation. This study focused on mice to address the question, "How are egg-derived chromosomes functionally inherited in the zygote?" by investigating mechanisms unique to mammals. The findings revealed the significance of a novel cytoplasmic flow in the positioning of chromosomes within the zygote and the role of calcium oscillations in this process. Additionally, the study elucidated part of the mechanism by which the Kid/Kif22 factor, which suppresses multinucleation of the female pronucleus, localizes to anaphase chromosomes.

研究分野：発生細胞生物学

キーワード：マウス 受精 前核 多核 細胞質流動 第二極体

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物では、受精により精子由来、卵由来の染色体を1組ずつもつ受精卵が作られ、次世代個体の発生が始まる。精子は染色体を1組のみもち、それが受精卵の雄性前核(雄性ゲノムのみを含む核)へと転換される。一方、未受精卵は減数第二分裂の途中、染色体が整列した中期(Meta II)で細胞周期が停止している。精子との融合により卵が活性化されると細胞周期の停止が解けて後期(Ana II)染色体が分配され、1組は第二極体として放出され、1組のみが受精卵の雌性前核(雌性ゲノムのみを含む核)となる(図1)。

この過程に失敗し、卵由来の雌性染色体が2組とも極体として放出される、あるいは極体を作らずどちらも雌性前核になると、一倍体や三倍体の受精卵が形成されてしまう。特に哺乳類では、そのような倍数性の異なる受精卵は個体発生を完了できない。一方で、たとえばマシジミは受精時に2つの極体をつくって卵の染色体をすべて失い、精子由来の染色体のみをもつ受精卵を作り、雄性発生する(Hotta and Komaru, *J. Shellfish Res.*, 37, 131-137, 2018)。つまり、極体形成を制御することで「卵のもつ染色体をどのように受精卵へと継承するか(しないか)」を決定する、多様なしくみが存在するが、その詳細は明らかになっていない。

さらに、雌性前核の作られ方も一様ではない。哺乳類では1組の雌性染色体をすべて含む単一の雌性前核が作られるが、魚類や両生類では個々の染色体を包む核膜ができ、karyomereと呼ばれる多核の雌性前核が作られ、のちに融合する。Karyomereは速い卵割を行う動物種において、早期のDNA複製開始を可能にしていると考えられている。しかし、多くの哺乳類では雌性前核の多核化は発生不全につながる異常である。研究代表者はこれまでに、染色体結合キネシンであるKid/Kif22が雌性前核の多核化を防ぐという、哺乳類特有のしくみが存在することを明らかにしてきた。Kid/Kif22タンパク質は、体細胞においては分裂後期の分配後の染色体間に集積し、染色体を一塊化することで多核化を抑制しているが、キネシンファミリー分子であるKidがどのようにして染色体を一塊化するのか、その具体的な機構は不明であった。

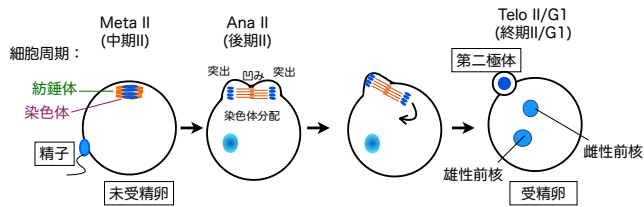


図1 マウス卵の第二極体・受精卵形成過程

2. 研究の目的

本研究ではマウス卵を用い、これまでの研究成果をさらに発展させることで、以下の2つの機構を分子レベルで解明することを目的とした。

(1) 第二極体を0でも2でもなく、1つのみ形成する機構:

マウス卵のMeta II紡錘体は紡錘体軸が細胞膜に対して水平となる配置をとる(図1)。Ana IIに入ると、水平のまま染色体を分配したあと紡錘体が軸が細胞膜に対して垂直となる方向へと回転し、細胞膜側に維持された片極のみが極体となる。紡錘体を膜直下に配置したまま回転させる分子機構を明らかにする。

(2) 雌性前核の多核化を抑制する機構:

哺乳類卵はAna IIが非常に長いという特徴をもち、雌性染色体は分配が完了してから1時間以上、核膜で包まれることなく細胞質中に存在することになる。この特徴のためにマウス卵は潜在的に雌性前核が多核化しやすい。また、Kidノックアウトマウス由来の卵を受精させた場合にも、すべての受精卵で雌性前核が多核になるわけではない。そこで本研究ではKidが染色体を一塊化する機構、Kid欠損時に多核を促進する要因および多核を抑制する機構を明らかにする。

3. 研究の方法

過排卵処理をした8-16週齢のマウスの卵管から採卵したMeta II卵細胞を用いた。マウスはICRまたはCB6F1系統を主に使用した。

(1) 第二極体を0でも2でもなく、1つのみ形成する機構の解明

マウス卵Ana IIでは、分配された染色体からのシグナル伝達の結果、近傍の膜直下にアクチンキャップが形成されて2つの同等な膜突出ができる。紡錘体が回転すると片方の突出がへこみ、他方が残って極体となる。紡錘体の回転は「2つの突出間の凹み部分に局在するアクトミオシンが生み出す、紡錘体を押す力」によると推測されているが、実証されていない(図1)。申請者はFアクチンや紡錘体、染色体、収縮環、核膜を可視化した卵を用い、塩化ストロンチウムを用いた人為的活性化卵におけるこの過程を1分間隔でライブイメージングした結果、

①染色体分配完了後にAna II紡錘体の回転運動が始まり、一過的な接着しか示さなかった方の

極が膜から離れる。収縮環の形成と核膜形成はさらにそのあとに起こる。

②回転速度には周期的な緩急があり、その周期長は卵ごとにわずかに異なる。

ことを示唆する予備実験結果を得ていた。哺乳類卵では受精～前核形成までの間、細胞質 Ca^{2+} 濃度が上下動する Ca^{2+} オシレーションが続くが、そのオシレーション周期長と研究代表者らが見出した紡錘体回転速度の周期長が近いことに気づいた。そこで、蛍光 Ca^{2+} インジケータをインジェクションした卵を用いたタイムラプス観察を行った。さらに、紡錘体の回転に寄与することが報告されている細胞質流動についても解析を行った。

タイムラプス像の解析に際しては、ImageJ のプラグイン HyperStackReg を用いた位置の補正を行うことで卵の位置のブレを補正した。細胞質流は明視野像に対し MATLAB を用い、PIVlab 内で Particle Image Velocimetry (PIV) 解析を行った (Thelicke & Sonntag, *J. Open Res. Software*, 2021)。

さらに、授精前から前核形成までを連続的に観察するため、以下の二通りの方法を用いた。

- ① 透明帯に精子通過のための穴をあけたのち、顕微鏡上でホールディングピペットで透明帯を固定しライブイメージング開始後に媒精する方法。
- ② 酸性タイロードを用いて透明帯を除去したのち未受精卵をガラスボトムディッシュ上に軽く押し付けて固定し、低濃度に調整した精子懸濁液を卵細胞培養ドロップに加えた直後からライブイメージングを開始する方法。

(2) 雌性前核の多核化を抑制する機構の解明

Kid/Kif22 はそのアミノ酸配列から、N 末端側のモーター領域、中央のコイルドコイル領域および、C 末端側の DNA 結合領域 (Helix-hairpin-helix モチーフ) 以外の領域は天然変性領域 (Intrinsically disordered region: IDR) であることが予測された。本研究では Kid が「染色体表面で DNA 依存的に液-液相分離 (Liquid-liquid phase separation: LLPS) を起こすことで染色体を接着している」との仮説の検証に取り組んだ。

哺乳動物細胞の分裂前中期・中期には CDK1/cyclin B により Thr463 にリン酸化を受けると染色体腕部に結合し、Polar ejection force (PEF) を発揮することで染色体の中期板整列を補助する。一方、後期に入ると脱リン酸化されて PEF は発揮できなくなり、染色体の一塊化を行う。これまでに Kid の IDR の一部を欠損させた変異体は脱リン酸化されても PEF を発揮し続けてしまい、Ana II で一度極方向へと分配した染色体を中央に再整列させてしまうことがわかっている。そのため、Kid の染色体一塊化機構に必要な領域を同定するためには *in vitro* 実験系の確立が必要であると考えた。

そこで、*In vitro* 実験系の染色体代替の候補として、DNA-ビーズを用いた実験系の構築に取り組んだ。DNA ビーズは、ビオチン修飾した Fwd プライマーとホスホロチオエート修飾した Rev プライマーを用いて 2.6 Kbp、11.6 Kbp の DNA 断片を増幅し、直径約 2.8 μm の Dynabeads M-270 (invitrogen) 表面に結合させて調整した。

4. 研究成果

(1) 第二極体を 0 でも 2 でもなく、1 つのみ形成する機構の解明

Ana II 紡錘体の回転速度には緩急を繰り返す周期性があることを見出していたが、その周期性が、哺乳類の受精卵に特有の現象であるカルシウムオシレーションの周期と一致することを見出した。この一致はカルシウムのピーク頻度を人為的に変化させても維持された。さらに、カルシウムオシレーションによって回転速度が負に制御されることがわかった。また、紡錘体回転を引き起こすとされる細胞質流動を調べたところ、カルシウムオシレーションの周期と一致した流動方向の一過的な逆転が起こることを見出した。この流動の逆転によって紡錘体の回転速度が一過的に弱まり、回転運動に周期性を与えることが示された。細胞質流動の逆転はアクトミオシン活性依存的に起こることも見出しており、カルシウム依存的に起こる局所的なアクトミオシンの活性が、流動方向を変化させることを示唆する結果を得た。さらに、受精卵における細胞質流動の詳細な解析から、カルシウム依存的に起こる細胞質流動の流動方向は、雌雄の染色体の位置も関与していることを見出した。また、一過的な細胞質流動の逆転は Ana II 紡錘体の膜近傍局在の維持にも寄与しており、小さな極体を 1 つだけ形成するしくみとしてはたらいっていることが示唆された。

カルシウム濃度上昇は微小管の脱重合を誘導することがあることから、カルシウム押しレーションの頻度の変化が第二極体放出の失敗につながる中央紡錘体の形成不全や脆弱化につながる可能性について検討した。しかし、PLCzeta の過剰発現等によりピーク頻度を増大させても、中央紡錘体の湾曲などの大きな影響は見られなかった。

紡錘体の回転を引き起こす「2 つの突出間の凹み部分に局在するアクトミオシンが生み出す、紡錘体を押す力」について、当該部分のアクトミオシン形成がどのように形成されるかについて検討を進めた。その結果、Meta II から Ana II への移行時に起こるさまざまな変化のうち、CDK1 活性の低下によって、凹み部分へのアクトミオシン束の形成と、紡錘体の回転を引き起こす細胞

質流動が生じることを見出した。

(2) 雌性前核の多核化を抑制する機構の解明

Kid による分配後の雌性染色体の一塊化には、染色体の間隙に集積するという特徴的な局在が関与していることが推察される。しかし、この局在は体細胞で確認されているものであることから、マウス Ana II 卵における局在を検討した。その結果、体細胞とは 2 つの点で相違があることがわかった。1 点目は、体細胞では隣り合う染色体の間のみ明瞭な Kid 局在が見られたが、マウス卵 Ana II では染色体間に加えて染色体の周囲を取り巻くような強い局在が見られた。2 点目として、体細胞では染色体間隙でも特に動原体側（極側）に Kid の強い局在が見られたが、Ana II では Kid は中央紡錘体側に複数のドット状の局在パターンを示した。さらに、受精卵を用いた観察から、Kid は同時期の精子由来染色体には一様に局在するだけで特徴的な集積は観察されなかった。この局在パターンは、モーター領域を欠損した Kid 変異体の、分裂後期染色体への局在パターンに類似したものである。これらのことから、分配後の雌性染色体上での特徴的な局在は、この時期の雌性染色体周囲にのみ存在する微小管依存的に確立されるものであることが示唆された。また別の可能性として、雌雄染色体の凝縮度の違いやヒストン修飾の違いによるものであることが考えられた。

Kid の IDR 領域が LLPS を引き起こす可能性について、大腸菌に発現させ精製した Kid を用いた検証を行った。Kid は全長では高度に凝縮してしまい精製が困難であることから、モーター領域を除いたもの (Kid Δ Mot) を用いた。さらに、DNA 依存性を調べる目的で DNA 結合モチーフも除いたタンパク質断片 (Kid Δ Mot Δ DB) も精製した。EGFP を付加したこれらのタンパク質を精製し、タンパク質溶液に Poly ethylene glycol (PEG) (PEG800, sigma) を 0%, 4%, 8% (w/v) となるように加えたところ、4% PEG の条件で EGFP-Kid Δ Mot、EGFP-Kid Δ Mot Δ DB はどちらも凝集体を形成した。また、これらのタンパク質を 4%PEG 存在下で DNA ビーズと混合させると、EGFP-Kid Δ Mot は、溶液中に凝集体が形成されたことに加え、DNA ビーズの周囲に一様に集積した。一方、EGFP-Kid Δ Mot Δ DB は特に 2 つの DNA ビーズの接点に凝集体を形成した。Kid には helix-hairpin-helix モチーフの N 端側にも弱く DNA に結合する領域が存在することがわかっており、EGFP-Kid Δ Mot Δ DB はその弱い DNA 結合力により DNA ビーズ間に凝集する可能性が示唆された。

さらに DNA ビーズ上の DNA にヌクレオソーム構造をとらせ、染色体の模倣体となり得るビーズを作出する目的で、DNA ビーズをヒストン H2B-EGFP を発現させた Meta II 卵に顕微注入した。その結果、ビーズ周囲への EGFP の集積が確認された。さらに、インジェクションした Meta-II 卵を人為的に活性化させると、DNA ビーズの周囲に核膜孔サブユニットを認識する抗体で免疫染色される構造が検出され、核移行シグナルを付加した EGFP の集積も見られた。核膜孔の形成はヌクレオソーム構造依存的であることから、ビーズ上の DNA はヌクレオソーム構造をとっていることが示唆された。

また、Meta II 卵中でヒストン H2B-EGFP 陽性となった DNA ビーズを Meta II 卵から再度取り出しても、ヒストンは陽性のままであることが確認できた。現在、これらのヌクレオソームビーズと精製微小管および精製 Kid タンパク質を用い、Kid がヌクレオソームビーズの一塊化を誘導できるかどうか検証を進めている。

Kid 以外の雌性前核多核化抑制に関わる因子については、野生型の Ana II 卵に複数種類の阻害剤を作用させ、雌性前核形成への影響を検討した。その結果、ある翻訳阻害剤を作用させた場合に、雌性染色体のまとまり（コンパクション）が悪くなることを見出した。

さらに、ある種のアクチン関連因子の阻害剤を作用させると、Kid 欠損卵の雌性前核の多核割合が大幅に減少することを見出した。このことから、Kid 欠損卵ではアクチン関連因子の作用により染色体の散逸が促進されていることが示唆された。

(3) その他

研究の過程で、ある系統のマウス受精卵では受精卵に継承された雌性染色体と精子由来の染色体とが接近しやすく、両方の染色体を内包した 1 つの前核が作られやすことを見出した。これを手がかりに、複数系統のマウス由来の卵細胞を用いた比較解析を行い、受精卵中で独立した雌雄それぞれの前核が形成されるために重要と考えられる候補因子を同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 戸塚隆弥、大杉美穂
2. 発表標題 マウス受精卵のカルシウム振動の新たな作用-第二極体放出の確実性を支えるしくみ-
3. 学会等名 第21回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸塚隆弥、大杉美穂
2. 発表標題 マウス受精卵のカルシウム振動の新たな作用-第二極体放出の確実性を支えるしくみ-
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸塚隆弥、大杉美穂
2. 発表標題 マウス受精卵のカルシウム振動は第二極体放出の確実性を支える
3. 学会等名 第12回シグナルネットワーク研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Asuto Kanno, Takaya Totsuka, Tao Pan, Midori Kajitani, Tomo Kondo, Miho Ohsugi
2. 発表標題 Cytoplasmic streaming and chromosome behavior during mouse fertilization
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 角田達紀, 近藤興, 大杉美穂
2. 発表標題 DNA-beadsを用いたKid/KIF22による哺乳類受精卵多核化抑制機構の解明
3. 学会等名 第40回染色体ワークショップ・第21回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梶谷碧, 戸塚隆弥, 大杉美穂
2. 発表標題 マウス卵減数第二分裂後期進行時の細胞質流動逆転のメカニズム
3. 学会等名 第40回染色体ワークショップ・第21回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸塚隆弥, 大杉美穂
2. 発表標題 マウス受精卵のカルシウム振動は小さな第二極体放出を確実にする
3. 学会等名 第3回有性生殖研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平良 夏実, 戸塚 隆弥, 近藤 興, 大杉 美穂
2. 発表標題 マウス一倍体単為発生胚が示す初期卵割異常
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Natsumi Taira, Takaya Totsuka, Tomo Kondo , Miho Ohsugi
2. 発表標題 The importance of DNA-Cytoplasmic Ratio on mouse preimplantation development
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戸塚隆弥、大杉美穂
2. 発表標題 マウス受精卵のカルシウムオシレーションの新たな作用 ~ 第二極体放出の抑制的制御 ~
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ・第19回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Natsumi Taira, Takaya Totsuka, Tomo Kondo, Miho Ohsugi
2. 発表標題 The impact of DNA-to-cytoplasmic ratio on mouse preimplantation development
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020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
---------	---------