

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02407

研究課題名（和文）哺乳類卵母細胞における紡錘体二極化の機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of mechanisms for spindle bipolarization in mammalian oocytes

研究代表者

北島 智也 (Kitajima, Tomoya)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：00376641

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、卵母細胞における紡錘体二極化の分子機構を明らかにすることを目的とした。マウス卵母細胞における紡錘体二極化は動原体因子NDC80に依存することから、NDC80を基盤とする制御機構に着目した。NDC80の微小管結合を不安定化するリン酸化模倣変異と、動原体キナーゼMPS1の阻害剤処理を組み合わせると、合成的に紡錘体二極化が欠損することが明らかになった。MPS1はNDC80のC末端ドメインおよび微小管クロスリンカーPRC1をリン酸化することが分かった。MPS1阻害は紡錘体二極化を遅延させ、それは動原体と微小管の接続エラーを引き起こしていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵母細胞の減数分裂の過程における染色体分配のエラーは卵子の染色体数異常を引き起こす。卵子の染色体数異常は不妊、流産、ダウン症など先天性疾患の原因である。本研究の結果は、マウス卵母細胞は動原体が微小管接続エラーを回避するために紡錘体二極化を促進するメカニズムを有していることを示している。この発見は、ヒト卵母細胞にこれと類似のメカニズムが存在するかという研究を誘起するものであり、生殖医療研究を経て将来の生殖補助医療等への貢献が期待される。学術的には、中心体のない卵母細胞が紡錘体の二極性を確立するための特異的なメカニズムの発見として位置づけられる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to reveal the molecular mechanism for spindle bipolarization in oocytes. We focused on mechanisms based on NDC80, a kinetochore protein required for spindle bipolarization in mouse oocytes. We found that the inhibition of the kinetochore kinase MPS1 impairs spindle bipolarization when NDC80 phosphomimetic mutations that reduce microtubule-binding activity are introduced. We showed that MPS1 phosphorylates the C-terminal domain of NDC80 and the microtubule cross-linker PRC1. MPS1 inhibition significantly delayed spindle bipolarization, which caused kinetochore-microtubule attachment errors.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：卵子 イメージング 染色体 紡錘体 動原体 微小管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類卵母細胞に特異的な紡錘体二極化メカニズム

二極性紡錘体の確立は、細胞分裂における染色体分配に必須である。二つの中心体が紡錘体の二極性を規定する体細胞とは異なり、雌性生殖細胞である卵母細胞では中心体なしで減数分裂が進行する。卵母細胞は非中心体性の紡錘体を二極化させるために特異的なメカニズムを有していると考えられるが、その実体は明らかではなかった。

(2) マウス卵母細胞における動原体を基盤とした紡錘体二極化

我々の以前の研究から、マウス卵母細胞では紡錘体二極化に動原体因子 NDC80 が必要であることが示されていた(Yoshida et al., 2020 Nat Commun, PMID: PMC7253481)。NDC80 は NUF2 とヘテロダイマーを形成し、N 端側に持つ微小管結合ドメインを介して動原体 微小管の接続を担う因子である。NDC80-NUF2 はアンチパラレル微小管クロスリンカー PRC1 をリクルートして動原体に集積させることで紡錘体二極化を促進すると考えられた。しかしながら、NDC80-NUF2 がどのような制御を受けて紡錘体二極化を促進するのか、また、卵母細胞において紡錘体二極化が動原体に依存することの意義は何なのかは、分かっていなかった。

2. 研究の目的

(1) 動原体 NDC80 の制御を介した紡錘体二極化機構の解明

本研究の目的の一つは、NDC80-NUF2 がどのような制御を介して紡錘体二極化を促進するのかを明らかにすることである。NDC80-NUF2 が紡錘体二極化に必要とされることや、PRC1 を動原体にリクルートすることは、卵母細胞にのみ見られている現象であり、卵母細胞に特有の制御メカニズムが存在することが想定された。

(2) 紡錘体二極化が動原体に依存することの意義の解明

(1)において NDC80-NUF2 による紡錘体二極化の制御機構を明らかにすることで、NDC80-NUF2 の紡錘体二極化機能を特異的に阻害することが可能になる。紡錘体二極化機能を特異的に阻害し、その影響を調べることで、紡錘体二極化が動原体を介して行われることの生理的な意義を明らかにすることができる。これが本研究のもう一つの目的である。

3. 研究の方法

(1) 紡錘体二極化のライブイメージングによる定量解析

本研究ではマウス卵母細胞を哺乳類モデルとして用いた。紡錘体二極化の解析には、我々が独自に開発したライブイメージング技術を積極的に用いた。この技術においては、マウス卵巣から回収した卵母細胞に、微小管や染色体を蛍光ラベルできるマーカートンパク質をコードする RNA を顕微注入し、減数分裂における紡錘体形成の過程を生きたままモニタリングする。共焦点顕微鏡を自動化させることにより、高解像度かつハイスループットの 3D ライブイメージングを可能にしている。紡錘体の二極化は、三次元再構築された画像を基に紡錘体形状をパラメータ化し、それらの経時的な変化を捉えることにより定量的な解析を行った。

(2) 遺伝学的手法および薬剤処理による紡錘体二極化タイミングの操作

マウスは遺伝学的操作が可能であり、我々は以前の研究で確立した卵母細胞特異的な NDC80 ノックアウトマウスを有している。この NDC80 ノックアウト卵母細胞に NDC80 変異体や断片をコードする RNA を注入することで、NDC80 のどの部位および修飾を介して紡錘体二極化の制御が行われているかを調べた。また、NDC80-NUF2 をはじめとする動原体因子の多くはリン酸化制御を受けていることから、動原体キナーゼの阻害剤を用いた解析を行った。(1)に示した定量解析から、紡錘体二極化を遅延させる効果を有する条件に着目した。また、紡錘体二極化を促進する効果を有するタンパク質の過剰発現を行うことにより、紡錘体二極化の人為的な加速操作が行われた。

4. 研究成果

(1) MPS1 キナーゼ活性は微小管接続が不安定な動原体が紡錘体を二極化させるために必須である

我々の以前の研究から、微小管結合ドメインを欠く NDC80 断片は紡錘体を二極化させる活性を有することが分かっていた。NDC80 は N 端テール領域のリン酸化により微小管接続の安定性が負に制御されている。そこで、NDC80 のリン酸化模倣変異体(NDC80-9D)を作製し、これを NDC80 ノックアウト卵母細胞に発現させることで、内在性の NDC80 を NDC80-9D に置き換えた。この条件下において、紡錘体二極化が失われるような動原体キナーゼ阻害を探索した。前述のライブイメージングによる定量的な紡錘体二極化の解析を行った結果、MPS1 キナーゼを NDC80-9D 卵母細胞において阻害すると、紡錘体二極化がほぼ完全に起こらなくなることが明らかになった。この

ことから、MPS1 キナーゼ活性は微小管接続が不安定な動原体が紡錘体を二極化させるために必須であることが示唆された。

(2) MPS1 キナーゼは紡錘体二極化を促進する

MPS1 キナーゼは不安定な微小管接続を有する動原体において高い活性を示すことが知られている。卵母細胞の減数第一分裂前中期においては、動原体は不安定な微小管接続を有し、かつ紡錘体二極化が開始する。これらのことを考え合わせると、MPS1 キナーゼ阻害は前中期における紡錘体二極化の開始を遅らせるはずであると考えられた。しかしながら、MPS1 キナーゼ阻害は分裂後期への進行を早める効果が知られており、これにより前中期における紡錘体二極化のタイミングの評価が困難である。そこで、分裂後期への進行を阻害する薬剤 proTAME を卵母細胞に処理し、この条件下において MPS1 キナーゼ阻害を行った。ライブイメージングによる定量解析から、MPS1 キナーゼ阻害は前中期における紡錘体二極化の開始を遅らせることが明らかとなった。

(3) MPS1 キナーゼは NDC80-NUF2 および PRC1 をリン酸化する

MPS1 キナーゼが NDC80-NUF2 をリン酸化することにより紡錘体二極化を促進する可能性について検討した。NDC80-NUF2 は C 端ドメインを介して紡錘体二極化を促進することから、MPS1 キナーゼによるこの部位のリン酸化を探索した。In vitro において NDC80-NUF2 の C 端断片を MPS1 キナーゼでリン酸化し、質量分析解析を行ったところ、複数のリン酸化サイトを同定した。これらのうち一つの部位においてリン酸化特異的抗体を作製した。リン酸化抗体は免疫染色において動原体にシグナルを示し、それは NDC80 および MPS1 キナーゼ活性に依存していた。また、リン酸化シグナルは前中期において最も高い値を示した。NDC80-NUF2 の C 端断片にリン酸化欠損変異を導入し、NDC80 ノックアウト卵母細胞に発現させたところ、紡錘体二極化はほぼ正常なタイミングで行われた。これらの結果から、MPS1 キナーゼは NDC80-NUF2 の C 端ドメインをリン酸化し、それ以外にも紡錘体二極化を促進するためのターゲットが存在することが示唆された。

そこで、NDC80-NUF2 によって動原体にリクルートされる PRC1 が MPS1 キナーゼにリン酸化される可能性を検討した。In vitro キナーゼ解析から、MPS1 による PRC1 のリン酸化サイトを同定した。野生型 PRC1 は過剰発現により NDC80 ノックアウト細胞の紡錘体二極化をレスキューできる一方で、二つのリン酸化サイトに変異を導入した PRC1 はレスキューに失敗することを明らかにした。

以上のことから、MPS1 キナーゼは NDC80-NUF2 および PRC1 をリン酸化することで紡錘体二極化を促進すると考えられた。ただし、MPS1 の下流についてはさらなる研究が必要である。

(4) MPS1 キナーゼは紡錘体二極化を促進することで微小管接続エラーを低減する

さらに、MPS1 キナーゼが動原体を介して紡錘体二極化を促進する生理的な意義について検討した。MPS1 キナーゼ阻害は紡錘体二極化を遅延させ、続く中期には染色体整列を失敗していた。これらの染色体整列の失敗は、動原体 微小管の接続エラーを伴っていた。これらの観察から、紡錘体二極化の遅延が動原体 微小管の接続エラーを起こしやすくさせている可能性が考えられた。この可能性を検証するために、紡錘体二極化を加速させる効果を有するタンパク質 KIFC1 の過剰発現を行った。MPS1 キナーゼを阻害した卵母細胞に KIFC1 を過剰発現させたところ、紡錘体の遅延が回復した。すると、動原体 微小管の接続エラーの頻度が抑えられ、染色体整列はレスキューされた。これらのことから、MPS1 キナーゼは紡錘体二極化を促進することで微小管接続エラーを回避する効果を持つと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 竹之内修、北島智也	4. 巻 42
2. 論文標題 老化とともに崩壊する卵母細胞の染色体制御	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 403 ~ 407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18958/7407-00001-0001143-00	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aizawa Eishi, Ozonov Evgeniy A, Kawamura Yumiko K, Dumeau Charles Etienne, Nagaoka So, Kitajima Tomoya S, Saitou Mitinori, Peters Antoine HFM, Wutz Anton	4. 巻 42
2. 論文標題 Epigenetic regulation limits competence of pluripotent stem cell derived oocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2023113955	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 該当する

1. 著者名 Nishimura Hiromi, Ikawa Yayoi, Kajikawa Eriko, Shimizu Mizuno Natsumi, Hiver Sylvain, Tabata Okamoto Namine, Mori Masashi, Kitajima Tomoya, Hayashi Tetsutarō, Yoshimura Mika, Umeda Mana, Nikaido Itoshi, Kurokawa Mineo, Watanabe Toshio, Hamada Hiroshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Maternal epigenetic factors in embryonic and postnatal development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 422 ~ 432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13024	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 Ogonuki Narumi, Kyogoku Hirohisa, Hino Toshiaki, Osawa Yuki, Fujiwara Yasuhiro, Inoue Kimiko, Kunieda Tetsuo, Mizuno Seiya, Tatenō Hiroyuki, Sugiyama Fumihito, Kitajima Tomoya S, Ogura Atsuo	4. 巻 23
2. 論文標題 Birth of mice from meiotically arrested spermatocytes following biparental meiosis in halved oocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e54992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202254992	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 Kyogoku Hirohisa, Kitajima Tomoya S	4. 巻 69
2. 論文標題 The large cytoplasmic volume of oocyte	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2022-101	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 Murakami Kenta, Hamazaki Nobuhiko, Hamada Norio, Nagamatsu Go, Okamoto Ikuhiro, Ohta Hiroshi, Nosaka Yoshiaki, Ishikura Yukiko, Kitajima Tomoya S., Semba Yuichiro, Kunisaki Yuya, Arai Fumio, Akashi Koichi, Saitou Mitinori, Kato Kiyoko, Hayashi Katsuhiko	4. 巻 615
2. 論文標題 Generation of functional oocytes from male mice in vitro	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 900~906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-023-05834-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura Hiromi, Ikawa Yayoi, Kajikawa Eriko, Shimizu Mizuno Natsumi, Hiver Sylvain, Tabata Okamoto Namine, Mori Masashi, Kitajima Tomoya, Hayashi Tetsutaro, Yoshimura Mika, Umeda Mana, Nikaido Itoshi, Kurokawa Mineo, Watanabe Toshio, Hamada Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Maternal epigenetic factors in embryonic and postnatal development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Courtois Aurelien, Yoshida Shuhei, Takenouchi Osamu, Asai Kohei, Kitajima Tomoya S	4. 巻 22
2. 論文標題 Stable kinetochore-microtubule attachments restrict MTOC position and spindle elongation in oocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202051400	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 Mishina Tappei, Tabata Namine, Hayashi Tetsutaro, Yoshimura Mika, Umeda Mana, Mori Masashi, Ikawa Yayoi, Hamada Hiroshi, Nikaido Itoshi, Kitajima Tomoya S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Single oocyte transcriptome analysis reveals aging associated effects influenced by life stage and calorie restriction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aging Cell	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/accel.13428	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 Mori Masashi, Yao Tatsuma, Mishina Tappei, Endoh Hiromi, Tanaka Masahito, Yonezawa Nao, Shimamoto Yuta, Yonemura Shigenobu, Yamagata Kazuo, Kitajima Tomoya S., Ikawa Masahito	4. 巻 220
2. 論文標題 RanGTP and the actin cytoskeleton keep paternal and maternal chromosomes apart during fertilization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202012001	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20件 (うち招待講演 18件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Kitajima Tomoya
2. 発表標題 Chromosome dynamics and aneuploidy in mammalian oocytes
3. 学会等名 RIKEN International Symposium on Nuclear Structure and Function 2024 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 北島 智也
2. 発表標題 卵子の染色体数異常のメカニズム
3. 学会等名 第4回有性生殖研究会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 北島 智也
2. 発表標題 卵子の染色体数異常のメカニズム
3. 学会等名 第7回Chubu Cytogenetics Conference (CCC) (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 北島 智也
2. 発表標題 卵子の染色体数異常のメカニズム
3. 学会等名 新学術領域研究 全能性プログラム：デコーディングからデザインへ 第5回公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北島 智也、竹之内 修
2. 発表標題 生きた卵母細胞における染色体特異的な動態の可視化
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北島 智也
2. 発表標題 卵子の染色体数異常の細胞生物学的な原因
3. 学会等名 第26回日本IVF学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北島 智也
2. 発表標題 卵子の染色体数異常の細胞生物学的な原因
3. 学会等名 第41回日本受精着床学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kitajima Tomoya
2. 発表標題 The role of the two-pronuclear state in mammalian zygotes
3. 学会等名 Seminar at Institute of Animal Physiology and Genetics CAS（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kitajima Tomoya
2. 発表標題 Mechanisms of chromosome segregation errors in oocytes
3. 学会等名 IGH Summer School, Montpellier University（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kitajima Tomoya
2. 発表標題 Visualizing chromosome-specific dynamics in oocytes
3. 学会等名 IGH Summer School, Montpellier University（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomoya Kitajima
2. 発表標題 Functional relevance of the two-pronuclear state in zygotes
3. 学会等名 EMBO Workshop Chromosome segregation and aneuploidy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoya Kitajima
2. 発表標題 Roles of the two-pronuclear state in zygotes
3. 学会等名 第23回京大生命科学研究科シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北島 智也
2. 発表標題 卵母細胞における染色体分配
3. 学会等名 第1回 細胞分裂研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北島 智也
2. 発表標題 卵子の染色体数異常の細胞生物学的な原因
3. 学会等名 EDGE-J (Endocrinology Debate and Global Exchange in Japan) 2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoya Kitajima
2. 発表標題 Roles of the two-pronuclear state in zygotes
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Germ Cells Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoya Kitajima
2. 発表標題 Roles of the two-pronuclear state of zygotes
3. 学会等名 EMBO Workshop "The Cell Cycle: One Engine - Many Cycles" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Osamu Takenouchi, Tomoya Kitajima
2. 発表標題 Probing chromosome-type-specific dynamics in live oocytes
3. 学会等名 The International Symposium "Totipotency and Germ Cell Development" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北島智也
2. 発表標題 卵子における染色体分配と受精にともなう前核形成の機構
3. 学会等名 第39回日本受精着床学会総会・学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 京極博久、多羅間充輔、柴田達夫、北島智也
2. 発表標題 哺乳類受精卵における前核サイズの制御とその意味
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 北島智也
2. 発表標題 卵母細胞における染色体分配
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>理化学研究所 染色体分配研究チームHP http://chromosegr.riken.jp/index.html 理化学研究所生命機能科学研究センターHP 染色体分配研究チーム紹介ページ https://www.bdr.riken.jp/ja/research/labs/kitajima-t/index.html 理化学研究所HP 染色体分配研究チーム紹介ページ https://www.riken.jp/research/labs/bdr/chromo_segr/ 理化学研究所 染色体分配研究チームHP http://chromosegr.riken.jp/index.html 理化学研究所生命機能科学研究センターHP 染色体分配研究チーム紹介ページ https://www.bdr.riken.jp/ja/research/labs/kitajima-t/index.html 理化学研究所HP 染色体分配研究チーム紹介ページ https://www.riken.jp/research/labs/bdr/chromo_segr/index.html</p>

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
---------	---------