

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26712022

研究課題名(和文) 第一減数分裂中期停止の発生機序の解明と染色体異常のない卵子の獲得

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism behind interruption of metaphase I in oocytes

研究代表者

星野 由美 (HOSHINO, YUMI)

広島大学・生物圏科学研究科・助教

研究者番号：10451551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,700,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物の卵子は、卵巣内で成熟し受精可能なステージまで進行して排卵される。しかし近年、加齢などの要因で減数分裂が途中で停止し、受精できない事例が多く報告されている。本研究では、その発生メカニズムを明らかにするために、減数分裂の進行を制御している鍵因子の探索を行い、プロリン異性化酵素Pin1が第一極体の放出や染色体の分配など、卵子の減数分裂において重要な役割を果たしていることを明らかにした。

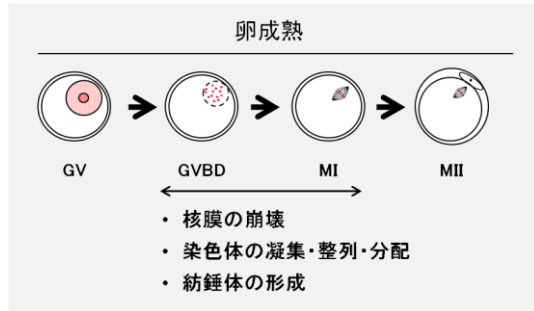
研究成果の概要(英文)：Mammalian oocytes mature in the ovary and ovulation occurs during the metaphase II stage, when the oocytes can be fertilized. It was recently reported that meiotic maturation is interrupted by factors such as aging, which hinders fertilization. To elucidate the reason why meiotic maturation stops in oocytes, in this study, we identified the key functional factor controlling meiotic maturation, and clarified that the proline isomerization enzyme Pin1 is indispensable for the progress of meiotic maturation. This information would help in the production of high-quality oocytes.

研究分野：農学

キーワード：卵子 第一減数分裂中期 紡錘体 染色体 Pin1

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の卵子は、卵巣内で形成・成熟し、受精可能な状態である成熟卵子として、第二減数分裂中期 (metaphase II, MII 期) で排卵される。第一減数分裂前期 (germinal vesicle, GV 期) で分裂を停止している卵子は、黄体形成ホルモン (LH) の一過性大量分泌を受けて、減数分裂を再開し、MII 期まで進行して再停止する (下図参照: この過程を卵成熟と呼ぶ)。



しかしながら、近年、ヒトの生殖補助医療の現場では、第一減数分裂中期 (metaphase I, MI 期) で停止して、受精できない卵子が高頻度に出現する事例が多く報告されている。原因は加齢によるところが大きいと、その他卵巣内環境要因も影響していると考えられる。卵成熟は通常ノンストップで MII 期まで進行するため、分裂途中で停止するメカニズムは明らかでない。研究代表者はこれまでに、Akt や mTOR を介した卵成熟メカニズムを解明し、これらが紡錘体の形成・維持と MI-MII 期の進行に重要な役割を果たしていることを報告している。MI 期で停止する要因としては、染色体の整列・分配の異常、紡錘体の形成不全などが考えられる。また、女性ホルモンであるエストロゲンの受容体に影響を及ぼす内分泌かく乱化学物質を成熟過程の卵子に暴露すると、紡錘体形成異常が発生し、MI 期で停止する卵子が高頻度に観察されることを明らかにしている。このことから、MI 期で停止する要因としては、2つ考えられる。すなわち、①加齢などの理由により、染色体整列・分配とそれに伴う紡錘体形成に関わる因子が正常に機能していないこと、②内分泌かく乱化学物質の影響によるエストロゲン作用への影響、である。

これまでに卵子や受精胚を体外で操作する技術として、卵子の体外成熟培養や体外受精、顕微授精、胚培養などが確立され、広く利用されている。しかし、これらは卵子が正常に MII 期へ成熟することが前提である。卵子が成熟出来なければ、受精させることはできない。MI 期で停止する原因を解明し、それを回避またはレスキューする方法を確立できれば、生殖医療や希少動物の保全を含む生殖生物学の領域に広く貢献出来ると考えられる。

2. 研究の目的

哺乳動物の卵子は、卵巣内で形成・成熟し受精可能なステージまで進行して排卵される。

しかし、近年、加齢などの要因で減数分裂が途中 (第一減数分裂中期) で停止し、受精できない事例が多く報告されている。本研究では、第一減数分裂中期停止の発生機序を解明することを目的に、減数分裂の進行を制御している鍵因子の探索とその機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 第一減数分裂中期 (MI 期) で機能する因子の探索: 体細胞の分裂メカニズムを参考に、減数分裂に関与する可能性のある因子を候補因子として選別した。その中から、紡錘体形成や染色体分配に機能する因子を選別し、鍵因子となり得るものを絞り込んだ。

(2) 選別した因子の発現およびその機能解析: 候補因子について、免疫蛍光染色法により卵子内の局在を解析し、MI で紡錘体上またはその周辺で局在化するものについて機能解析を進めた。阻害実験では、タイムラプスイメージングにより細胞分裂のモニタリングを行い、分裂様式を詳細に解析した。

(3) 染色体の整列分配と紡錘体の形成維持に関わるタンパク質の発現と機能解析: 紡錘体維持には微小管の安定化が大きく影響するため、安定化に関わるタンパク質について解析した。MI 期における卵子の構造とその制御に関わる因子は以下に示す通り。

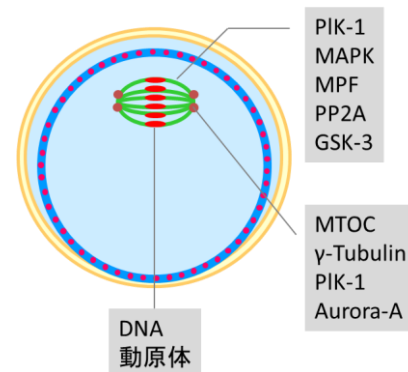


図. 卵子の減数分裂における紡錘体の構造とその制御に関する諸因子

4. 研究成果

(1) 減数分裂中期で機能する因子を探索し、Kizuna が MI 期と MII 期において異なる役割を果たし、卵子のクオリティを反映するマーカーになり得ることを明らかにした。すなわち、MI 期では整列した染色体周辺に局在化し、MII 期では、①紡錘体極に局在するもの、②細胞質内に散在するもの、③局在化が認められないもの、の3パターンが存在し、その出現割合は卵子の成熟条件によって異なった。MI 期においては、染色体周辺に局在化することで、染色体の整列とその後の分配に機能していることが示された。

(2) 研究代表者らのこれまでの研究で、卵成熟過程、特にMIおよびMII期において、セリン・スレオニンキナーゼであるAkt (Protein Kinase B) やmTORが紡錘体の形成・維持や極体放出(染色体の分配)に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。卵成熟(減数分裂)は、多くのセリン・スレオニンキナーゼの働きによって制御されていることが知られているが、発現しているタンパク質の多くは常にリン酸化状態を保っている。これらのタンパク質の機能を制御している因子があるのではないかと仮説を立て、タンパク質の構造変化によってターゲットとなるタンパク質の機能調節を担う、プロリン異性化酵素Pin1に着目してその機能解析を行った(下図参照)。



Pin1はプロリン異性化酵素(PPlase)のひとつであり、リン酸化したタンパク質に特異的に働く。リン酸化したセリンまたはスレオニンの隣に位置するプロリン(Phospho-Ser/Thr)-(Pro)の特異的配列を認識し、立体構造を変化させる。

Pin1は広範なタンパク質(セリン・スレオニンキナーゼ)をターゲットとして、そのタンパク質の安定性や構造変化を調整することによって、細胞分化や増殖に必要な微小管の重合や細胞周期の進行に関与していることが体細胞の研究によって明らかになっている。卵成熟過程における、その発現および局在を解析したところ、減数分裂を停止している卵核胞期(germinal vesicle: GV期)においては核膜で強く発現し、核膜崩壊直前になるとPin1のターゲットとなるリン酸化プロリンが核膜周辺でスポット状に局在化した。核膜崩壊が起こるとリン酸化プロリンの発現は急激に上昇し、細胞質表層で特に強い発現を示した。MIおよびMII期では紡錘体上の局在が確認されている。卵子の体外成熟培養で、Pin1特異的阻害剤であるJugloneおよびDTMを処理すると、濃度依存的に第一極体の放出が抑制された。Pin1遺伝子欠損マウスで排卵誘起後に得られた排卵卵子を解析したところ、80%以上の卵子で極体放出がなく第一減数分裂中期で停止していることが確認された。減数分裂途中で停止している卵子を解析すると、極体放出前に出現するアクチンキャップの形成が認められたものの、紡錘体の形成が不完全あるいは紡錘体が適切な位置に形成されなかった結果、極体放出ができなかったことが明らかとなった。減数分裂の進行には、アクチンやミオシンなどのタンパク質の機能が不可欠であるが、Pin1の阻害はそれらの機能を大きく抑制する結果となった。一方、Pin1欠

損マウス由来の未成熟(GV期)卵子を卵巣から採取して体外培養を行ったところ、FSH刺激による卵丘細胞の膨化は認められたものの、卵子は卵核胞を保持したままであり、18時間の培養後でも卵子の成熟は誘起されなかった。以上の結果から、Pin1が減数分裂の進行に機能し、特に第一減数分裂中期の維持とその後の極体放出(減数分裂)において必須の役割を果たしていることが明らかとなった。

(3) この現象が卵子の減数分裂に特異的なものなのかを検証するため、初期胚発生におけるPin1の機能を解析した。タイムラプスイメージングを用いて、Pin1を阻害した受精卵の発生を観察したところ、2細胞期以降の正常な卵割が阻害された。すなわち、Pin1阻害により、一部の割球で細胞分裂が進行する現象や、染色体の分配を伴わない細胞分裂などが頻出した。これらの結果から、Pin1は卵子の減数分裂のみならず、初期胚発生においても重要な役割を果たしていることが明らかとなった。減数分裂や初期胚発生過程では、多くのセリン・スレオニンキナーゼの関与が知られているが、本研究の結果、これらのタンパク質の機能は、Pin1によるプロリン異性化によって厳密に制御されていることが示された。

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)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Jun Otake, Masahiro Sakurai, Yumi Hoshino, Kentaro Tanemura, Eimei Sato. Expression of Focal Adhesion Kinase in Mouse Cumulus-Oocyte Complexes and the Effect of Phosphorylation at Tyr397 on Cumulus Expansion. *Molecular Reproduction and Development*, 査読有 Vol.82, No.3, 2015, 218-231. DOI:10.1002/mrd.22464
- ② Manami Nishio, Yumi Hoshino, Kentaro Tanemura, Eimei Sato. Effect of single-oocyte culture system on in vitro maturation and developmental competence in mice. *Reproductive Medicine and Biology*, 査読有, Vol.13, 2014, 153-159. DOI: 10.1007/s12522-014-0177-1
- ③ 星野由美、卵成熟における紡錘体の形成メカニズムと加齢による紡錘体への影響、*日本IVF学会誌*、17巻2号、査読有、2014、pp.10-15.

[学会発表] (計5件)

- ① 星野由美、宮本拓真、川合智子、内田隆史、島田昌之、プロリン異性化酵素Pin1は受精卵の卵割に機能する、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月2日、パシフィコ横浜(神奈川)。

- ② 星野由美、川合智子、内田隆史、島田昌之、プロリン異性化酵素 Pin1 による着床前初期胚発生に果たす役割、第 34 回日本受精着床学会、2016 年 9 月 15 日、軽井沢プリンスホテルウエスト（長野）。
- ③ Yumi Hoshino. How do we select high-quality oocyte? The 15th Research Center for Mathematics on Chromatin Live Dynamics (ReMcD) Seminar. July 15, 2016. Higashi-Hiroshima (Hiroshima).
- ④ 星野由美、川合智子、内田隆史、島田昌之、卵子の形成・成熟、受精後の初期胚発生過程におけるプロリン異性化酵素 Pin1 の発現と機能、第 57 回日本卵子学会、2016 年 5 月 14 日、朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター（新潟）。
- ⑤ 高橋さゆり、内田隆史、星野由美、マウス卵子および初期胚における Pin1 の局在解析、第 56 回日本卵子学会、2015 年 5 月 30 日、栃木県総合文化センター（栃木）。

[その他]

ホームページ等

<http://seeds.office.hiroshima-u.ac.jp/profile/ja.860622c800996bab520e17560c007669.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 由美 (HOSHINO YUMI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・助教

研究者番号：10451551