

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18823

研究課題名(和文)なぜ卵母細胞の紡錘体形成チェックポイントは弱いのか？

研究課題名(英文)Why is the spindle assembly checkpoint weak in oocytes?

研究代表者

京極 博久(Hirohisa, Kyogoku)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・訪問研究員

研究者番号：20726038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：卵母細胞では、紡錘体形成チェックポイント効率が体細胞に比べて低いことが知られている。本研究では、ライブイメージングと顕微操作を組み合わせた解析により、紡錘体形成チェックポイント効率は細胞質量依存的に変化すること、また、これは核膜崩壊前の細胞質と核の比によって変化することを明らかにした。これにより、これまで直接的に示せなかった卵母細胞の紡錘体形成チェックポイント効率の低さの原因が、卵母細胞特有の大きな細胞質にあることを示した。

研究成果の概要(英文)：It is known that the spindle assembly checkpoint is less stringent in oocytes than in somatic cells. In this study, using live imaging and micromanipulation, we show that cytoplasmic size affects the efficiency of spindle assembly checkpoint. Moreover, we found that the cytoplasmic size-dependent dilution of nuclear factors, limits spindle assembly checkpoint efficiency. These data suggested that the stringency of the spindle assembly checkpoint is limited by the cytoplasmic/nucleus ratio, which explain why the spindle assembly checkpoint is weak in the large volume of oocytes.

研究分野：繁殖生物学

キーワード：卵母細胞 紡錘体形成チェックポイント ライブイメージング マウス 減数分裂 顕微操作

1. 研究開始当初の背景

細胞は分裂の際に娘細胞に染色体を正確に分配し、遺伝情報を維持する。ところが、哺乳類の卵母細胞の減数第一分裂においては、染色体が不均等に分配される頻度がほかの分裂に比べ非常に高いことが知られている (Hassold & Hunt, Nat. Rev. Genet. 2001)。このような染色体の分配異常が、ダウン症など重篤な先天性疾患や不妊の主要な原因と考えられている。この不均等分配の頻度は母体の年齢に大きく影響を受けることが分かっており、そのリスクは現代社会における少子化の一因であるとも考えられるが、なぜ卵母細胞において染色体の不均等分配の頻度が高いのかは長い間わかっていない。

体細胞には、不均等分配を防ぐために、分裂後期への進行を阻害する紡錘体形成チェックポイント機能が備わっている。染色体分配は、分裂後期に染色体が紡錘体微小管に引っ張られることによって起こる。正しい染色体分配を実現するためには、すべての染色体において動原体ペアが微小管によって反対方向から捕捉され、紡錘体の両極に引っ張られて、紡錘体の赤道面に集合しなければならない。分裂後期を開始するためには、後期促進複合体が Cdc20 と結合して活性化する必要がある。Mad2 をはじめとする紡錘体形成チェックポイント構成因子は微小管が接続していない動原体を感知して集まり、Cdc20 と結合することで、後期促進複合体の活性化を阻害し細胞周期を分裂中期に停止させる。全ての染色体で正確な動原体微小管の接続が確立すると紡錘体形成チェックポイントは解除され、細胞は分裂後期へと進行して染色体分配を行う。体細胞においては、不正確な動原体微小管の接続が1つでもあれば、紡錘体形成チェックポイントによって分裂後期への進行が阻害されることが知られている。

一方、卵母細胞においては、紡錘体形成チェックポイントは効率が低く、複数の不正確な接続がない限りは進行が阻害されないことが最近分かってきた (Nagaoka et al., Cur. Biol. 2011)。そこで、卵母細胞と体細胞の最大違いである、細胞質の体積に着目しました。卵母細胞は一般的な体細胞よりも100倍以上大きい細胞質を持っており、これが、紡錘体形成チェックポイントは効率が低い原因でないかと考えました。マウスの卵母細胞よりもさらに大きな細胞質を持つカエル卵母細胞では、紡錘体形成チェックポイント機能が確認されない (Shao et al., J. Cell Biol. 2013) ことなどがその根拠にあげられる。

2. 研究の目的

先天性疾患などにつながる染色体分裂異常の主たる要因である、第一減数分裂における哺乳類卵母細胞の紡錘体形成チェックポイント効率の低さの原因を明らかにすることを目的とした。

(1) まず、顕微操作によって卵母細胞の細胞質量を変化させ、細胞質サイズに依存した分裂後期への進行時間の変化を観察する。

(2) 次に、細胞質量を変化させた卵母細胞において、紡錘体形成チェックポイントの上流因子である Mps1 の阻害剤を使用し、分裂後期への進行時間が早まることを確認することで、分裂後期への進行時間の変化が紡錘体形成チェックポイントの効率が変化したことによるものかを明らかにする。

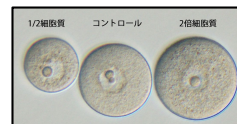
(3) さらに、紡錘体形成チェックポイントシグナリング分子を過剰発現または強制的に局在させることによって、シグナリングのどの分子に紡錘体形成チェックポイント効率の変化を引き起こす要因があるかを特定する。

(4) また、細胞質量を変化させた卵母細胞において、特定した分子の濃度・動態を蛍光相互相関分光法により明らかにし、紡錘体形成チェックポイント効率が低い原因を明確なモデルで示す。

(5) 最後に、胚発生過程では、細胞分裂のたびに細胞質量が減少していく。それぞれの細胞質量での紡錘体形成チェックポイント効率の変化を観察し、この現象が卵母細胞特異的なものなのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞質サイズに依存した紡錘体形成チェックポイント効率の変化の解析は、顕微操作とライブイメージングを組み合わせで行った。分裂後期への進行時間が、卵母細胞の細胞質サイズに依存して変化するかを調べるため、顕微操作により、卵母細胞の細胞質量を半分にしたものと2倍にしたものを作成する。細胞質量を半分にするため、以前報告された方法 (Wakayama and Yanagimachi, Zygote 1998) を用い、マイクロピペットで細胞質を吸引し細胞質量を半分にした卵母細胞を作成する。細胞質量を2倍にするために、顕微操作により卵核胞 (GV) を除去 (Takeuchi et al., Hum. Reprod. 1995) した細胞質と無処理の GV 期卵母細胞を用意する。それらの卵母細胞の透明帯を、酸性タイロイド液を用いて除去した後、電気融合により融合する (Wakayama et al., Zygote 2008) ことで、細胞質サイズが2倍の卵母細胞を作成する。このようにして作成した卵母細胞

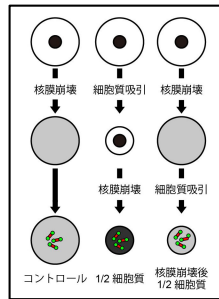


(左図：実際に作成した細胞質量の異なるマウス卵母細胞) を、H2B-mCherry と GFP-MAP4 もしくは GFP-CENPC の高解像度ライブイメージングにより染色体動態を観察し、核膜崩壊から染色体が分かれるまでの時間の変化を観察する。

(2) 次に、分裂後期への進行時間の変化が紡錘体形成チェックポイント効率が変化したことによることを明らかにするため、紡錘体形成チェックポイントの上流因子である

Mps1 阻害剤の Reversine で細胞質量を半分にした卵母細胞を処理しライブセルイメージングにより減数分裂にかかる時間を測定する。紡錘体形成チェックポイント効率によるものであれば、細胞質の大きさに関わらず、紡錘体形成チェックポイントが働かないために分裂は早くなると考えられる。

(3) 紡錘体形成チェックポイント効率の変化が核質と細胞質のどちらで決まっているかを明らかにするため、核膜崩壊の前後で細胞質の大きさを半分にする(右図)。これにより、核質濃度を変化させた 1/2 細胞質卵母細胞を作成し、ライブイメージングにより分裂後期への進行時間の変化を観察する。



(4) 卵母細胞における紡錘体形成チェックポイント効率を変化させる分子の同定を行う。紡錘体形成チェックポイント構成因子は、動原体に局在して機能する。紡錘体形成チェックポイント構成因子である Mad1 を、蛍光標識した動原体タンパク質である Neogreen-CENPC に融合させた mRNA を作成し、顕微注入して発現させることで、紡錘体形成チェックポイント構成因子である Mad1 を動原体に強制的に局在させるシステムを作る。体細胞では、Mad1 を強制的に局在させることで紡錘体形成チェックポイントが働くことが報告されている (Ballister et al., J. Cell Biol. 2014)。細胞質量を 2 倍にした卵母細胞において、この融合タンパク質のライブイメージングを行い、紡錘体形成チェックポイント構成因子の Mad1 の動原体への局在が紡錘体形成チェックポイント効率を変化させるかを明らかにする。さらに、核膜崩壊の前後で細胞質の大きさを半分にした卵母細胞でも同様の実験を行う。紡錘体形成チェックポイントの効率が細胞質サイズで変化した場合は、紡錘体形成チェックポイント効率が動原体と細胞質の比にも影響されることになる。その場合、細胞質量を 2 倍にした卵母細胞において、紡錘体形成チェックポイント効率が上がった場合は、Mad1 が原因となる分子であり、紡錘体形成チェックポイント効率が変化しなかった場合は、その下流である Mad2 が原因分子である可能性が高いと考えられる。

(5) 卵母細胞における SAC 効率を変化させる分子の分子状態解析を蛍光相互相関分光法で行う。蛍光相互相関分光法は、近年、体細胞で発展してきた生細胞内の分子状態解析技術であるが、卵母細胞で行われた報告はなく条件の検討の必要がある。

実験方法としては、後期促進複合体活性化因子である Cdc20 と Mad2 の結合性が、細胞質サイズに依存して変化するかを明らかにするため、Cdc20 と Mad2 にそれぞれ tdTOMATO

と mNeogreen を融合し蛍光標識する。卵母細胞では、体細胞よりも蛍光分子を観察するのが困難なため、mCherry や EGFP よりも明るい蛍光タンパク質である tdTOMATO と mNeogreen を用いる。この蛍光標識した 2 種の分子について蛍光相互相関分光法を行う。Mad2 と Cdc20 は動原体上で主に結合することから、細胞質中における紡錘体からの距離と Cdc20 と Mad2 の結合性、濃度相関を解析する。これにより、卵母細胞は細胞質が大きいため、紡錘体形成チェックポイントシグナルが細胞質に拡散する効率が低く、これが染色体分配異常が起こりやすい原因となっている可能性を示すことができる。

4. 研究成果

(1) 第一減数分裂にかかる時間は、細胞質量を小さくすると遅くなり、大きくすると早くなること分かった。すなわち分裂後期への進行時間は細胞質量依存的に変化することが明らかとなった(図1)。

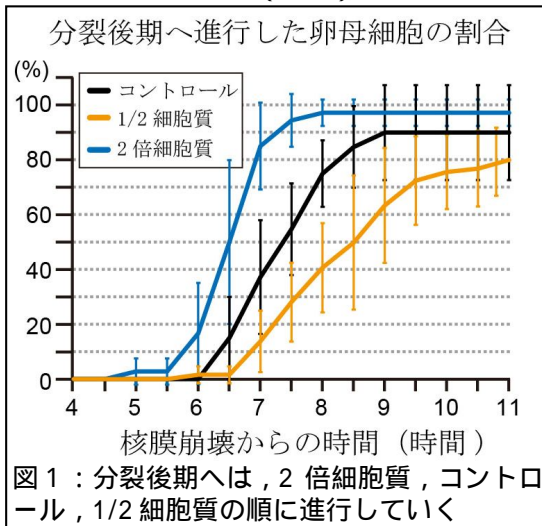


図1: 分裂後期へは、2倍細胞質、コントロール、1/2細胞質の順に進行していく

(2) 細胞質量を小さくした卵母細胞を Mps1 阻害剤の Reversine で処理したところ、コントロール区と同様に分裂後期への進行は早くなった(図2)。よって、細胞質を小さくした時の分裂後期への進行の遅延は紡錘体形成チェックポイント依存的であることが明らかとなった。

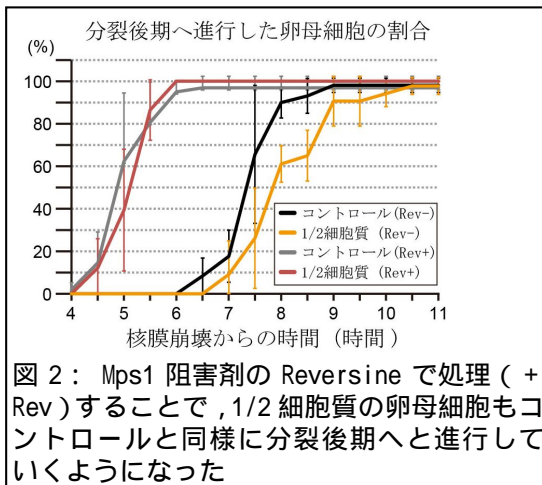


図2: Mps1 阻害剤の Reversine で処理 (+ Rev) することで、1/2細胞質の卵母細胞もコントロールと同様に分裂後期へと進行していくようになった

(3) 核膜崩壊直後に細胞質量を半分にした卵母細胞(核膜崩壊後1/2細胞質)は、コントロール区と同様の分裂後期への進行時間を示した(図3)。すなわち、この紡錘体形成チェックポイント依存的な分裂後期への進行の変化は、核膜崩壊前の核と細胞質の比によって決まっていると明らかになった。

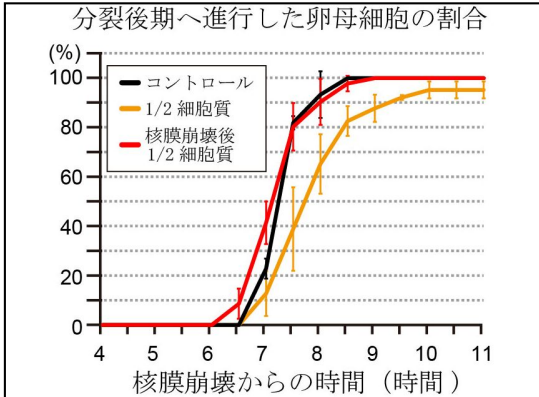


図3: 核膜崩壊後に細胞質量を半分にすると、分裂後期への進行時間はコントロール区と同様になった。

(4) Mad1を高濃度で人為的に動原体に局在させたところ、コントロール卵母細胞では分裂後期への進行が阻害されたが、細胞質量を2倍にした卵母細胞では阻害されなかった(図4左)。また、Mad1をコントロールでは、分裂後期へ進行できる程度の低濃度で人為的に動原体に局在させたところ、核膜崩壊前に細胞質量を半分にした卵母細胞では、優位に分裂後期への進行が阻害された。しかし、核膜崩壊後に半分にした卵母細胞では、コントロールと同様に分裂後期への進行は阻害されなかった(図4右)。この結果から、細胞質量の変化に伴う紡錘体形成チェックポイント効率の変化は、動原体と細胞質の比に左右されず核膜崩壊前の細胞質と核質の比で決まっていることが明らかになった。

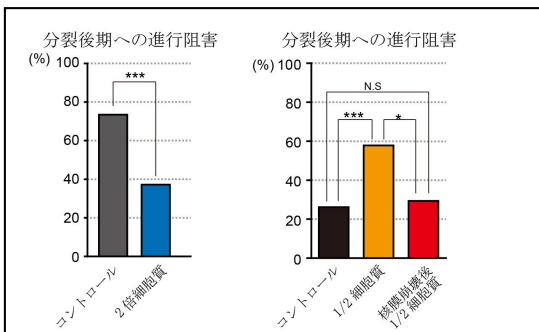


図4: Mad1を高濃度(左)と低濃度(右)で動原体に局在させ分裂後期への進行を観察したところ、分裂後期への進行は細胞質と核質の比に依存して阻害された。

当初予期していない、細胞質と核質の比が紡錘体形成チェックポイント効率を変化させることが明らかとなったことから、核膜上で形成される紡錘体形成チェックポイント

タンパク質に着目した。最近、体細胞では核膜孔で紡錘体形成チェックポイントタンパク質があらかじめ形成されていることが報告されたことなどがその根拠になる(Rodriguez et al., Cell 2014)。活性化した紡錘体形成チェックポイントタンパク質の指標としてC-Mad2を免疫染色により、検出したところ、核膜上のC-Mad2の量は細胞質サイズによらず一定であったが(図5)、核膜崩壊後の動原体への局在は細胞質量依存的に変化した(図6)。

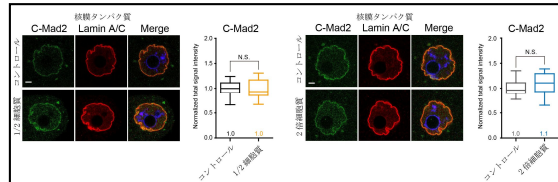


図5: 核膜上のC-Mad2の蛍光強度は全ての実験区で同様な値を示した。

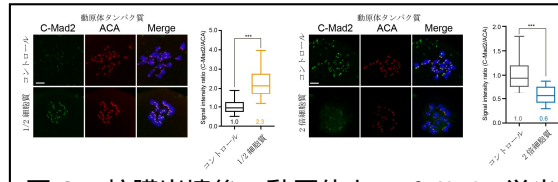


図6: 核膜崩壊後の動原体上のC-Mad2蛍光強度は、1/2細胞質はコントロールの約2倍(左)、2倍細胞質ではコントロールの約半分(右)の値を示した。

これらの結果から紡錘体チェックポイント効率は、核膜崩壊前にあらかじめ核膜上で形成される活性化した紡錘体形成チェックポイントタンパク質の量で決まっており、体細胞に比べて核と細胞質の比が大きい卵母細胞は、核膜崩壊後に効率的に動原体に紡錘体形成チェックポイントタンパク質を集めることができず紡錘体形成チェックポイント効率が低くなることが示された。

(5) より詳細な紡錘体毛性チェックポイントタンパク質の分子状態解析を蛍光相互相関分光法で行おうと試みた。卵母細胞では、行われたことがなく条件検討をした結果、卵母細胞でも蛍光相互相関分光法を使用することができる状態にはできた。しかし、本研究では、mRNAを用いて過剰発現させた蛍光タンパク質を用いて解析を行うため、内在性のタンパク質の影響が大きく思うような結果が得られなかった。今後は、ノックアウトマウスを用いることで蛍光相互相関分光法により、タンパク質間の相互作用を解析できると考えている。

本研究により、最新のライブイメージング技術と顕微操作を組み合わせた独自の切り口から解析することによって新たな視点から研究を展開し、これまで直接的に示せなかった卵母細胞の紡錘体形成チェックポイント効率の低さを示すことができ、世界をリードす

る研究ができたと考えている。

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1件)

Kyogoku H, Kitajima TS
Large Cytoplasm Is Linked to the Error-Prone Nature of Oocytes、
Developmental Cell、査読有、41巻、2017年、pp.287-298、
DOI:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2017.04.009>

[学会発表](計5件)

京極 博久、北島 智也、卵母細胞は大きな細胞質のために染色体分配異常を起こしやすい、第109回日本繁殖生物学会大会、2016年9月13日、麻布大学(神奈川県・相模原市)

Hirohisa Kyogoku, Tomoya S Kitajima、Large cytoplasmic size is linked to the error-prone nature of oocytes、CDB symposium 2016 Size in Development、2016年3月29日、RIKEN Center for Developmental Biology(兵庫県・神戸市)

京極 博久、北島 智也、卵母細胞では細胞質の体積が紡錘体チェックポイントの強さに影響する、BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会)、2015年12月1日~4日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

京極 博久、北島 智也、卵母細胞の紡錘体チェックポイントは、なぜ弱いのか?、第108回日本繁殖生物学会大会、2015年9月12日、宮崎大学(宮城県・宮崎市)

Hirohisa Kyogoku, Tomoya S Kitajima、The cytoplasmic volume controls the spindle size and checkpoint in oocytes、The 26th CDB meeting Mechanistic Perspectives of Multicellular Organization、2015年9月8日、RIKEN Center for Developmental Biology(兵庫県・神戸市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.cdb.riken.jp/lcs/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

京極 博久(Kyogoku Hirohisa)
国立研究開発法人理化学研究所・多細胞シ
ステム形成研究センター・訪問研究員
研究者番号: 20726038

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし