

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06682

研究課題名(和文) 哺乳動物卵母細胞における中心体非依存的な紡錘体二極性化機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms for acentrosomal spindle bipolarization in mammalian oocytes

研究代表者

吉田 周平 (Yoshida, Shuhei)

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・上級研究員

研究者番号：20363997

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)：染色体を正しく分配するには紡錘体が二極性であることが重要である。哺乳動物の卵母細胞は紡錘体の極性を決定づける中心体を持たない。そして哺乳動物卵母細胞が中心体非依存的に紡錘体を二極性化する機構は未だ明らかになっていない。

我々はマウス卵母細胞の減数第一分裂では動原体の機能が紡錘体の二極性化に必要であること、そして減数第一と第二分裂では異なる機構により紡錘体が二極性化することを見出した。減数第二分裂様の紡錘体形成を誘導した減数第一分裂では染色体分配異常が起こりやすかったことから、卵母細胞の減数第一分裂では動原体が主導する紡錘体の二極性化機構が重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳動物の卵母細胞における減数分裂では染色体分配異常が起こりやすく、流産や先天性疾患の原因となる。しかし哺乳動物の卵母細胞における染色体分配に重要な紡錘体の二極性化機構は未だ明らかになっていない。

我々は本研究において、マウス卵母細胞の減数第一分裂では動原体の機能が紡錘体の二極性化に必須であることを見出した。マウス卵母細胞における紡錘体の二極性化機構を明らかにすることは、哺乳動物の卵母細胞において染色体分配異常が起こりやすい原因解明の手掛かりとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)： Spindle bipolarization is prerequisite for chromosome segregation. However, mammalian oocytes do not have centrosomes which determine polarity of the spindle. Mechanisms for acentrosomal spindle bipolarization in mammalian oocytes have not been cleared yet.

We found that kinetochores are required for spindle bipolarization during meiosis I in mouse oocytes. We also found that spindle is bipolarized by different mechanisms between meiosis I and meiosis II in mouse oocytes. Artificially induced meiosis II-like spindle bipolarization during meiosis I increased chromosome missegregation, indicating kinetochore-based spindle bipolarization is required for faithful chromosome segregation during meiosis I in mouse oocytes.

研究分野：分子生物学

キーワード：染色体分配 卵母細胞 動原体

1. 研究開始当初の背景

卵母細胞は減数第一、第二分裂の2回の染色体分配を経て卵子となり、精子と受精することで個体発生へと至る。配偶子である卵子が染色体を正しく所持するにはこの減数第一、第二分裂が正しく行われる必要があるが、他の細胞に比べ卵母細胞の減数分裂では染色体分配異常が起こりやすい。そしてそのことが流産や先天性疾患の原因となっている。

染色体は主に微小管によって構成される紡錘体により分配される。そして紡錘体が二極性であることが染色体を正しく分配するためには重要である。多くの動物の体細胞においては複製され2つになった中心体が分裂期には主な微小管重合中心として機能し、二極性の紡錘体を形成する。しかし多くの生物における卵母細胞は中心体を持たず、中心体非依存的に二極性紡錘体を形成する。哺乳動物であるマウスの卵母細胞も中心体を持たない。そしてその中心体非依存的な紡錘体二極性化機構の全貌は未だ明らかになっていない。

近年我々はマウス卵母細胞の減数第一分裂において動原体の機能が紡錘体の二極性化に必要であることを見出した。さらに減数第二分裂では動原体の機能が紡錘体の二極性化に必須ではないことを見出した。減数第一分裂と第二分裂では異なる機構によって紡錘体が二極性化されることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的はマウス卵母細胞の減数第一分裂と第二分裂において、それぞれ異なる紡錘体の二極性化機構を明らかにすることである。マウス卵母細胞の減数第一分裂では動原体依存的に紡錘体が二極性化されるのに対し、第二分裂では動原体非依存的に紡錘体が二極性化される。減数第一分裂と第二分裂では染色体の構造や細胞内環境が異なるため、それぞれに適した紡錘体の二極性化機構が確立されていることが予想される。減数第一分裂と第二分裂における紡錘体の二極性化機構を解明、比較することにより、哺乳動物の卵母細胞において染色体分配異常が起こりやすい原因の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 卵母細胞の減数第一分裂における紡錘体二極性化機構の解明

マウス卵母細胞の減数第一分裂では、動原体に逆方向性微小管のクロスリンカータンパク質を集積させることで動原体近傍より微小管の二極性化を促進し、紡錘体を二極性化していることが予想される。そして逆方向性微小管のクロスリンカータンパク質が動原体に局在するためには動原体キナーゼの活性が重要である。

そこで足場となる動原体タンパク質のリン酸化が予想される部位への変異導入、及び動原体キナーゼの阻害により動原体に局在する逆方向性微小管のクロスリンカータンパク質を抑制し、その紡錘体を観察することで我々の仮説が正しいかを検証した。

(2) 卵母細胞の減数第二分裂における紡錘体二極性化機構の解明

マウス卵母細胞の減数第二分裂では細胞質内に微小管のクロスリンカータンパク質が増加することで紡錘体のいたる所で逆方向性微小管束の形成が促進され、動原体に依存せずに紡錘体を二極性化することが予想される。

そこで減数第二分裂の紡錘体で増加している微小管のクロスリンカータンパク質や微小管束形成因子を抑制した状態で紡錘体を観察することにより、我々の仮説が正しいかを検証した。

(3) 卵母細胞における減数第一分裂と第二分裂における紡錘体二極性化機構の比較

マウス卵母細胞の減数第一分裂と第二分裂では、それぞれに適した紡錘体の二極性化機構が構築されており、異なる様式の紡錘体の二極性化機構を導入した卵母細胞では染色体分配異常が引き起こされることが予想される。

そこで減数第二分裂で増加している因子の減数第一分裂へ導入し、減数第二分裂様の紡錘体二極性化機構を導入して染色体分配を観察することにより、我々の仮説が正しいかを検証した。

4. 研究成果

(1) 卵母細胞の減数第一分裂における紡錘体二極性化機構

卵母細胞の減数第一分裂では動原体 微小管接続は紡錘体の二極性化に必須ではない

我々はマウス卵母細胞の減数第一分裂では動原体タンパク質である Ndc80 が紡錘体の二極性化に必須であること、しかし動原体 微小管接続能を欠失した Ndc80 が紡錘体を二極性化しうることを見出した (Yoshida et al., 2020)。マウス卵母細胞の減数第一分裂において Ndc80 は紡錘体の二極性化に必要なが、Ndc80 の動原体 微小管接続能は紡錘体の二極性化には必須ではないこと、そして Ndc80 が動原体 微小管接続の形成とは独立した紡錘体の二極性化機構に関わる機能を担っていることが示唆された。

卵母細胞の減数第一分裂では動原体キナーゼが紡錘体の二極性化を制御している

我々は、卵母細胞の動原体には微小管のクロスリンカータンパク質が集積しており、クロスリンカータンパク質を抑制することで紡錘体の二極性化が遅延することを見出した (Yoshida et

al., 2020)。そして動原体キナーゼの活性を阻害することでクロスリンカータンパク質の動原体への局在量が減少し、紡錘体の二極性が遅延すること、また足場となる動原体タンパク質の予想されるリン酸化部位に変異を導入することでクロスリンカータンパク質の動原体への局在量が減少することを見出した。さらに *in vitro* で動原体タンパク質をリン酸化することにより動原体タンパク質と相互作用するクロスリンカータンパク質が増加することを見出した。マウス卵母細胞の減数第一分裂では、動原体キナーゼが動原体タンパク質をリン酸化することによりクロスリンカータンパク質が動原体に集積し、紡錘体を二極性化していることが示唆された。

(2) 卵母細胞の減数第二分裂における紡錘体二極性化機構

マウス卵母細胞の減数第二分裂では幾つかの微小管のクロスリンカータンパク質が増加している。我々は減数第二分裂の卵母細胞において、動原体に局在する微小管のクロスリンカータンパク質が増加していることを見出した。またそのクロスリンカータンパク質を減数第一分裂の卵母細胞内に増加させることで紡錘体が二極性化する速度や紡錘体の形態が減数第二分裂様に変化することを見出した。さらにクロスリンカータンパク質を増加させることで Ndc80 を欠失させた卵母細胞の減数第一分裂においても紡錘体を二極性化できるようになることを見出した (Yoshida et al., 2020)。また卵母細胞の減数第二分裂では Ndc80 が欠失していても紡錘体は二極性化することができるが、幾つかの微小管束形成を促進する因子を同時に抑制することで減数第二分裂の紡錘体が二極性化できなくなることを見出した。マウス卵母細胞の減数第二分裂では、微小管のクロスリンカータンパク質が増加していることが動原体非依存的な紡錘体の二極性化機構に重要であることが示唆された。

(3) 卵母細胞における減数第一分裂と第二分裂の紡錘体二極性化機構の比較

我々は、微小管のクロスリンカータンパク質が量的に少なく動原体に集積している卵母細胞の減数第一分裂では紡錘体は緩やかに二極性化し、微小管のクロスリンカータンパク質が増加している第二分裂では紡錘体は速やかに二極性化することを見出した。そして減数第一分裂においてクロスリンカータンパク質を増加させた卵母細胞では減数第二分裂様に速やかに紡錘体が二極性化すること、さらにそれらの紡錘体が速やかに二極性化した減数第一分裂の卵母細胞では染色体分配異常が起こりやすいことを見出した (Yoshida et al., 2020)。

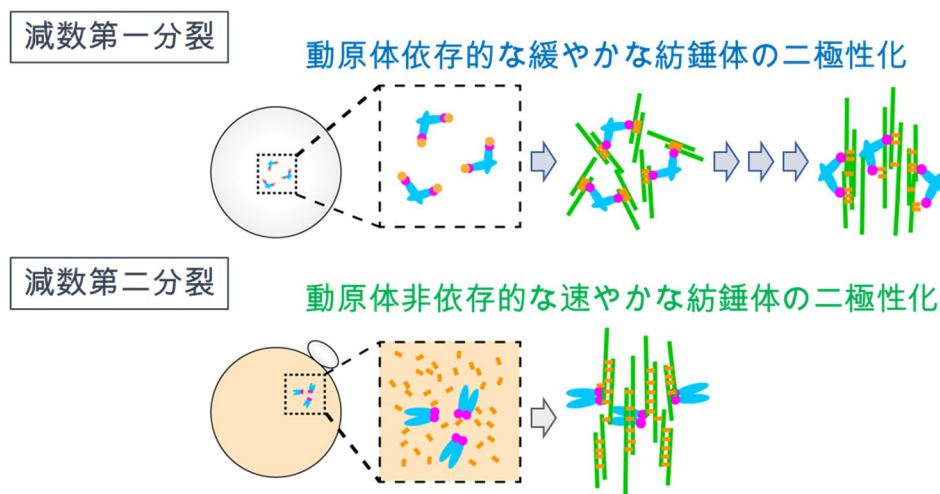


図. マウス卵母細胞における紡錘体の二極性化機構

我々の見出した結果より、マウス卵母細胞の減数第一分裂では動原体に微小管のクロスリンカータンパク質が集積し、紡錘体が動原体近傍より緩やかに二極性化されることが染色体を正しく分配するために重要であることが示唆された。

<引用文献>

Yoshida S, Nishiyama S, Lister L, Hashimoto S, Mishina T, Courtois A, Kyogoku H, Abe T, Shiraishi A, Choudhary M, Nakaoka Y, Herbert M, Kitajima TS. Prc1-rich kinetochores are required for error-free acentrosomal spindle bipolarization during meiosis I in mouse oocytes. *Nat Commun* (2020) 27;11(1):2652.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

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 Nishiyama Sui, Yoshida Shuhei, Kitajima Tomoya S.	4. 巻 25
2. 論文標題 Cdk1 negatively regulates the spindle localization of Prc1 in mouse oocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 685 ~ 694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12803	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 Yoshida Shuhei, Nishiyama Sui, Lister Lisa, Hashimoto Shu, Mishina Tappei, Courtois Aurelien, Kyogoku Hirohisa, Abe Takaya, Shiraishi Aki, Choudhary Meenakshi, Nakaoka Yoshiharu, Herbert Mary, Kitajima Tomoya S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Prc1-rich kinetochores are required for error-free acentrosomal spindle bipolarization during meiosis I in mouse oocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-020-16488-y	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

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田 周平、北島 智也
2. 発表標題 動原体はどのようにマウス卵母細胞の紡錘体を二極性化するのか
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 吉田 周平、北島 智也
2. 発表標題 How do kinetochores bipolarize the spindle in mouse oocytes?
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 周平、北島 智也
2. 発表標題 Kinetochores-driven bipolar spindle formation in mouse oocytes
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（オンライン）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田 周平、北島 智也
2. 発表標題 哺乳動物卵母細胞における中心体非依存的な紡錘体二極性化機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
---------	---------