

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15811

研究課題名（和文）初期の胚発生過程において染色体分配異常の頻度が変化する原因の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the cause of changes in the frequency of chromosome segregation error during early embryonic development

研究代表者

京極 博久 (Kyogoku, Hirohisa)

神戸大学・農学研究科・助教

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）：細胞は染色体分配を行う際、主に微小管によって構成された、紡錘体とよばれる細胞内構造体により行われる。本研究では、細胞質サイズと紡錘体を主に構成する微小管に着目して、紡錘体の安定性を変化させる原因を、ライブイメージングと顕微操作技術を組み合わせて解析した。その結果、卵母細胞と初期胚の両方において、核/細胞質比が微小管の安定性を変化させることを明らかにした。また、微小管安定化候補因子の同定にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、哺乳類の卵母細胞の減数第一分裂や初期の胚発生過程においては、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く、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、なぜ卵母細胞や初期胚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。本研究成果は、これらの疑問の一部にこたえられるものである。

研究成果の概要（英文）：During cell division, a set of chromosomes must be evenly segregated to two daughter cells. In oocytes and early embryos, however, chromosomes frequently undergo segregation errors. Why chromosome segregation in oocytes and early embryos is error-prone remains poorly understood. In this study, we show that artificial reduction of cytoplasmic size can increase the stability of the spindle. Measurement of the stability of spindle microtubules using photoactivatable-GFP tubulin revealed that cytoplasmic reduction increased spindle stability, whereas cytoplasmic enlargement decreased. These effects were mediated by changes in the nuclear-to-cytoplasmic (N/C) ratio. These results suggest that the large cytoplasmic size in oocytes lowers spindle stability by reducing the N/C ratio. Moreover, we identified microtubule stabilizer.

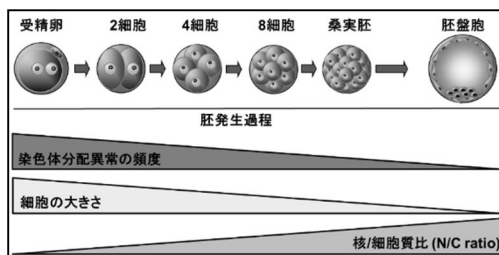
研究分野：生殖生物学・発生工学

キーワード：卵母細胞 初期胚 微小管 紡錘体 細胞サイズ

### 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や初期の胚発生過程においては、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; Mantikou et al., BOR. 2013)。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、なぜ卵母細胞や初期胚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。

卵母細胞や受精卵は体細胞に比べ、体積にして100倍以上の非常に大きな細胞質を持ちます。受精卵は、細胞を成長させずに細胞分裂を行うため、この非常に大きな細胞質は卵割の度に半分になっていきます。ヒト胚における研究により染色体分配異常頻度は卵割が進むにつれて低下することが報告されており (Mantikou et al., BOR. 2013)、卵割に伴って細胞質サイズが変化することが染色体分配異常の頻度を変化させる原因ではないかと考えられるが、直接示した研究はない。



複製された染色体を娘細胞へ均等に分配する過程は、紡錘体とよばれる微小管を基礎とした細胞内構造体により行われる。紡錘体を構成する微小管には主に2種類あり、動原体に接続していない不安定な微小管と動原体に接続している安定な動原体微小管です。体細胞では、この動原体微小管の量が多く、正確な染色体分配には必須であることが Photoactivation (光活性化) -GFP-Tubulinの実験から分かっている (Kabeche & Compton, Nature 2013)。

また、体細胞とは異なり、卵母細胞や初期胚は中心体を持たず、これまでの中心体を持たないカエル卵母細胞の第二減数分裂抽出液を用いた実験系を中心に、染色体近傍から微小管生成が紡錘体形成に寄与することが明らかにされてきた。染色体を足場にして産生される RanGTP 活性が、種々の微小管結合因子を制御し、染色体近傍で局所的に微小管の安定化を促すことで、紡錘体形成に必要な微小管が供給されると考えられている (Karsenti & Vernos, Science 2001)。しかし、マウス卵母細胞の第一減数分裂では否定的な報告があり (Dumont et al., J Cell Biol. 2007)、実際にどのような分子機構で紡錘体の微小管が安定化しているのかは未だに明らかになっていない。

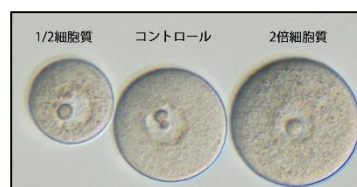
### 2. 研究の目的

本研究では、「初期の胚発生過程において染色体分配異常の頻度が変化する原因の解明」を目的とする。そこで、紡錘体を主に形成する動原体微小管に着目して明らかにしていく。複製された染色体を娘細胞へ均等に分配する過程は、紡錘体とよばれる微小管を基礎とした細胞内構造体により行われる。体細胞では、この微小管のターンオーバーは比較的ゆっくりであることが、Photoactivation (光活性化) -GFP-Tubulinの実験から分かっている (Lecland & Lüders, Nat Cell Biol. 2014)。申請者は、最近、マウス卵母細胞において第一減数分裂期の紡錘体の微小管のターンオーバーが非常に早い (~5分) ことを発見した。これは、マウス卵母細胞の第一減数分裂における紡錘体微小管が不安定であることを示している。一般的な体細胞では、紡錘体微小管は分裂期に向けて安定化していき染色体分配を行うことから、卵母細胞の第一減数分裂では、紡錘体微小管の安定性が低く、これが卵母細胞の第一減数分裂で染色体分配異常の頻度が高い原因のひとつではないかと考えた。紡錘体微小管が不安定になると紡錘体にかかる力が不安定になり、染色体が整列しにくくなり、染色体が正確に引っ張られていることを感知するシステムが働きにくくなるのが原因ではないかと推測される。申請者は、これまでに卵母細胞においては、紡錘体が細胞質量依存的に大きくなり紡錘体極の安定性が細胞質量依存的に低下し紡錘体の機能が低下することを見出しており (Kyogoku et al., Dev. Cell 2017)、これが、その根拠にあげられる。

### 3. 研究の方法

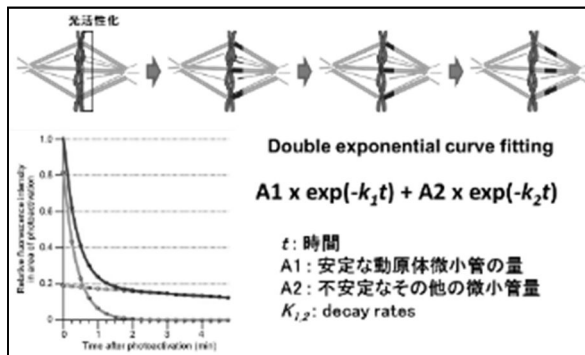
#### (1) 細胞質量による動原体微小管安定性の変化の解明

まず、卵母細胞の最大の特徴である、巨大な細胞質サイズと紡錘体を主に構成している微小管に着目し、卵母細胞の第一減数分裂における動原体微小管の安定性が細胞質量サイズ依存に依存して変化するかを調べる。顕微操作により、卵母細胞の細胞質量を半分にしたもの (Halved) と2倍にしたもの (Doubled) を作成する (Kyogoku et al., Development 2014)。



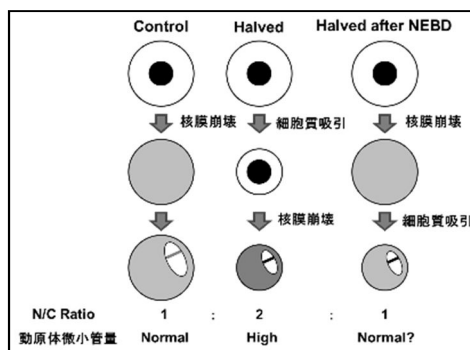
作成した卵母細胞 (右図: 実際に作成した細胞質量の異なるマウス卵母細胞) に、H2B-mCherry と Photoactivation-GFP-Tubulin を発現さ

せ, Sir700-Tubulin により紡錘体全体の形状を確認しながら染色体近傍を光活性化し高解像度ライブイメージングにより, 微小管の安定性を観察する。蛍光強度の変化を測定した後, Double exponential curve fitting を行うことで, 安定な動原体微小管とその他の微小管成分を分けて解析する(右図)。



(2) 動原体微小管安定性を变化させる要素の特定

次に, 核内物質濃度に着目し, 核膜崩壊の前後で細胞質量を半分にする事で, 紡錘体のサイズは小さいが核内物質の濃度が半分(コントロールと同等)の卵母細胞を作成し(右図右), 先の実験と同様に動原体微小管の安定性を観察する。これにより, 動原体微小管の不安定性が, 核内物質の濃度(N/C Ratio)によるものか, 紡錘体サイズによって決まっているかを切り分けることができる。



(3) 初期の胚発生過程における染色体分配異常頻度と動原体微小管安定性の变化の解明

初期胚の発生過程において, 実際に, 細胞質サイズが変化するに伴って動原体微小管の安定性が変化するのかを調べる。先の実験と同様に, 各細胞周期において動原体微小管の安定性を観察する。

(4) 動原体微小管安定化因子の同定

質量分析法(Mass Spec)により動原体微小管安定化因子の同定を行う。(2)の実験より動原体微小管安定化因子が核に含まれるのか細胞質に含まれるのかが特定できている。そこで, 顕微操作を用いて, 核, 細胞質, 紡錘体に分けてサンプリングし質量分析を行う。そうして得られたデータから核もしくは細胞質に多く含まれており紡錘体のサンプルに検出されたタンパク質を候補として, それらのタンパク質に GFP タグをつけたものを作成し, 発現させることで局在を確認する。さらに, それらのタンパク質を過剰発現することにより, 動原体微小管の安定性が変化するかを観察する。

(5) 動原体微小管安定性の分子機構の解明

(4)の実験より同定された因子について NLS に変異を入れるなど局在に関する変異体による解析を行う。また, ノックアウトマウスを作成し, 詳細な分子メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 動原体微小管の割合は, 細胞質が小さい方が多くなり, 細胞質が大きい方が少なくなりました。すなわち, 動原体微小管の安定性は細胞質サイズに依存して変化することが明らかとなった(図1)。

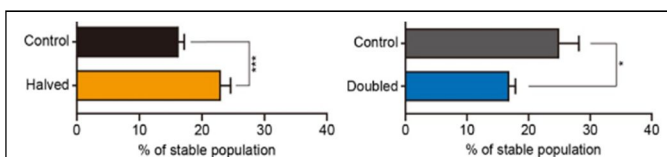


図1: 動原体微小管の割合

(2) 通常, 細胞質を半分にするときは核膜崩壊前に半分にするので, コントロールと Halved では, 細胞質の大きさは異なりますが, 核の大きさは同じなため N/C Ratio は倍になります。しかし, 核膜崩壊直後に半分にする事によって, 細胞質は半分ですが, 核と細胞質の比がコントロールと同じ卵母細胞(Halved after NEBD)を作成しました。もし, N/C Ratio が原因であれば, 動原体微小管の量はコントロールと同じになるはず。実際に PAGFP を用いて微小管の安定性を計測してみると, この卵母細胞の動原体微小管量はコントロールと同様でした。すなわち, 動原体微小管の安定性を变化させていたのは N/C Ratio であるということが明らかとなった。

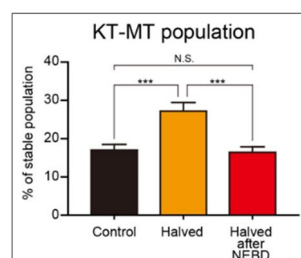


図2: N/C ratio と動原体微小管の割合



(3) 先の実験結果から、N/C Ratio が動原体微小管の安定性を変化させていることが明らかとなった。胚の発生過程を見てみると、卵割が進むにつれて N/C Ratio が増加していくことが知られています。そこで実際に、初期胚で PAGFP-Tubulin を用いた同様の実験を行いました。動原体微小管の割合を見てみると、階段状にあがっているのが分かると思います。1-2 細胞と 2-4 細胞は優位な差はありませんでしたが、前核期の N/C Ratio は核が 2 つあるために 2 細胞期とほとんど変わらないことから、今回立てた仮説に合致していると考えられます。

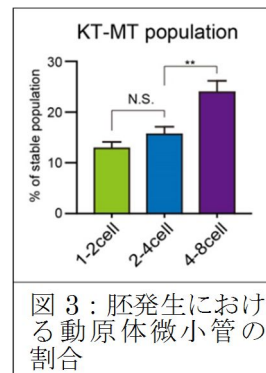


図 3：胚発生における動原体微小管の割合

(4) これまでの結果から、胚発生においても、N/C Ratio が増加していくことで動原体微小管の安定性を高めていることが明らかとなりました。これらの結果より、核内に微小管安定化因子が蓄えられていると考えられます。そこで、その微小管安定化因子を同定するために、マイクロマニピュレーションを用いて、父型の前核、母型の前核、核を抜いた細胞質を作成し質量分析法 (Mass Spec) を用いて、核特異的にあるタンパク質の同定を試みました。父型と母型の核に共通にあり脱核した細胞質に検出されなかった核特異的なタンパク質を 175 つ同定しました。その中の 1 つの NuSAP というタンパク質が体細胞では、Ran Pathway の下流にあり、微小管安定化因子の 1 つとして知られていたもので、EGFP タグをつけた NuSAP-EGFP を作成しその局在を観察したところ、核膜崩壊前は核に局在し核膜崩壊後は紡錘体に局在しました。また、紡錘体に局在している NuSAP の蛍光強度を計測すると、細胞質が小さいと高く、大きいと低くなっていました。また、NuSAP を卵母細胞に過剰発現させると微小管の安定性は上昇した。すなわち今回の仮説に合致する微小管安定化因子の有力な候補だと考えられます。

(5) 次に NuSAP の局在が微小管安定性に変化を与えるかを、NuSAP の NLS サイトに変異を入れることで核への局在を阻害することで検証した。核への局在を阻害してやると、微小管の安定性は低下した。すなわち核膜崩壊前に核内に局在していることが何らかの重要な役割を果たしていることを示唆している。さらに、NuSAP のノックアウトマウスを作成し、PAGFP-Tubulin を用いて同様に動原体微小管の割合を測定したところ、割合は低下した。すなわち NuSAP は今回の仮説に合致する微小管安定化因子であると考えられる。しかし、in vivo での局在や発現量などは、NuSAP に対する適切な抗体がなく免疫染色やウエスタンブロッティングで確認できない。抗体作成も外注したが、いずれも機能しなかった。今後、ノックインマウスを作成しさらなる検証を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 京極博久
2. 発表標題 Cytoplasmic size modulates kinetochore-microtubule stability in early embryonic development
3. 学会等名 第2回 新学術領域研究「配偶子インテグリティの構築」領域会議
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

染色体分配研究チーム <a href="http://chromosegr.riken.jp/index.html">http://chromosegr.riken.jp/index.html</a>
---

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