

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21404

研究課題名(和文)新規力計測プローブを用いた哺乳類卵母細胞の紡錘体エラー発生メカニズムの探究

研究課題名(英文) Developing a novel force sensor to examine the mechanisms of spindle assembly errors in mammalian oocytes

研究代表者

島本 勇太(Shimamoto, Yuta)

国立遺伝学研究所・遺伝メカニズム研究系・准教授

研究者番号：80409656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、哺乳類の卵母細胞で起こる染色体分配エラーの原因を解明するため、染色体分配装置である紡錘体の構造欠陥や力学的不均衡を可視化解析できるナノサイズの人工素子を開発することを目的として行なった。DNAオリガミ技術を使ってDNAをコイル状に成形した微小機械バネを作成し、その両端に細胞分裂期で機能しない微小管結合タンパク質を共有結合することで紡錘体へのターゲッティングを実現した。さらにこの人工素子の表面を蛍光色素とポリマーで二重被覆し、細胞質環境における局在と運動の安定な可視化解析を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、未受精卵の内部に形成される染色体分配装置の構造欠陥を可視化することのできるナノサイズの人工素子の開発を行なった。染色体分配装置の形成異常は親細胞から娘細胞への不正確な遺伝情報の継承を招き、胚発生の異常や不妊の主要な原因と考えられている。本開発技術のさらなる精錬により分配装置の形成異常が起こる生物物理学的メカニズムの解明が可能となり、また紡錘体形成異常の早期発見等による新たな治療戦略の創出が期待される。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed at developing a novel biophysical tool that enables us to visualize local structural defects and mechanical imbalance within the meiotic spindle, which is assembled in mammalian oocytes for error-free partitioning of chromosomes during cell division. To achieve this, DNA origami-based technology was utilized to create a series of nanometer-sized mechanical springs, which were each flanked by microtubule-binding domains for targeting the spindle. By fluorescent-labeling and polymer-coating, we achieved a specific targeting of the nanospring to microtubules and a stable tracking of its movement within a meiotic cytoplasm.

研究分野：生物物理学

キーワード：紡錘体 微小管 DNAオリガミ 卵母細胞 力学計測

### 1. 研究開始当初の背景

染色体分配は親細胞から娘細胞への遺伝情報継承に必須の生命現象であり、紡錘体と呼ばれる細胞内装置によって行われる。紡錘体は高等生物では数千から数万本の微小管が自己組織的に集合することで形成され、特徴的な双極状の構造を示す。紡錘体の形成異常、例えば多極性の紡錘体は、染色体の異数化や断片化を介して娘細胞に不全を来す。特に卵母細胞における染色体分配エラーの頻度は高く、マウス等を用いたこれまでの研究で、紡錘体の不安定性が要因の一つであることが示唆されていた (Thomas et al., Biochem Soc Trans, 2021 等)。

研究代表者は、アフリカツメガエル未受精卵から調製される無希釈の細胞質抽出液やインビトロ再構成の手法を使って、減数分裂期の紡錘体が持つ力学安定性や微小管網の微細な動き、局所の硬さ、粘弾性等を独自の計測技術を利用して明らかにしてきた (Shimamoto et al., Cell, 2011; Shimamoto and Kapoor, Nat Protoc, 2012 等)。特に最近行った解析により、紡錘体の各部、例えば極付近と赤道面付近では微小管網の架橋強度とゲル的・ゾルの性質が大きく異なること、この空間的な違いが紡錘体の構造全体の安定性に本質的な寄与をしていることを明らかにした (Takagi et al., Dev Cell, 2019)。これらの結果はマウス等の哺乳類細胞における紡錘体の構造不安定性の原因を示唆するものであったが、紡錘体の構成因子やアーキテクチャは種間で大きく異なることが注視されており、哺乳類で起こる減数分裂紡錘体の不安定化の原因を究明するためには同対象での解析が本質的であるとの結論に至った。しかしながら、光ピンセットや磁気ピンセット等の既存技術は、卵母細胞内での力学計測に不十分であった。そこで本萌芽研究では、紡錘体の局所の力学特性とその欠陥を解析可能な新規技術の開発を目指し、これに早期に着手した。

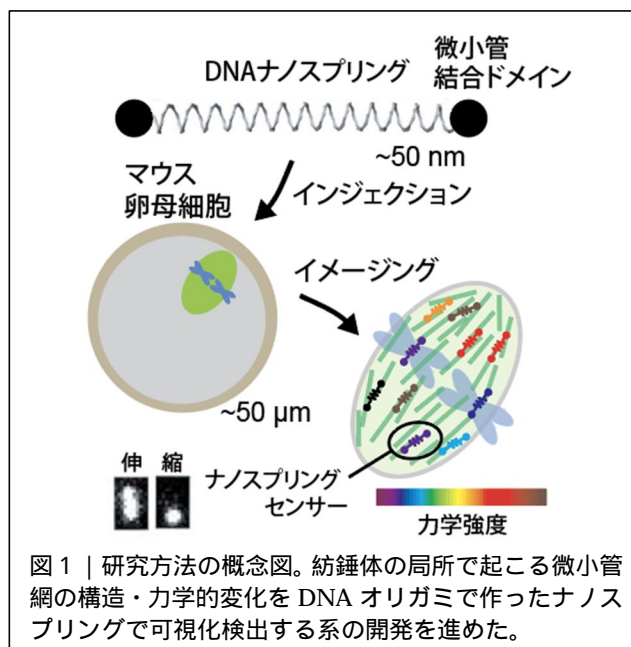
### 2. 研究の目的

哺乳類の卵母細胞内で紡錘体装置の微細な構造欠陥や力学的不均衡を定量解析することのできる新しい可視化技術を創出することを目的とした。

### 3. 研究の方法

紡錘体の構造的特徴を解析するため、生細胞での計測が必須であった。これは紡錘体を構成する微小管が重合・脱重合サイクルを数十秒で繰り返す高度な動的ポリマーであるため、化学固定や急速凍結では捉えることのできない動態の特徴抽出が必要であった。生細胞の解析には、蛍光観察を用いた手法が有効である。これには、細胞質環境でも検出感度の高い可視化プローブと、他の蛍光との非干渉性が考慮されるべきである。既存の方法に FRET (Flourescence Resonance Energy Transfer) を使った方法があった。しかし細胞内で一分子レベルの信号を得ることは困難であり、また FRET は 2 色を占有するため紡錘体の形態や染色体の動態との同時観察の障害となった。そこで単色かつ強いシグナル強度で紡錘体の局所の力場が解析できる手法の開発を行なった。

具体的には、DNA オリガミ技術を使って長さ 100 nm ほどのコイル状の機械パネ(以降ナノスプリングと呼ぶ)を作製し、この両端に微小管結合タンパク質のドメインを繋ぐことで紡錘体にターゲティングできる人工素子をデザインした(図 1)。このデザインにより、両端のドメインで隣接する 2 本の微小管が架橋され、微小管同士の相対的距離



や運動変化に応じてパネが伸縮するようにした。このナノスプリングは研究分担者の岩城光宏博士（理研）との共同研究で作製し、弾性定数と長さ、曲げ剛性の異なる数種類を準備した。ナノスプリングの微小管結合能は研究代表者が以前に確立したインビトロ再構成系を使って評価し、さらにアフリカツメガエル未受精卵から無希釈で調製される細胞質抽出液内で形成される減数分裂紡錘体を標的に局在と細胞内安定性を評価した。最終的に作製したナノスプリングのマウス卵母細胞への導入を目指して研究を推進した。

#### 4. 研究成果

##### (1) DNA オリガミ技術を使った微小管結合性ナノスプリングの作製

当初の計画通り、DNA オリガミで作製したナノスプリングの両端に微小管結合タンパク質を繋いだ人工素子の作製を実現した。微小管結合タンパク質には細胞分裂期の動態に影響を及ぼさないキネシン1を選択し、これのATP非加水分解型変異体を作製して微小管に長時間安定に結合できるようにした(図2A)。さらにこの不活型キネシン1のC末部分にSNAPタグを融合し、ベンジルグアニン添加でDNAオリガミの端に付与した相補オリゴを介して共有結合した(以降キネシンナノスプリングと呼ぶ)。次に精製チューブリンを重合して調製した微小管をフローセルのガラス底面に吸着させ、作製したキネシンナノスプリングがこの微小管に選択的かつ安定に結合することが確認された(図2C)。このナノスプリングの第一世代型は双頭のキネシン1を用いたが、以降の研究で微小管との親和性が予想以上に高いことが分かり、二量体化ドメインを削除したキネシン1を使って第二世代型の弱親和性タイプの素子も作製した(図2B)。

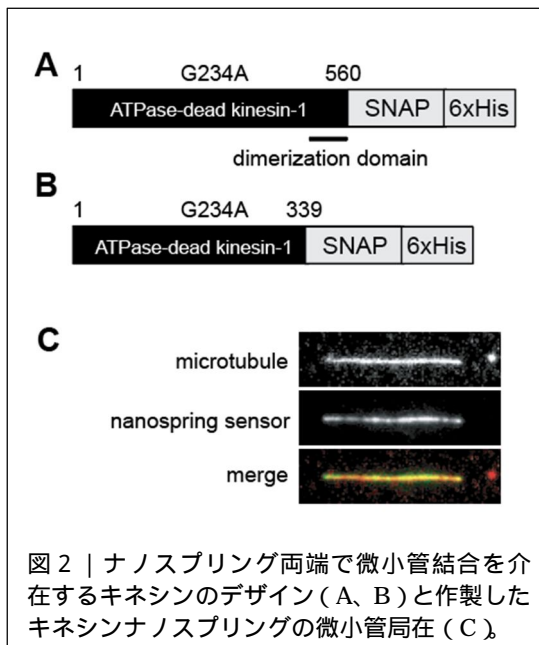


図2 | ナノスプリング両端で微小管結合を介在するキネシンのデザイン(A, B)と作製したキネシンナノスプリングの微小管局在(C)。

##### (2) ナノスプリングの紡錘体へのターゲッティング

作成したキネシンナノスプリングの減数分裂紡錘体への局在化を達成した。アフリカツメガエル未受精卵の細胞質抽出液に精子を添加することで紡錘体を形成し、その細胞質にキネシンナノスプリングを混合することで局在化を起こすことができた(図3)。紡錘体の周囲には構造を取り囲むように膜状の物質が存在し、キネシンナノスプリングの拡散的侵入を阻むことがわかった。そこでキネシンナノスプリングの混合濃度を背景光とのトレードオフを考慮しながら調節し、効率的な局在を実現した。また細胞質に存在するDNase等による分解を軽減するため、キネシンナノスプリングをあらかじめPEGポリマーで被覆する処理を施すこととした。同スプリングは25個のRhodamine蛍光色素で標識することで、細胞質の強い自家蛍光存在化においても十分位置を認識できるようになった。このキネシンナノスプリングがPoleward fluxと呼ばれる紡錘体微小管の極方向への運動と同速度で移動し、極への輸送運動を観察することができた。また、微小管の間の空間で拡散運動の様子も観察された。キネシンナノスプリングから発せられる蛍光信号は数十分以上安定であった。

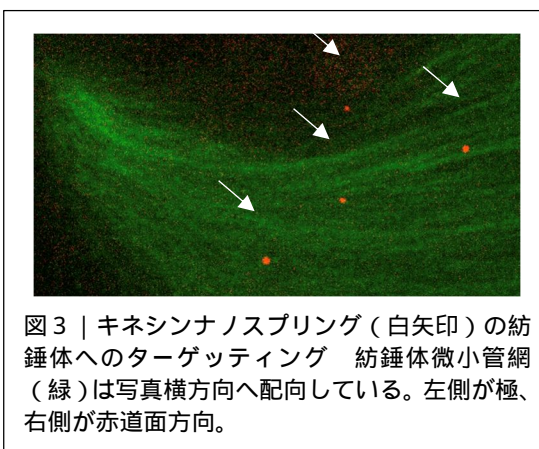


図3 | キネシンナノスプリング(白矢印)の紡錘体へのターゲッティング 紡錘体微小管網(緑)は写真横方向へ配向している。左側が極、右側が赤道面方向。

##### (3) ナノスプリング構造の最適化

設計したナノスプリングはバネの長さ方向へだけでなくそれと垂直な曲げ方向にも柔軟性があり、両端のキネシン部位が同一の微小管に結合する可能性が懸念された。そこで曲げ方向に対する柔軟性を排除したカラム型の素子もデザインした。この第三世代型素子もナノスプリングと同様に効率的に作成され、原子間力顕微鏡を使って構造形態の堅牢性を確認できた。

#### (4) マウス胚観察系の確立

作製したキネシンナノスプリングのマウス卵母細胞への導入を目指して、マウス試料の作製と生細胞顕微鏡観察系のセットアップを達成した。当初は凍結卵を用いた実験を計画していたが、融解後の細胞生存率が極めて低く、新鮮試料を用いた実験に移行した。これに必要な技術と設備は所属研究機関のファシリティで確立した。また生細胞観察系を研究代表者の研究室が有する共焦点蛍光顕微鏡へのインキュベータ等の増設で実現し、さらに培地、レーザー強度等の最適化を行うことで長時間、高時空間分解能の観察系を確立した。ナノスプリングの細胞内導入には mRNA 等の注入用の通常のインジェクタでは困難であったため、ピエゾ振動式の新規インジェクション装置の増設により今後これを実現する計画である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1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 Tanaka Masahito, Shimamoto Yuta	4. 巻 56
2. 論文標題 Local body weight measurement of the spindle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 871 ~ 872
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2021.03.019	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 Lucan Yan, Tatsuya Fukuyama, Megumi Yamaoka, Yusuke T. Maeda, Yuta Shimamoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Examining the assembly pathways and active microtubule mechanics underlying spindle selforganization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 arXiv	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) なし	査読の有無 無
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 Fukuyama T, Yan L, Tanaka M, Yamaoka M, Saito K, Ti SC, Liao CC, Hsia KC, Maeda YT, Shimamoto Y.	4. 巻 119
2. 論文標題 Morphological growth dynamics, mechanical stability, and active microtubule mechanics underlying spindle self-organization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	6. 最初と最後の頁 e2209053119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2209053119	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 7件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yuta Shimamoto
2. 発表標題 Morphological growth dynamics, active microtubule mechanics, and mechanical plasticity of the vertebrate meiotic spindle
3. 学会等名 ASCB/EMBO 2022 Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島本勇太
2. 発表標題 紡錘体の力学的可塑性と多極構造化
3. 学会等名 日本分子生物学会第45回年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuta Shimamoto
2. 発表標題 Morphological growth dynamics and active microtubule mechanics underlying spindle self-organization
3. 学会等名 日本生物物理学会第60回年会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuta Shimamoto
2. 発表標題 Building and dissecting the microtubule architecture of the vertebrate metaphase spindle
3. 学会等名 The 9th World Congress of Biomechanics（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島本勇太
2. 発表標題 オルガネラ・細胞内構造体のマイクロメカニクス
3. 学会等名 第7回Organelle Zoneセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島本勇太
2. 発表標題 機械計測と摂動操作でオルガネラ・細胞内構造体の力学特性を明らかにする
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 島本勇太
2. 発表標題 オルガネラ・細胞内構造のマイクロメカニクス
3. 学会等名 物理学・医生物学の融合研究セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島本勇太
2. 発表標題 Measuring and perturbing the micromechanics of intracellular structures
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021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
研究 分担者	岩城 光宏  (Iwaki Mitsuhiro)  (30432503)	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・客員研究員    (82401)	

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