

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32689

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22635

研究課題名（和文）染色体構造に基づく卵子劣化の分子基盤の解明

研究課題名（英文）The molecular basis of oocyte ageing in the view of spatial chromatin organisation

研究代表者

角井 康貢（Kakui, Yasutaka）

早稲田大学・高等研究所・講師（任期付）

研究者番号：40853164

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、高齢不妊・生殖医療への貢献を目指して、母体の加齢に伴う卵子劣化の背後に潜むメカニズムの解明を目指した。配偶子（卵子など）を生み出す減数分裂におけるクロマチン（遺伝情報を保持するゲノムDNA）の立体構造の時空間変化を、DNA配列情報に基づいて捉えた。さらに、マウス卵母細胞におけるクロマチン立体構造の加齢による劣化を、一細胞ごとに決定する実験手法を構築している。本研究成果により、減数分裂クロマチンの立体構造を制御する分子メカニズムの決定を通して、卵子劣化の分子実体に迫る研究の基盤が形成された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、減数分裂におけるクロマチン立体構造をDNA配列レベルの高解像度で、かつゲノムワイドに決定する。そのため、マクロな形態観察のレベルを超越したミクロレベルの高解像度なクロマチン構造を明らかにし、従来のクロマチン構造に対する我々の知見を深化させるという学術的意義を持つ。さらに、卵子の品質をクロマチン構造の観点から評価するための技術基盤の構築を通して不妊治療への貢献が期待される、社会的にも意義の大きい研究である。

研究成果の概要（英文）：Ageing is one of the most critical issues for infertilities of elder persons. We aim to dissect the molecular basis that regulates oocyte ageing in the view of spatial chromatin organisation. To determine how chromatin organisation develops during meiosis, the process to produce gametes such as oocytes, we have established the experimental procedure in which meiosis progresses highly synchronised manner using fission yeast cells. With the highly synchronised meiosis, we have determined spatial chromatin organisation by high throughput sequencing-based chromosome conformation capture (Hi-C). Furthermore, we are preparing an experimental protocol to determine spatial chromatin interactions in aged oocytes at single cell level. Our achievements will shed light on the chromatin organisation that controls oocyte ageing and contribute to the field of fertility treatments.

研究分野：染色体構造

キーワード：クロマチン 減数分裂

1. 研究開始当初の背景

高齢不妊は、昨今の多様な生活習慣により生じた新たな社会課題の 1 つであり、生物学的な知見に基づく根本原因の探究が待ち望まれている。多岐に渡る高齢不妊の理由の 1 つとして、高齢母体から採取された卵子では、染色体の構造異常が高頻度に見られることが知られている。しかしながら、高齢卵子における染色体の構造異常はマクロな形態観察レベルの知見であり、加齢に伴う卵子劣化の分子メカニズムを解き明かすためには、更なる高解像度の構造情報の取得と解析が不可欠である。

卵子・精子などの配偶子は、減数分裂により親の 2 倍体ゲノム DNA を半減させることで生み出される。減数分裂におけるゲノム DNA の半減には、相同組換え機構が重要な役割を果たす。相同組換えは、DNA 二重鎖切断と DNA 修復を利用して、両親由来のゲノム DNA (相同染色体) を交換する DNA 交換反応である。相同組換えによる DNA 交換の結果、相同染色体がそれぞれ物理的に繋がった“キアズマ”を持つ二価染色体が形成される。二価染色体は、減数分裂におけるゲノム DNA 半減の鍵を握る染色体構造であるため、相同組換えにエラーが起きると、配偶子はゲノム DNA を正しく受け継ぐことが出来ない。すなわち、相同組換えの異常は、不稔性配偶子の形成を介して、不妊や先天性異常症(ダウン症候群など)の原因となりうる。加えて、半世紀前に既に母体年齢が高くなるにつれて、卵子中の二価染色体に構造異常が高頻度で見られることが報告されている。これらの事実は、二価染色体の構造異常が母体の加齢による卵子劣化の分子実体である可能性を強く示唆している。そのため、二価染色体の内部構造をミクロなレベルで高解像度に可視化し、減数分裂における染色体構造制御の分子基盤を解明することが、卵子劣化に対するクロマチンレベルでの証拠を得るために必要不可欠である。

2. 研究の目的

上述の研究背景を踏まえて、本研究は「加齢に伴う卵子劣化の分子実体は何か」という学術的問いに答えを導くことを目的とする。本研究目的の達成に向けて、卵子劣化との関わりが強く示唆される二価染色体の構造制御に着目し、染色体構造をクロマチンレベルで捉えることを目指す。

3. 研究の方法

本研究は、2 種類のモデル生物(分裂酵母細胞とマウス卵母細胞)を利用して、減数分裂クロマチンの三次元構造の詳細を決定する。chromosome conformation capture (Hi-C、染色体立体配座捕捉法)を利用して高精細なクロマチン三次元構造を可視化するために、減数分裂の各ステージに同調した細胞集団を回収し、Hi-C 用のライブラリを調製する実験システムの確立を行なう。さらに、卵子劣化の際に見られる二価染色体の構造異常を 1 細胞レベルで捉えるために、1 細胞 Hi-C 解析の技術基盤を構築する。

(1) 分裂酵母の減数分裂における染色体構造の解析

本研究(1)では、減数分裂誘導の簡便な分裂酵母細胞を利用して、減数分裂の進行に伴うクロマチン三次元構造の時空間変化を捉えること、およびクロマチン構造制御因子の欠損が染色体構造へと与える影響を可視化することを目的とする。クロマチンレベルの高解像度な染色体の構造情報を取得するために、減数分裂進行を高度に同調する実験システムの確立が必須である。分裂酵母 *pat1* 遺伝子は減数分裂開始を負に制御するマスターキナーゼであり、キナーゼ活性を不活化することで、強制的に減数分裂を誘導できることが知られている。そこで本研究では、*pat1* キナーゼ阻害による強制的な減数分裂開始と多剤感受性を示す MDR-sup 変異体を組み合わせ、減数分裂の各ステージに高度に同調した細胞を回収する実験システムを確立する(*pat1* MDR-sup システム)。確立した *pat1* MDR-sup システムを利用して、減数分裂の各ステージの細胞を回収し、ライブラリ調製(Hi-C)を行なう。次世代シーケンサーにより、得られたライブラリの DNA 配列解析を行なうことで、減数分裂のステージごとのクロマチン相互作用の情報をゲノムワイドに取得する。クロマチン相互作用情報から、クロマチン三次元構造を再構築することで、減数分裂の進行に伴うクロマチン三次元構造の変化を可視化する。

さらに、*pat1* MDR-sup システムに対して、相同組換え、二価染色体形成に関わることが知られている因子の変異を導入する。同様の Hi-C 解析を変異株についても行ない、減数分裂クロマチンの三次元構造の時空間変化と種々の因子の関わり合いをクロマチンレベルで解き明かす。

(2) マウス卵母細胞における染色体構造の 1 細胞解析

本研究(2)では、マウス卵母細胞を利用して、加齢に伴うクロマチン構造の変化を 1 細胞レベルで明らかにする。若齢・高齢マウスに対してホルモンを注射することで過排卵処理を行ない、多数の卵母細胞を取得する。得られた卵母細胞を、試験管内において減数分裂の再開・成熟させることで、二価染色体を持つ卵母細胞を効率よく回収する。二価染色体を有する卵母細胞に対して Hi-C を適用することで、マウス卵母細胞中の二価染色体におけるクロマチン三次元構造の詳細を(1)の分裂酵母と同様に可視化する。そして、若齢・高齢マウス由来の卵母細胞におけるクロマチン三次元構造を比較することで、加齢により生じた染

色体構造の異常を捉える。

4. 研究成果

(1) 分裂酵母の減数分裂における染色体構造の解析

1. *pat1* MDR-sup システムによる減数分裂の同調系の確立

減数分裂開始のマスターキナーゼ *pat1* の不活性化と多剤感受性を示す MDR-sup 変異体を組み合わせた結果、高度に減数分裂を同調させることができた。*pat1* MDR-sup システムでは、減数分裂誘導開始後 60 分において DNA 複製が起き、120 分後に DNA 複製が完了する。そして 220 分後に 1 回目の染色体分配 (減数第一分裂) のピークを迎え、260 分後に 2 回目の染色体分配 (減数第二分裂) が起きることが明らかとなった。さらに、1 回目の染色体分配が開始される前に、分裂期後期への移行を促進する後期促進複合体 (APC/C) の阻害剤を培地に添加することで、二価染色体を持つ細胞が 80% 以上となる細胞回収条件を見出すことができた。このように、*pat1* MDR-sup システムの確立により、二価染色体を持つ分裂酵母細胞を効率良く回収できる実験系を確立した。

本 *pat1* MDR-sup システムを相同組換え、二価染色体形成に関わることが知られている因子の変異と組み合わせたところ、減数分裂ステージの高い同調性を維持したまま、染色体構造の異常を示す細胞集団を効率よく回収できることが明らかとなった。したがって、本研究により立ち上げた *pat1* MDR-sup システムは、分裂酵母の減数分裂クロマチンの時空間変化を詳細に捕捉するための新たなツールとして、高い汎用性を持つといえる。同調的な減数分裂進行による各ステージの細胞集団の回収は、染色体構造解析のみならず、遺伝子発現解析やタンパク質発現解析、細胞周期制御解析など多岐に渡って利用することができる。そのため、我々が構築した *pat1* MDR-sup システムは、分裂酵母の減数分裂研究分野の進展に今後大きく貢献することが見込まれる。

pat1 MDR-sup システム構築の過程で、多剤感受性 MDR-sup 変異により、減数分裂誘導の同調性が低くなることが判明した。多剤感受性 MDR-sup 変異は 7 つの遺伝子の欠失を組み合わせているため、7 つの遺伝子の中で減数分裂に関わる遺伝子の同定を試みた。組み合わせを変えて原因遺伝子を探索した結果、6 遺伝子を欠失した状態で、多剤感受性を維持したまま、減数分裂の同調性を回復できることを見出した。上記の *pat1* MDR-sup システムでは、MDR-sup 変異として 6 遺伝子欠失を用いている。このように本研究は、多剤感受性についても新たな知見をもたらした。

2. *pat1* MDR-sup システムを利用した Hi-C によるクロマチン三次元構造解析

(1) -1 で立ち上げた *pat1* MDR-sup システムを利用して、減数分裂の各ステージにおける細胞集団を回収し、Hi-C ライブラリの調製および次世代シーケンサーによる DNA 配列解析を行なった。多くの実験条件において、サンプル回収・ライブラリ調製は完了しており、次世代シーケンサーによる DNA 配列解析の完了を待っているところである。我々は、バイオインフォマティクスによる DNA 配列解析のパイプラインを既に確立しており、クロマチン相互作用の情報を有する DNA 配列が得られ次第、減数分裂の各ステージにおけるクロマチン三次元構造の時空間変化および制御因子による構造制御基盤の解析へと進む。

(2) マウス卵母細胞における染色体構造の 1 細胞解析

本研究(2)では、まず過排卵処理を行なったマウスから採取した卵母細胞を試験管内で成熟させ、二価染色体を持って卵母細胞を回収するための実験条件を検討した。その結果、成熟開始 7 時間後において、最も多くの卵母細胞が二価染色体を持つことを見出した。卵母細胞は 1 細胞ごとに扱うことが出来るが、各細胞のゲノム DNA 量が少ない。そのため、1 つの卵母細胞から DNA を抽出し、Hi-C によるクロマチン三次元構造解析のためのライブラリ調製手順を最適化することに時間がかかっている。適切な実験プロトコルを確立し、二価染色体を持つ卵母細胞に対して Hi-C 解析を行なうことで、卵子劣化に対するクロマチンレベルの証拠を明らかにしていく。

このように本研究は、高解像度なクロマチン相互作用の情報をゲノムワイドに取得し、クロマチン三次元構造を再構築するための基盤技術を確立した。分裂酵母を利用して、減数分裂の進行に伴うクロマチン三次元構造の時空間変化と、その制御メカニズムに対する知見を得るための実験システムを構築したことは、本研究の大きな成果の 1 つといえる。また、マウス卵母細胞を用いた Hi-C 解析についても実験条件の決定、およびプロトコルの確立が順調に進んでおり、本研究で構築したこれらの技術基盤をベースとして、減数分裂におけるクロマチン構造決定、および卵子劣化の分子メカニズムに迫る研究の今後の発展が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Sato Masamitsu, Kakui Yasutaka, Toya Mika	4. 巻 9
2. 論文標題 Tell the Difference Between Mitosis and Meiosis: Interplay Between Chromosomes, Cytoskeleton, and Cell Cycle Regulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	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） 10.3389/fcell.2021.660322	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0件

〔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
---------	---------