

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：12611
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23657143
 研究課題名（和文） 卵減数分裂に干渉しない精子星状体
 研究課題名（英文） Ability to form meiotic spindle is dependent on GV material

 研究代表者
 千葉 和義（CHIBA KAZUYOSHI）
 お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・教授
 研究者番号：70222130

研究成果の概要（和文）：

ヒトデ卵を卵核胞崩壊（GVBD）以前に受精させた GV 多精卵の多極紡錘体形成率（干渉率）は 100%であった。また GVBD 以後に多精させた BD 多精卵では、卵—精子星状体の距離が数 μm であっても干渉率が低く 5%程度であった。さらに BD 多精卵紡錘体極のサイクリン B 量は、干渉していない精子星状体より顕著に高いことが明らかになった。サイクリン B が多く蓄積する星状体が、GV 内容物の影響を受けて染色体と相互作用できるようになることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Before spawning, maternal asters existing near GV are affected by soluble components of GV other than chromosomes during GVBD, and acquire the ability to form functional spindles. Then, spawned oocytes are fertilized at MI. Although centrosomes of sperm form sperm asters, they wait to participate in cell cycle events until oocyte meiosis is completed: They cannot form functional spindles during meiotic division of oocytes, because GV components have been dispersed throughout the cytoplasm. When oocytes are isolated from the ovaries and artificially inseminated before GVBD or MI, polyspermy occurs and sperm asters at the animal pole are affected by GV components during GVBD and form abnormal multi-polar spindles interacting with maternal chromosomes during MI and MII. Thus, both spawning and fertilization at MI are important for maturing oocytes to be protected from formation of abnormal multi-polar spindles by paternal centrosomes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：受精、減数分裂

1. 研究開始当初の背景

多くの無脊椎動物は第一減数分裂中期で受精する。卵に入った精子中心体は、速やかに微小管形成中心として機能するが、卵減数分裂の紡錘体極としては働かない（干渉しない）。一方、卵由来の中心体は、紡錘体の極として減数分裂を司る。このことはとても大切であり、もしもこの不干渉機構がなければ、減数分裂は3極となり、有性生殖は失敗してしまう。すなわちこの現象は、有性生殖の要となるものであるが、これまで干渉しない機構について研究されて来なかった。

2. 研究の目的

ヒトデでは、卵核胞崩壊 (GVBD) 後に受精すると、正常発生する [=精子星状体は干渉しない]。しかし GVBD 前に受精させると、精子星状体は卵減数分裂に干渉する (Matuura and Chiba, Unequal cell division regulated by the contents of germinal vesicles. *Dev. Biol.* 273, 76-86, 2004)。すなわち、GVBD 前に受精した精子は、多極紡錘体を形成する結果、多くの極体様断片を作り減数分裂は失敗する。この不干渉機構は GVBD 間のわずか 2~3 分で成立する。GVBD 前後の卵をそれぞれ用いることで、干渉と不干渉を容易に作り出すことができる。実験動物としてのヒトデは、正に独創的な研究システムを提供してくれるのだ。

それでは、精子不干渉機構を説明できる仮説は、どのようなものがあるのだろうか？以下の3仮説が考えられる。

仮説1「精子の受精地点は、卵減数分裂装置から十分に離れているために干渉しない」

仮説2「卵中心体から伸びる微小管によって、すでに卵染色体の動原体は占有されているために、精子中心体からの微小管が結合できない。」

仮説3「精子中心体から伸びる微小管先端構造は、卵由来染色体と結合できない。」

本研究では上記の各仮説の真偽を判定して、精子由来の分裂中心が卵減数分裂に干渉しない仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

以上の仮説について、どれが正しいのか、またはそれ以外の考え方・仮説立案が適切であるのかについて、検討する。

仮説1が正しいか否かは、まず GVBD 前に受精させた多精卵 (GV 多精卵) と GVBD 10 分後に多精にさせた BD 多精卵を第二減数分

裂中期で固定し、DAPI と抗チューブリン抗体を用いた蛍光抗体法で染色する。これらのサンプルを共焦点顕微鏡でサンプルを Z 軸について 1 マイクロメートル毎に映像を取得し、3 次元 (3D) 構築する。次に、3D 画像上で、微小管形成中心 (MTOC) とその最も近傍の染色体までの距離を測定する。GV 多精卵と BD 多精卵でそれぞれの距離に統計的な優位差がなければ、仮説は真ではない。むしろ、距離に依らない、何らかの機構で、BD 多精卵において干渉が起こりにくいことを示している。

もしも仮説2が正しいならば、卵染色体と卵中心体 (星状体) が相互作用できないように、十分に引き離して受精させれば、精子星状体は卵染色体と相互作用するはずである。卵染色体と卵中心体の引き離しには、遠心力を用いる。GV の比重が細胞質により低いので、上向き方向に遠心力をかけると、GV を下側 (植物極側) に移動させることが出来る。このとき卵中心体は移動せず、上側 (動物極側) にとどまる。ホルモン処理後、精子を卵染色体の近傍に受精させたときに、仮説2が真ならば、精子中心体から伸びる微小管は卵染色体を捕まえるはずである。精子の進入点は、ほぼランダムに卵表面全体に分布するので、卵染色体の近傍に侵入する場合もあることが期待できる。または、精子濃度を高くすると、多精になるので、卵染色体近傍に精子中心体が位置する確率を高くすることが出来る。仮説2が正しいなら、卵染色体の動原体は、第一分裂から第二分裂中期に至るまで、ずっと卵中心体からの微小管に占有されているはずだ。しかし、ここで矛盾が生じる。すなわち第一分裂が終了したときに、卵内に残った中心体は2分裂し、再度2極を作ってから第二分裂に入るために、この時期には卵染色体の卵中心体による占有は解除されているはずである。

仮説2が誤りであると判明した場合、仮説3を検討する。そのために GVBD 前と後での受精によって、動物極の多極紡錘体やその近傍に存在する星状体の形状を詳細に観測し、その制御は、GV 内容物の影響を受けているかどうかを明らかにする。そのために、微小管と相互作用することが明らかになっているサイクリンの局在を明らかにする。具体的には、抗サイクリン抗体と抗チューブリン抗体との二重染色を行い、染色の度合いを定量して、動植物軸において染色性の違いがあるか否かを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 仮説1を検討するために、第一減数

分裂と第二減数分裂において、GV 多精卵と GVBD10 分後に多精にさせた BD 多精卵の干渉率を求め、さらに微小管形成中心 (MTOC) とその最も近傍の染色体までの距離を測定した。その結果、第一減数分裂では BD 多精卵では干渉しないことが明らかになった。一方、GV 多精卵では 100%干渉した。さらに第二減数分裂では、BD 多精卵のごくわずかな (5%) 卵において干渉した多極紡錘体が観察された。しかしその距離を計測したところ、GV 多精卵と BD 多精卵では両者とも、約 10 マイクロメートル前後であり、有意差は得られなかった。従って、仮説 1 は真であるとは言えない。

(2) 仮説 2 において、卵中心体から伸びる微小管によって、すでに卵染色体の動原体は占有されているために、精子中心体からの微小管が結合できないか否かを明らかにするために、まず第一減数分裂について、精子と卵のそれぞれの MTOC と卵染色体の相互作用を観測した。その結果、GVBD 後 30 分では、すでに卵 MTOC が卵染色体の動原体を占有し紡錘体を形成していたが、精子 MTOC は発達し始めたばかりであった。すなわち、卵 MTOC の発達速度が精子 MTOC より早いために、干渉はない。仮説 1 は真である。一方、第二減数分裂開始直後では、精子・卵それぞれの MTOC 形成は同時であるが、干渉率は 5%程度と非常に低かった。したがって仮説 2 は真であるとは言えない。さらに卵染色体と卵中心体 (星状体) が相互作用できないように、遠心で十分に引き離して受精させたところ、精子星状体と卵染色体の相互作用の確率は 10%程度に上昇した。しかしその上昇の程度はわずかであるために、第二分裂において仮説を真であると結論づけることは困難であった。

(3) 精子中心体から伸びる微小管先端構造は、第二減数分裂では前述 (1) (2) のように卵由来染色体と結合し干渉するために、仮説 3 は真であるとは言えない。そこで抗サイクリン抗体と抗チューブリン抗体との二重染色でのそれぞれの蛍光量を定量した。そしてサイクリン抗体による蛍光量/抗チューブリン抗体染色による蛍光量を求めたところ、動物極 > 植物極であることが明らかになった。この星状体のサイクリン B 量は、GV 内容物を植物極に細胞質移植すると、その部分に発達した星状体において顕著に増加した。さらに BD 多精卵紡錘体極のサイクリン B 量は、近傍の干渉していない精子星状体より顕著に高かった。従ってサイクリン B が GV 内容物の影響で、GVBD 過程において GV 近傍に位置した星状体により多く蓄積し、星状体微小管が染色体と相互作用できるように

なることが強く示唆された。

(4) 以上の結果をまとめると、第一減数分裂においては、卵 MTOC の発達速度が精子 MTOC より早いために、干渉はない。したがって仮説 2 が採用され、「第一減数分裂において BD 多精卵では、卵中心体から伸びる微小管によって、すでに卵染色体の動原体は占有されているために、精子中心体からの微小管が結合できない。」であることが明らかになった。

しかし問題はむしろ第二減数分裂にあり、GV 多精卵での MTOC と染色体間の距離とほぼ等しい距離であるにもかかわらず BD 多精卵では 5%程度しか干渉しなかった。さらに第二減数分裂においてもその染色の差が認められていたもので、単に、GVBD 前に GV 内に局在したサイクリン B が GV 近傍の星状体に沈着したわけではない。むしろ GV 内部に、サイクリン B-CDK1 と微小管を介して結合する因子が存在しており、その因子がサイクリン B の動物極 > 植物極の局在を実現していると考えられる。すなわち、正常受精 (BD 受精) では GV 内容物が希釈されるために、精子星状体サイクリン量が少なくなり、干渉できなくなる。

またその因子は、サイクリンの星状体/紡錘体結合を制御しているだけでなく、MTOC の形状も制御している可能性がある。すなわち、GV が GVBD まで存在していたところを動物極と定義するならば、遠心で移動した新動物極も含め、植物極星状体と明らかに構造が異なっていた。すなわち、植物極星状体は中心部に染色されない部分があったが、動物極星状体にはなかった。サイクリン B-CDK1 複合体は MPF の本体であり、中期を実現する細胞周期エンジンだ。植物極星状体中心部に染色されない部分があることが、MPF 活性の局所的な強弱につながっている可能性が考えられる

この未知の因子の精製は、今後の問題であるが、一つの候補として Ran が考えられる。ただし、染色体がない星状体においても、動物植物軸において差が観察されたことから、Ran 以外の未知の因子が関与している可能性も考えられる。なぜなら Ran は染色体と相互作用することで、分布に局在があり、その局在が紡錘体形成に必要であると考えられているからだ。今後は、抗 Ran 抗体を作成して、紡錘体/星状体における染色性を求め、Ran 局在が関係するか否かを明らかにしていく必要がある。さらに局所的な CDK1 活性を可視化する必要がある。そのためには、CDK1 活性を計測できる FRET センサーを用いる可能性が考えられる。そのような FRET センサーはすでに開発はされているが、まだ局在が可視化できる技術には達していない。今後は

技術開発を進める必要がある。

(5) 第一減数分裂中期に受精する生物は、ヒトだけでなく、昆虫や原索動物、軟体動物など、非常に多くの種類がある。それらの生物全てにおいて、本研究で明らかにできたように、特に第二減数分裂中期において精子星状体が卵染色体と相互作用しないような仕組みが進化してきたものと考えられる(発表雑誌論文1)。この精子中心体の卵減数分裂への不干涉機構は、卵由来の中心体だけが、紡錘体の極として減数分裂を司ることを保証している非常に重要な生物現象である。すなわちこの不干涉機構がなければ、減数分裂は3極となり、有性生殖は失敗してしまう。このように有性生殖の要となる現象がこれまで研究されて来なかったのは、不思議ではあるが、本研究を契機として、今後この分野に多くの研究者が参入してくることを希望する。

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 4 件)

(1) Moriwaki K, Nakagawa T, Nakaya F, Hirohashi N, Chiba K.

Arrest at metaphase of meiosis I in starfish oocytes in the ovary is maintained by high CO₂ and low O₂ concentrations in extracellular fluid
Zool. Sci. 査読有、印刷中

(2) Hirohashi N, Alvarez L, Shiba K, Fujiwara E, Iwata Y, Mohri T, Inaba K, Chiba K., Ochi H, Supuran CT, Kotzur N, Kakiuchi Y, Kaupp UB, Baba SA.

Sperm from Sneaker Male Squids Exhibit Chemotactic Swarming to CO₂.
Curr Biol. 査読有、23巻、2013、775-778
DOI: 10.1016/j.cub.2013.03.040.

(3) Otsuki, J., Nagai, Y., Lopata, A., Chiba, K., Yasmin, L., and Sankai, T. Symmetrical division of mouse oocytes during meiotic maturation can lead to the development of twin embryos that amalgamate to form a chimeric hermaphrodite.

Hum. Reprod. 査読有、27巻、2012、80-387.
DOI: 10.1093/humrep/der408.

(4) Chiba, K.
Evolution of the acquisition of

fertilization competence and polyspermy blocks during meiotic maturation.

Mol. Reprod. Dev. 査読有、78巻、2011、808-813.

DOI: 10.1002/mrd.21378

[学会発表] (計 3 件)

① 千葉和義、
Meiotic arrest and fertilization of starfish oocytes、

“Oocyte maturation and fertilization meeting: Lessons from canonical and emerging models” in Banyuls-sur-Mer, France, 2013年6月13日

② 長谷川翠、千葉和義、
卵減数分裂に干渉しない精子星状体、
日本動物学会第83大会、大阪大学、2012年09月13日

③ 千葉和義、
ヒトデMI停止機構、
日本動物学会第83大会、大阪大学、2012年09月12日

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 反応方法および反応装置

発明者: 千葉和義

権利者: 千葉和義

種類: 特許、特願

番号: 2012-16684

出願年月日: 2012年07月27日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 和義 (CHIBA KAZUYOSHI)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・教授

研究者番号: 70222130

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし