

38. 配偶子形成における紡錘体の位置と卵子劣化の関連性

佐藤 政充

早稲田大学 先進理工学部 生命医科学科 細胞骨格ロジスティクス研究部門

Key words : 減数分裂, 配偶子形成, 紡錘体, 微小管, 染色体

緒言

精子・卵子など配偶子を作るための分裂は減数分裂と呼ばれる。減数分裂における染色体分配の異常は、不妊・流産・ダウン症候群などの原因となるため社会的関心度が高い。しかし、それらが起きるメカニズムは十分には解明されていない。本研究はモデル生物として分裂酵母とマウスを用いて、配偶子の形成における染色体分配の謎に迫る。これまでの我々の研究から、分裂酵母においては細胞骨格のひとつである微小管が特殊な機能を発揮することが分かった。すなわち、減数分裂においては、通常の細胞分裂である体細胞分裂では見られない放射状の微小管構造が形成され、それによって減数分裂に特徴的な染色体の配置が修正されることで安全な染色体分配を遂行することが分かった。さらにこの現象にどのような微小管結合タンパク質が作用するのかを追究しており、その成果について報告する。また、これらの分裂酵母から得られた知見をもとに、哺乳類の卵母細胞においては微小管がどのような挙動を示し、どのような機能を発揮するかを追究している。そこで我々は微小管がつくる紡錘体の細胞内での位置に注目し、紡錘体の位置の異常が卵母細胞の品質低下に関連するかを追究している。これまでに得られた成果を報告する。

方法、結果および考察

本研究では、減数分裂を研究するためのモデル生物として、遺伝学と分子生物学的手法を用いた実験に秀でた分裂酵母と、ヒトと同じ哺乳類であるマウスの卵母細胞を利用することで、減数分裂における染色体分配異常が生じるメカニズムの一端を解明したいと考えた。

1. 分裂酵母の減数分裂における微小管の新機能の発見

我々は、減数分裂において染色体分配の異常が生じやすいのは、通常の体細胞分裂には存在しない過程にその原因があると考えた。そのような減数分裂に特異的な染色体の挙動として減数分裂組換えが挙げられる。減数分裂組換えは、父由来と母由来の相同染色体が対をなし交叉を形成したうえで組換えを起こす現象で、減数分裂の遂行に必須のものである。分裂酵母において減数分裂組換えをおこなうためには、染色体は核内で体細胞分裂の場合とは全く異なる位置に存在する必要がある。

すなわち、減数分裂組換えの結果、染色体の動原体は中心体（酵母ではSPB [Spindle Pole Body] または紡錘極体と呼ばれる）から遠く離れた位置に存在する [1,2\)](#) (図 1A、B)。これは、次のステップで中心体から形成される紡錘体が動原体を結合して染色体分配する際に大きなリスクとなる可能性がある。すなわち、紡錘体は遠くに位置する染色体を結合できずに分配異常をもたらす可能性が高いと予想される。しかし、このようなリスクがあるにも関わらず、細胞は多くの場合染色体を正しく分配している。

すなわち、組換えによって生じる分配異常のリスクを軽減する未知のメカニズムが細胞に備わっていると我々は考え、分裂酵母細胞における染色体の動原体部位、中心体 (SPB) および微小管をそれぞれ異なる色の蛍光タンパク質で標識し、減数分裂開始時の細胞をライブセル・イメージングで観察した。その結果、中心体から特殊な放射状の微小管が形成され、中心体から遠くに離れて散らばっている動原体を捉えて中心体近くにまで回収することが分かった [3,4\)](#)。すなわち、放射状の微小管は染色体の核内での配置を大きく転換させることで、直後の染色体分配を安全に行う。

それでは、このように減数分裂組換えの後にのみ形成される放射状の微小管は、どのような分子メカニズムで形成されるのだろうか。我々はこれまでの研究から、微小管結合タンパク質 Alp7 (ヒト TACC3 ホモログ) [5\)](#) が重要な働きを担うことを見いだした。微小管結合タンパク質 Alp7 のノックアウト変異体では中心体からの放射状微小管形成が著しく阻害された (図 1C)。Alp7 が核に蓄積することで微小管形成が誘導されるが、Alp7 の核蓄積自体は通常の体細胞分裂でも見られることから、Alp7 以外にも放射状微小管形成のために必須の因子が存在している可能性があり、今後も追究を続けていく。

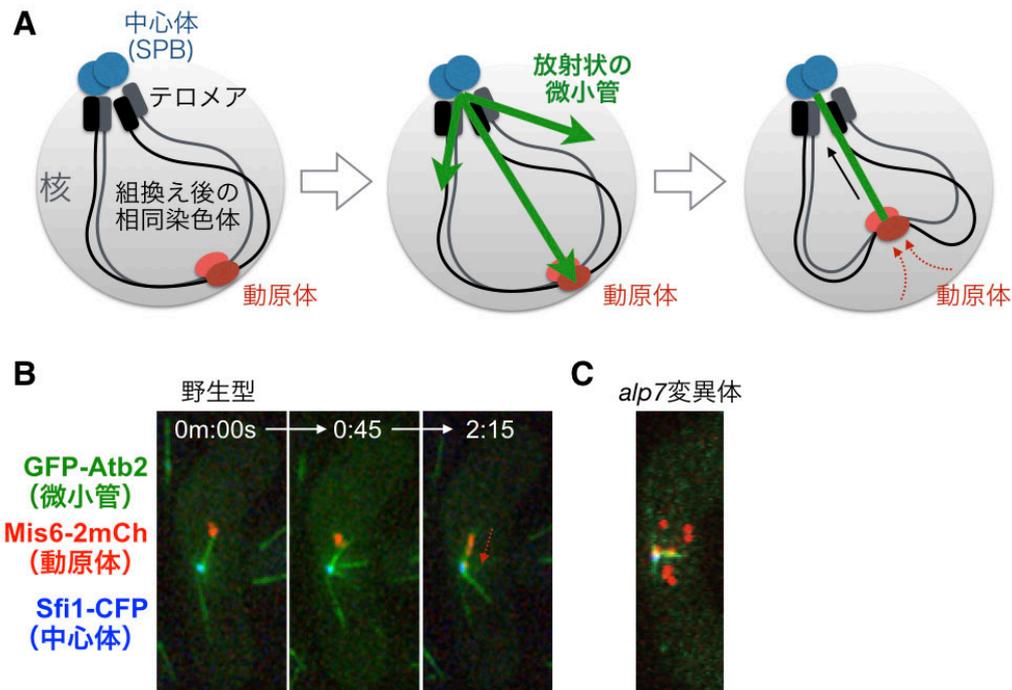


図 1. 分裂酵母の減数分裂にみられる放射状の微小管

(A) 減数第一分裂開始時には放射状の微小管が形成され、核内に散らばった動原体を中心体 (SPB) 近くまで回収する過程を示した模式図。(B, C) 実際のライブセル・イメージング。GFP-Atb2 (微小管)、Mis6-2mCh (動原体タンパク質) Sfi1-CFP (SPB タンパク質) により 3 構造を異なる色の蛍光タンパク質で標識した。時刻は撮影の時刻を示す。(B) 野生型細胞では微小管によって動原体が赤い矢印の方向に回収される。(C) *alp7* 遺伝子ノックアウト変異体においては微小管形成に欠陥が見られ、その結果動原体の回収が不完全になる。

2. マウス卵母細胞における紡錘体の挙動をモニターする

酵母における遺伝学および細胞生物学的な実験の結果、減数分裂においては微小管が通常のものに加えて特殊な構造を作り出し、特別な機能を発揮することが明らかになった。では哺乳類においては微小管に特殊な挙動や機能はあるのだろうか。近年の研究から、マウス卵母細胞の減数第一分裂における微小管と動原体の動態が明らかにされてきた [6,7\)](#)。我々は、その後のステージすなわち第一分裂を終えて極体を放出して減数第二分裂の中期で停止している卵母細胞に注目し、その紡錘体の位置に注目した (図 2)。

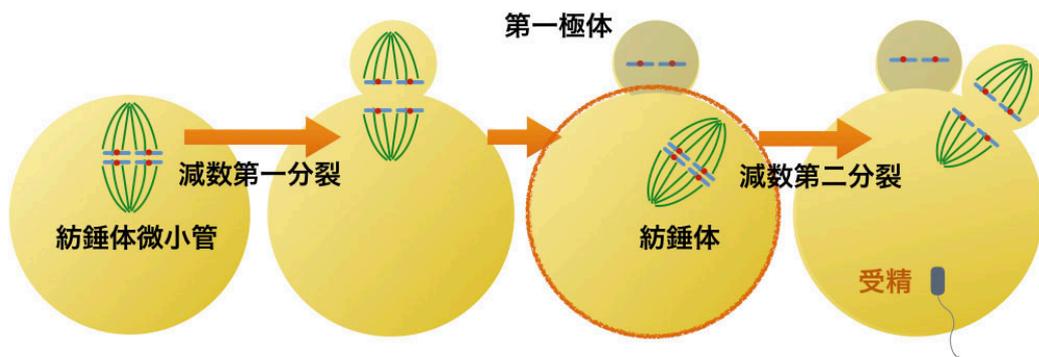


図 2. 哺乳類卵母細胞における減数分裂の進行と紡錘体の位置

哺乳類の卵母細胞において、減数分裂の進行に伴い、紡錘体の位置と第一極体の位置関係を示した模式図。本研究では第一極体の位置と第二分裂中期で停止している紡錘体の位置がなす角度について測定した。

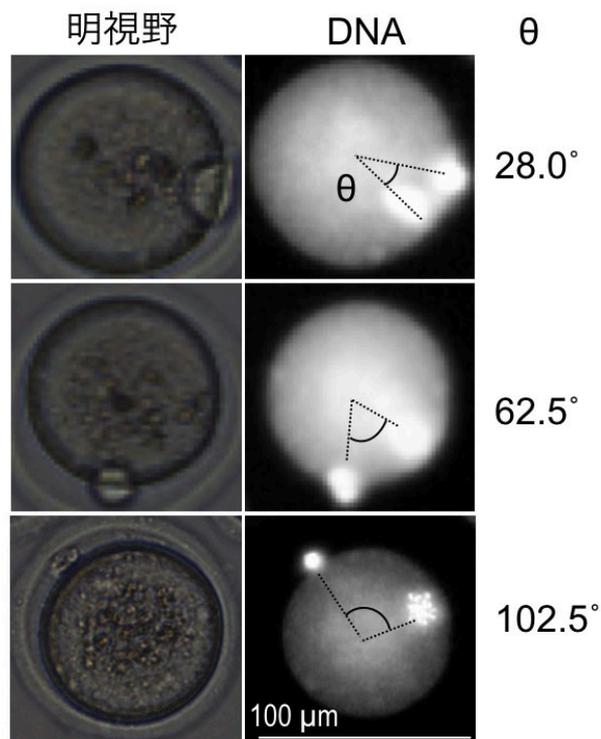


図 3. 第一極体の位置と第二分裂中期で停止している紡錘体がなす角度

マウス卵母細胞を固定後ヘキストにより染色体を可視化し、その染色位置から第一極体と第二分裂中期で停止している紡錘体がなす角度 (θ) を測定した。代表的な 3 細胞について明視野像とヘキスト像を示す。

5週齢のC57BL/6J近交系マウスより採卵した卵母細胞のうち、第一極体を放出して減数第二分裂中期に停止している卵母細胞について、第一極体の位置と第二分裂の紡錘体の位置関係をみたところ、両者が作り出す角度は大部分の細胞で 20° ~ 50° の範囲にあることが分かった ($n = 16$ 細胞、平均 45°) (図3)。しかしながら、予備的なデータではあるが58週齢マウスから単離した卵母細胞では角度が 40° ~ 140° の範囲で大きくばらつき、平均 90° となった ($n = 13$ 細胞)。このように、母体マウスの週齢と卵母細胞の極体-紡錘体間の角度の大きさには一定の相関が見られる結果となった。今後は、実験データの母数を増やすことでこの相関に個体差が見られるかを確認する必要がある、現在観察を継続中である。さらに、この角度のずれが受精から着床および胚盤胞期までの発生に至る過程に影響を及ぼすのかを調査することで、角度とこれらの因果関係を検証する必要がある。

これまでに、紡錘体が卵母細胞の中央部から細胞表層に移動しない場合に異常な染色体数をもつ受精卵が形成されることは示されてきた (8,9)。しかしながら、紡錘体が細胞表層に移動してはいるものの角度が大きく生じている場合にどれほどの異常をもたらすのかについては議論が定まっていない (10)。本研究は動物の発生工学技術、生殖医療での現場の統計データ、理学的な現象解明のあらゆる観点から本現象の原因と意義を追究することで、この議論に答えを出すとともに、生殖医療の現場での不妊治療技術の進歩に向けた新しい基盤を築くことを目指している。

共同研究者

本研究は麻布大学獣医学部伊藤潤哉准教授、ならびにみなとみらい夢クリニック家田祥子培養士と早稲田大学大学院先進理工学研究科生命医科学専攻 青井将大、白杉豊 (以上 大学院生)、戸谷美夏研究員との共同研究として行った。

本研究へのご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Funabiki H, Hagan I, Uzawa S, Yanagida M. Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. *J Cell Biol.* 1993 Jun;121(5):961-76. PMID: 8388878.
- 2) Chikashige Y, Ding DQ, Funabiki H, Haraguchi T, Mashiko S, Yanagida M, Hiraoka Y. Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast. *Science.* 1994 Apr 8;264(5156):270-3. PMID: 8146661.
- 3) Kakui Y, Sato M, Okada N, Toda T, Yamamoto M. Microtubules and Alp7-Alp14 (TACC-TOG) reposition chromosomes before meiotic segregation. *Nat Cell Biol.* 2013 Jul;15(7):786-96. doi: 10.1038/ncb2782. PMID: 23770679.
- 4) Kakui Y, Sato M. Differentiating the roles of microtubule-associated proteins at meiotic kinetochores during chromosome segregation. *Chromosoma.* 2016 Jun;125(2):309-20. doi: 10.1007/s00412-015-0541-x.
- 5) Sato M, Toda T. Alp7/TACC is a crucial target in Ran-GTPase-dependent spindle formation in fission yeast. *Nature.* 2007 May 17;447(7142):334-7. PMID: 17476213.
- 6) Magidson V, O'Connell CB, Lončarek J, Paul R, Mogilner A, Khodjakov A. The spatial arrangement of chromosomes during prometaphase facilitates spindle assembly. *Cell.* 2011 Aug 19;146(4):555-67. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.012. PMID: 21854981.
- 7) Kitajima TS, Ohsugi M, Ellenberg J. Complete kinetochore tracking reveals error-prone homologous chromosome biorientation in mammalian oocytes. *Cell.* 2011 Aug 19;146(4):568-81. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.031. PMID: 21854982.
- 8) Leader B, Lim H, Carabatsos MJ, Harrington A, Ecsedy J, Pellman D, Maas R, Leder P. Formin-2, polyploidy, hypofertility and positioning of the meiotic spindle in mouse oocytes. *Nat Cell Biol.* 2002 Dec; 4(12):921-8. PMID: 12447394.
- 9) Yi K, Unruh JR, Deng M, Slaughter BD, Rubinstein B, Li R. Dynamic maintenance of asymmetric meiotic spindle position through Arp2/3-complex-driven cytoplasmic streaming in mouse oocytes. *Nat Cell Biol.* 2011 Aug 23;13(10):1252-8. doi: 10.1038/ncb2320. PMID: 21874009.
- 10) Rama Raju GA, Prakash GJ, Krishna KM, Madan K. Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging. *Reprod Biomed Online.* 2007 Feb;14(2):166-74. PMID: 17298718.