

論文の内容の要旨

論文題目 マウス前核拡大機構の解析

渡邊大士

真核生物の細胞は間期には核膜によって DNA を細胞質と隔てて核内に格納している。核内では構成的に、あるいは環境の変化に応じて遺伝子発現が制御されており、核は重要な細胞小器官として細胞の生命活動を支えている。これまでに、様々な生物種や細胞種を用いて核サイズに着目した解析がなされている。がん細胞や老化細胞では通常の体細胞よりも核が大きくなることや、転移性の高いがん細胞ほど核が大きくなることなども知られており、核サイズは細胞の特性を示す指標の 1 つとして用いられている。また、核サイズと細胞サイズには相関が見られることは 100 年以上前にすでに報告があり、その後、動物細胞、植物細胞を問わず多種多様な生物種の多様な細胞種で検討されてきた。その結果、核/細胞質 (N/C) 比率は細胞の種類ごとにほぼ一定となることが分かってきた。同時にどのようなメカニズムで N/C 比率が決まるのか、ということが次の疑問となり解析が行われた。分裂酵母では DNA 量が同じであるが細胞サイズが異なる、あるいは 2 倍体から 32 倍体までの変異体においても、N/C 比率が常に一定となることが示されている。そのため、DNA 量は N/C 比率にほとんど影響しないと考えられている。さらに、1 つの細胞内に複数の核が不均一に存在する分裂酵母や、*Xenopus* 卵や卵抽出液中での核の形成を解析した研究から、核が疎に存在する場所では密に存在する場所にある核に比べて、核がより大きく拡大することが報告されている。これらの知見から細胞種や生物種ごとに N/C 比率がほぼ一定となる理由は、「核を拡大させる因子」の分子数が細胞質体積に応じて決められるためだと考えられており、Limiting pool モデルと呼ばれ、核拡大機構の有力な考え方となっている。

哺乳動物の発生は、減数第 2 分裂中期で停止した卵子に精子が受精することにより開始される。受精後、精子クロマチンにはプロタミンからヒストンへの置換、雄性前核の形成、ヒストン修飾の獲得など、大規模な変化が生じる。また、受精卵内では同時に卵子クロマチンから雌性前核が形成され、1 つの細胞に 2 つの前核が存在することになる。マウス前核の特徴として、1 つの前核にはハプロゲノムのみ含まれるにもかかわらず、体細胞の核と比べて大きいこと、雄性前核は雌性前核よりも大きくなることが挙げられる。また、マウス受精卵において核サイズが遺伝子発現に影響しているかは不明であるが、近年、*Xenopus laevis* の初期発生過程において N/C 比率が遺伝子発現に影響を与えることが報告されている。

このような背景のもと、本研究では、発生工学的手法およびタイムラプスイメージングを用いて、はじめに、マウス前核の拡大が **Limiting pool** モデルで説明可能であるのかを検証した。次に、前核形成時のクロマチンの性質に着目して、前核の初期拡大速度の制御機構について解析した。さらに、前核サイズの変化に伴う核内 DNA 密度の変化が核内構造、核の形態および発生能力に与える影響について解析した。

前核サイズの解析には固定による細胞や核のサイズ変化を除外し、個々の前核サイズを経時的に測定するためにタイムラプスイメージングを用いた。染色体や核を可視化するために **Histone H2B-mRFP1 mRNA** を、核膜形成のタイミングを知るために **EGFP-BAF mRNA** をインジェクションし、あらかじめ発現させた。はじめに、顕微受精により作出した受精卵を観察したところ、雌雄の前核はほぼ同時に形成され約 10 時間かけて拡大し、雌性前核直径が約 18 μm 、雄性前核直径が約 22 μm となったところで拡大が止まった。前核の拡大が **Limiting pool** モデルで説明可能であるのかを検討する前に、雌雄のクロマチンはエピジェネティック修飾や凝縮度が異なるため、それらの違いによって雌雄前核は異なる拡大上限を持つという可能性について検討した。1 つの雌性前核のみ有する 1 倍体雌核発生胚と 1 つの雄性前核のみ有する 1 倍体雄核発生胚を作出し、拡大を終えた前核の直径を測定した結果、いずれの胚においても、前核は直径約 25 μm まで拡大し、雌雄前核はどちらも同じ大きさまで拡大可能であることが示された。

核の拡大における **Limiting pool** モデルでは、「核を拡大させる因子」として「核膜を拡大させる因子」または「核体積を増加させる因子」のどちらかが **Limiting factor** となることが想定されており、閉鎖型の分裂様式である分裂酵母においては「核体積を増加させる因子」が、**Xenopus** 初期胚を用いた研究からは「核膜を拡大させる因子」が **Limiting factor** であることが示唆されている。細胞体積が同一で核の数が異なる細胞間において、「核膜を拡大させる因子」が **Limiting factor** であれば核総表面積が一致し、一方、「核体積を増加させる因子」が **Limiting factor** であれば、核総体積が一致することが予想される。そこで、雌雄の前核を有する通常の 2 前核受精卵、顕微受精の際に精子頭部を雌染色体近傍へインジェクションすることで前核形成時に雌雄クロマチンが 1 つの前核に包まれた受精卵 (1 前核受精卵) および、第 2 極体の放出を抑制して作出した 3 前核受精卵の間で、前核の総表面積と総体積を比較した。その結果、前核の拡大を終えた時、これらの受精卵では、前核総表面積は前核の数に応じて変化した一方で、前核総体積はほぼ一致したことから、「核体積を増加させる因子」の核への集積を終えた時に前核の拡大が止まる、つまり、マウス受精卵の前核拡大の **Limiting factor** は「核体積を増加させる因子」であることが示唆された。

また、**Limiting factor** である「核体積を増加させる因子」が核内に集積することを、前核の拡大をほとんど終えた受精卵から雄性前核を除去または、細胞質を除去する実験により検証した。雄性前核を除去すると、2 細胞期の核体積は約半分程度にまで減少することを確認した。こ

れは、雄性前核の除去と共に、雄性前核に集積した「核体積を増加させる因子」が受精卵内から取り除かれたことが原因であると考えられる。細胞質を除去すると、2細胞期の N/C 体積比率が上昇することを確認した。これら2つの実験から **Limiting factor** である「核体積を増加させる因子」が前核内に集積することが示唆された。

タイムラプスイメージングにより、雌雄の前核は初期前核拡大速度が異なることと同時に、前核形成時の雄性染色体塊は雌性染色体塊よりも有意に大きいことも示された。これまでに、培養細胞を用いた研究から、分裂後期/終期の染色体は微小管依存的にコンパクトに一塊化されることが報告されている。そこで微小管重合阻害剤であるノコダゾールを培地中に添加し、雌核発生胚の分裂後期染色体コンパクト性を弱めた。その結果、染色体塊が大きくなったものは前核拡大速度が速くなった。また、雌染色体塊が雄染色体塊と同等にまで大きくなった胚も現れたが、雄核発生胚の前核拡大速度には達しなかったことから、染色体塊の大きさ以外にも前核拡大速度に影響を与える雌雄クロマチンの性質の違いがあることが示唆された。雌雄クロマチンの性質の違いとして、前核形成時、雄クロマチンは雌クロマチンのような高度に凝縮した分裂期染色体の状態にはないことも挙げられる。このような雌雄クロマチンの凝縮度の違いが、前核拡大速度の違いを生み出す可能性について次に検討した。熱処理により発生能は保持されるが卵活性化能力を失ったマウス精子を除核卵子にインジェクションすると、5時間以内に精子クロマチンが分裂期染色体へと凝縮した。人為的な卵子活性化処理により発生を開始させて、前核拡大速度を解析した結果、凝縮した精子クロマチンからの雄性前核は、雌性前核と同様の低い拡大速度を示した。このことから、前核形成前の染色体の凝縮状態も前核拡大速度に影響を与えることが示唆された。

本研究の結果から、マウス前核拡大機構について次のモデルを提唱する。卵子クロマチンは分裂期染色体であり高度に凝縮しており、前核が形成される減数第2分裂後期には微小管依存的にコンパクトにまとまる。このようなクロマチンから形成された前核の初期拡大速度は低下する。一方、精子クロマチンは分裂期染色体ではないため染色体の凝縮度は低く、また、前核形成時の染色体塊は大きい。このようなクロマチンから形成される前核の初期拡大速度は速くなる。また、細胞質中に存在する「核体積を増加させる因子」の前核内への集積を終えたところで前核の拡大が止まるが、雄性前核は雌性前核よりも拡大速度が速いため、雄性前核は雌性前核よりも体積が大きくなる。

前核拡大過程の解析により、1倍体胚でも2倍体胚でも前核総体積が同等となることから、1倍体胚では核内 DNA 密度が正常の半分となることが示された。核内 DNA 密度が正常の半分である1倍体胚では1細胞期にて、核小体周辺のヘテロクロマチンの形成が遅延すること、セントロメア領域が広がるあるいは数カ所に集中することが、ヘキスト染色と CenpA 抗体を用いた免疫染色により観察された。また、2細胞期にて、核の歪みが大きいことが観察された。さらに、

2倍体であっても核内 DNA 密度が正常の半分である胚（2倍体・細胞体積2倍の胚）も1倍体胚と同様に胚盤胞期胚への発生率が著しく低かったことから、核内 DNA 密度が核内クロマチン構造や発生能に影響する可能性が示唆された。これらの結果から、マウス初期発生過程において、適切な核内 DNA 密度の重要性が示唆された。