公開

研 究 終 了 報 告 書

「顕微操作技術による初期胚の不安定なゲノムの分配システムの解明」

研究期間：2020 年 11 月～2024 年 3 月
研 究　者：京極　博久

1. 研究のねらい

細胞は分裂の際に娘細胞に染色体を正確に分配し、遺伝情報を含むゲノムを維持する。ところが哺乳類では、初期の胚発生過程において、ゲノムを維持するための染色体が不均等に分配される頻度が、ほかの分裂に比べ非常に高いことが知られている。特に最初の 3 回の卵割（分裂）時の染色体分配異常の発生頻度が高く、その結果、モザイク胚と呼ばれる正確なゲノムを持った細胞と不正確なゲノムを持った細胞が混ざった胚が形成される。しかし、モザイク胚の正確な形成頻度を示した報告はなく、このようなモザイク胚の形成は、不妊や先天性遺伝子疾患の主要な原因と考えられているが、なぜ初期胚においてモザイク胚形成を引き起こす染色体の不均等分配の頻度が高いのかは長い間分かっていない。また、初期胚は高いモザイク胚形成率を示すが、それらの胚を胚移植すると産仔率は 60～80%と高い値を示した。すなわち、初期胚には染色体に異常のある割球（細胞）を淘汰する何らかのメカニズムが存在すると考えられた。そこで、本研究では、顕微操作技術と最新の NGS 技術を用いて、①初期胚における染色体分配異常の頻度のカタログを作成し、②初期の胚発生過程において染色体分配異常頻度が高い原因の究明、および③不安定なゲノムを淘汰するメカニズムの解明を目的とした。

2. 研究成果

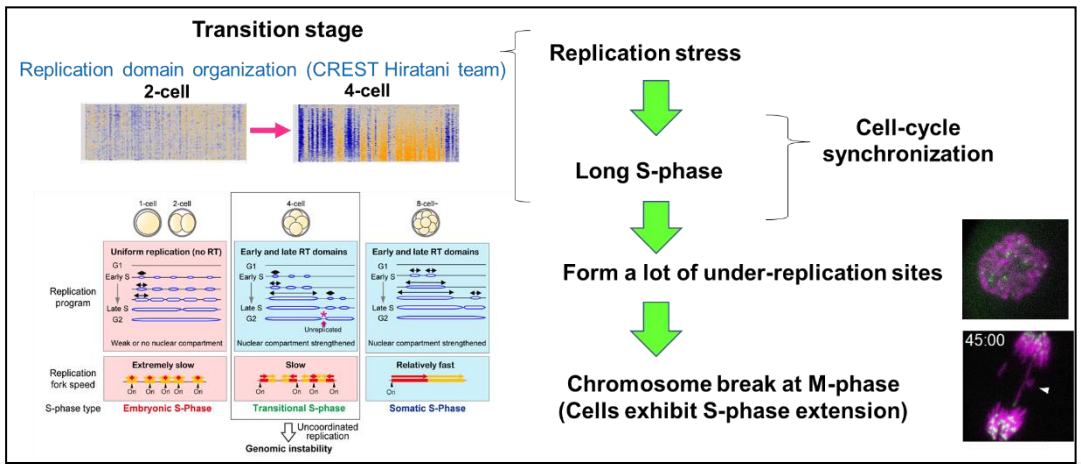
(1) 概要

最初に、顕微操作と scRepli-seq 技術を用いた方法とライブセルイメージングを用いた方法を使用して、マウス初期胚における染色体分配異常の頻度のカタログを作成した。その結果、驚くべきことに、8 細胞期胚において 4 細胞期胚と 16 細胞期胚と比較して 50%以上がモザイク状態であり、4 細胞から 8 細胞への分裂で考えると、染色体分配異常頻度は 14~16%と体細胞では考えられない高い値を示した。さらに、染色体分離異常のタイプを調べたところ、80%以上が構造異常であった。また、ライブセルイメージングにより、染色体が部分的にちぎれている様子が観察され、scRepli-seq データ解析により、構造異常が起こっている領域は、ゲノム複製が遅くに起こる領域（late S や latest S）で起こっていることが明らかとなった。これは、ゲノムの複製時に異常が起こり未複製領域から染色体が分裂期に壊れる現象が発生していることを示唆している。そこで、mitotic DNA repair synthesis に着目し、未複製領域の修復を行う複合体タンパク質のひとつである SLX4 をマーカーとした染色体の未複製領域を可視化できるシステムを構築した。その結果、SLX4 の数や消失までの時間は 4 細胞期胚で優位に多く、長くなっていた。すなわち、4 細胞期胚は、分裂期に入っても多くの染色体複製異常をもっていることが明らかとなった。

次に、DNA 複製の進行を PCNA-EGFP を用いたライブセルイメージングによってモニタリングした。すると、4 細胞期は異常に長い S 期を示しており、異常を起こした細胞の多くは、優位

にS期が長くなっていた。また、複製ストレスマーカーも4細胞期胚で優位に高かったことから、4 細胞期胚は複製により多くの時間が必要であり、 複製ストレスが原因である可能性が示唆された。この複製ストレスの原因は、4 細胞期は複製フォーク速度が遅いことによるものであることが CREST 平谷チームとの共同研究で明らかとなった。最後に、Nucleosides を用いて複製フォーク速度を上げることで、4 細胞期胚の染色体分配異常をレスキューした。

まとめると、本研究は、顕微操作と scRepli-seq、ライブセルイメージングを用いて、マウス初期胚の染色体分配異常頻度を正確に調べ、第3卵割において、異常頻度は非常に高く、そのほとんどは構造異常であること、異常の原因が 4 細胞特有の複製様式による複製ストレスであることを明らかにした。



(2)詳細

①初期胚における染色体分配異常の頻度のカタログを作成

(1) scRepli-seq による染色体分配異常頻度の解析

まず、シングルセル(割球)による DNA のコピー数解析(scRepli-seq)から染色体分配異常を検出するため、顕微操作によって胚の割球を単離し(図 1)、単離した割球を個々に回収することにより、1 つの胚から単離した全割球のセットを作成した。次に、単離した割球から gDNA を精製し、次世代シークエンス(NGS)に供した。NGS データの解析により、どの細胞のどのゲノムのどの領域が増減しているのかをコピー数の解析から明らかにすることができる。この scRepli-seq による解析を、培養の影響も考慮し、in vivo と in vitro 初期胚の異なる発生段階(2 細胞期～16 細胞期)で行った。

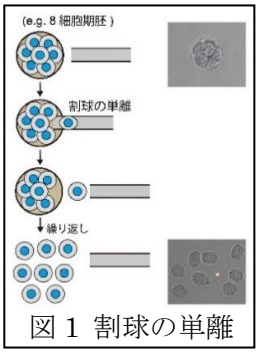


図 1 割球の単離

scRepli-seq によって得られたデータからは核型とコピー数多型(CNV)解析を行い、Karyogram を作成し異常のタイプ、染色体番号、領域を分類し

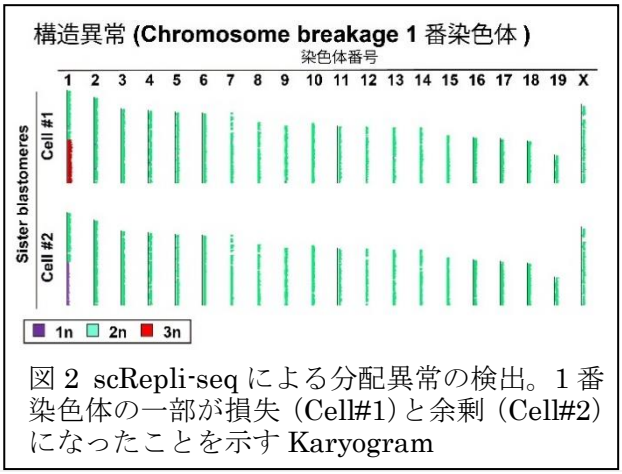


図 2 scRepli-seq による分配異常の検出。1 番染色体の一部が損失(Cell#1)と余剰(Cell#2)になったことを示す Karyogram

た。胚の全割球をセットで解析することにより、異常を起こした細胞のペアを見つけることができるため、ノイズのない完全な異常頻度を出すことができる（図 2）。その結果、in vitro 胚、in vivo 胚両方で、染色体分配異常頻度は、第三卵割（4 細胞期から 8 細胞期）で非常に高く、その結果、約 50％の 8 細胞期胚がモザイク胚を形成していることが明らかとなった。また、異常のほとんどは染色体の一部分がちぎれたような構造を持った構造異常であった。

(2)　ライブセルイメージングによる染色体分配異常頻度の解析

H2B-mCherry と Major-satellite mClover を用いた高解像度ライブイメージング技術を用いて、初期胚の染色体と動原体の動態を同時に観察し、染色体分配異常頻度の解析を行った（図 3）。その結果、染色体分配異常頻度は、scRepli-seq を用いた方法と同様に、第三卵割（4 細胞期から 8 細胞期）で非常に高いことが確認された。また、異常のタイプを詳細に解析したところ、ちぎれた染色体には動原体の蛍光が観察されず、異常は全て染色体の一部がちぎれてアンバランスな分配を行っていることが明らかとなった（図 4）。

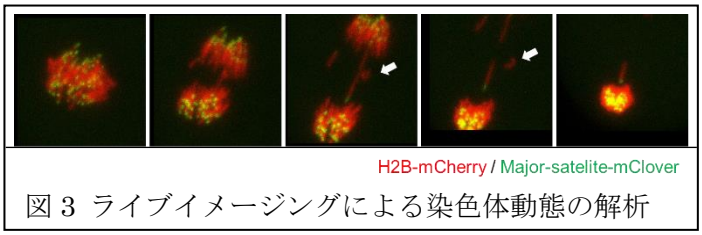


図 3　ライブイメージングによる染色体動態の解析

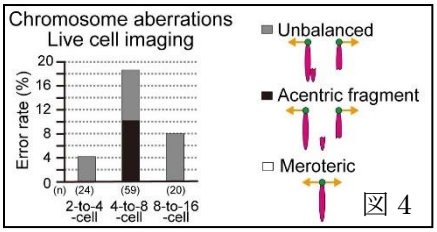


図 4

上記 2 種類の方法により、これまで曖昧にしか示されていなかった染色体分配異常の頻度のカタログが完成した。

②初期の胚発生過程において染色体分配異常頻度が高い原因の究明

先の実験結果から、染色体分配異常のほとんどは、分裂時に染色体がちぎれて起こる構造異常であることが明らかとなった。すなわち、ゲノムの複製時に起こった何らかの異常によって、姉妹染色分体が正常に分離できなくなった可能性がある。そこで、scRepli-seq のデータから、染色体が切断された領域を詳しく調べたところ、構造異常のほとんどは、ゲノム複製が遅くに起こる領域（late S や latest S）で起こっていることが明らかとなった（図 5）。そこで、mitotic DNA repair synthesis に着目し、未複製領域を可視化できるシステムを構築した。DNA 複製に問題をかかえ未複製領域を残したまま、M 期に進行すると、未複製領域に Mus81-EME1-SLX4 の複合体がリクルートされ DNA を修復するシステムが働く。これに失敗するとライブセルイメージングで観察したような染色体分配異常が起こることが示唆されている。そこで、修復を行う複合体タンパク質のひとつである SLX4 をマーカーとした染色体の未複製領域の可視化システムを構築した（図 6）。その結果、SLX4 が核膜崩壊直後の染色体へ局在しマーカーとして機能することが明らかとなった。さらに、SLX4 の数や消失までの時間は 4 細胞期胚で優位に多く、長くなっていた。すなわち、4

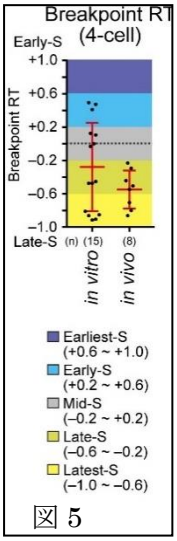


図 5

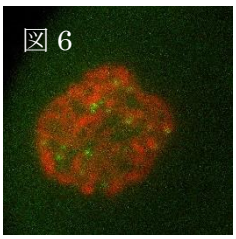


図 6

細胞期胚は、分裂期に入っても多くの未複製領域をもっていることが明らかとなった。

次に、DNA 複製の進行をPCNA-EGFPを用いたライブセルイメージングによってモニタリングした。すると、4 細胞期胚において異常を起こした細胞の S 期は、異常を起こしていない細胞と比べて優位に長くなっていた。また、複製ストレスマーカー（pChk1 と p-ɤH2AX）も 4 細胞期胚で優位に高かったことから、4 細胞期胚が異常を起こしやすい原因として、複製により多くの時間が必要であり、 複製ストレスが原因である可能性が示唆された。この複製ストレスの原因は、4 細胞期は複製フォーク速度が遅いことによるものであることが CREST 平谷チームとの共同研究で明らかとなった。最後に、培養液に Nucleosides を加えることで 4 細胞期胚の複製ストレスの原因である複製フォーク速度を上げ、染色体分配異常頻度が変化するかを調べた。その結果、4 細胞期胚の染色体分配異常はほとんどなくなった。

3. 今後の展開

本さきがけ研究において初期胚が第三卵割で高い染色体分配異常を示すこと、異常によるモザイク胚からの回復メカニズムを証明することができた。この高い染色体分配異常の原因として、4 細胞期では、体細胞で見られる複製タイミング制御が突如出現するが依然として複製はゆっくり進行したままであり、複製タイミング制御の急激な出現と複製速度が連動していない初期胚型から体細胞型への移行期のような複製様式を示していたため複製ストレスを受けていたことが原因であった。そこで、新たな疑問として、なぜ 1、2 細胞期胚は、染色体分配異常のリスクを負ってまで、初期胚型の特殊な複製様式をとるのだろうか？これに関しては、胚性遺伝子発現（ZGA）や受精後のゲノムリプログラミングに関与していると考えられる。これらを明らかにすることで全能性獲得メカニズム解明など非常に重要な発見につながると考えられる。また、受精卵型の複製様式を引き起こすファクターについても明らかにはなっておらず、これらを明らかにすることによって細胞のリプログラミングや幹細胞の誘導・維持など多くの研究に繋がっていくと考えられる。

4. 自己評価

期間内に発表論文数が 0 であるが、現在、行った研究成果の前半部分を CREST 平谷チームと共同研究として論文投稿し、Revise 中である。後半部分も、データ取得は、ほぼ完了しており、十分にインパクトのある研究成果として論文化できる可能性がある。これは、さきがけ研究という挑戦的な研究に多くの予算を使って出せた結果だと思っており、3 年半という期間で出せる最大の結果が出せたのではないかと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文（原著論文）発表

研究期間累積件数：0件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数：0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

Hirohisa Kyogoku, Saori Takahashi, Ichiro Hiratani, Tomoya S Kitajima

The source of chromosome abnormalities in early embryos

RIKEN BDR Symposium 2023 “Transitions in Biological Systems”

2023 年 3 月 7 日

Hirohisa Kyogoku, Saori Takahashi, Ichiro Hiratani, Tomoya S Kitajima

Chromosome abnormalities in early embryos

第 20 回　幹細胞シンポジウム

2023 年 5 月 24 日

京極 博久

卵母細胞と初期胚の染色体分配はなぜ不安定なのか？

第 116 回日本繁殖生物学会大会

2023 年 9 月 25 日