

平成 31 年 4 月 30 日

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 505

氏名

太田 緑

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

### 記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： サンディエゴ （国名： 米国 ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

発生過程における組織特異的な中心体消失の意義とその分子基盤の解明

3. 派遣期間： 平成 29 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

カリフォルニア大学サンディエゴ校

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注) 「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

## 所期の目的の遂行状況及び成果

本研究は、発生過程において中心体が組織特異的に消失する分子機構と、その生物学的意義の解明を目的として行った。中心体は動物細胞において微小管形成中心として働き、1対の中心小体 (centriole) とその周辺部に分布する中心体マトリックス (pericentriolar material) によって構成される。分裂が盛んな増殖期の細胞では、正確な染色体分配に中心体が必要不可欠であるが、細胞の分化に伴って、特定の組織で中心体が消失することが知られている。多くの動物種では、卵形成過程の特定の時期に中心体が消失することが知られているが (Delattre et al., 2004)、中心体消失に関わる分子機構は明らかになっていない。また、卵形成過程における中心体の消失の生物学的意義は受精による中心体数の倍加を抑制するためと考えられているが (Pimenta-Marques et al., 2016)、受精時に精子からの中心体の持ち込みが無いマウスの卵形成過程においても中心体が消失することや、受精を伴わない筋管細胞や腸細胞の発生過程にも中心体が消失することから (Connolly et al., 1986、Lu et al., 2014)、その生物学的意義は議論の余地が残されている。

本研究では、線虫 (*C. elegans*) を用いて卵形成過程における中心体の消失機構に着目して解析を行った。中心体の消失は発生過程の時期特異的に起こるため、その分子機構の解析には生細胞観察が必要不可欠である。しかしながら、多くの動物種では卵形成の初期過程は母体や胎児の体内で起こるために、この時期の生細胞観察が技術的に困難である。一方、線虫は体が透明かつ細胞系譜が明らかになっているため、生殖細胞系列の生細胞観察が比較的容易に行える。さらに、CRISPR/Cas-9 システムを用いたゲノム編集技術による内在性遺伝子の蛍光標識、mos1-mediated Single Copy Insertion (MosSCI) システム (<http://www.wormbuilder.org/test-page/about-mossci/>) を用いた導入遺伝子の発現、RNA 干渉 (RNAi) 技術による内在性遺伝子のノックダウンが可能なることから、内在性遺伝子の生細胞観察や変異型遺伝子の発現や表現型解析が行える。

派遣期間1年目では、CRISPR/Cas-9 システムを用いて中心体構成因子の内在性遺伝子標識株を作製し、生殖細胞系列において生細胞観察を行った。派遣期間2年目では、より詳細な分子機構を解析するため、生殖細胞系列に併せて初期胚における中心体の構築機構の解析を行った。

## 成果

### 1. CRISPR/Cas-9 を用いた内在性遺伝子の蛍光標識株の樹立

発生過程の特定の時期に消失する中心体のダイナミクスを解析するため、生細胞観察が可能な線虫株を、CRISPR/Cas-9 システムを利用したゲノム編集技術を用いて作製した (Dickinson et al., 2016)。始めに中心体構成因子 SAS-4 の内在性遺伝子標識株 (*gfp::sas-4*) を樹立した。SAS-4 は中心小体の構築および複製に必須の因子であり、一度中心小体に取り込まれると安定的に局在することが知られている (Dammermann et al., 2008)。従って、中心体のダイナミクスを解析する本研究の目的に適した因子と考えられた。内在性 GFP::SAS-4 の局在は、免疫染色法や導入遺伝子発現システムを用いたこれまでの観察で報告されている SAS-4 の中心体局在と合致した。また、その他の中心小体および中心体マトリクス構成因子 SPD-2 や SPD-5 の内在性遺伝子 GFP 標識株(*gfp::spd-2*, *gfp::spd-5*)を減数分裂期モニター株 (研究実施状況 2) の同時標識株を作製した。

### 2. 減数分裂期モニター株と中心体構成因子の 2 重標識株の樹立と生細胞観察

線虫の生殖系列は、体細胞分裂過程から減数分裂過程への移行期、Pachytene 期、Diplotene 期、Diakinesis 期および減数分裂期のどの時期にあるかを、核の形態によって判断することができる。中心体の消失が減数分裂過程のどの時期に消失するのかを調べるために、中心体因子 SAS-4, SPD-2 および SPD-5 の内在性 GFP 標識株と核の形態を可視化したヒストン RFP 株とを掛け合わせ、2 重標識株を作製した。これらの 2 重標識株を、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察したところ、どの因子も Pachytene 期から Diplotene 期の移行期にかけての短い期間に特異的に消失していることがわかった。また、生殖系列における GFP::SAS-4, GFP::SPD-2 および GFP::SPD-5 の蛍光強度を定量したところ、これら因子の局在が減少し始める時期はどの因子も類似しているのに対して、中心体マトリクスに局在する SPD-2 と SPD-5 は、中心小体に局在する SAS-4 に比べて、急速に減少することが分かった。これらの結果より、卵細胞における中心体の消失は Pachytene 期から Diplotene 期の移行期に何らかの分子シグナルをきっかけに、中心体マトリクスの消失が中心小体の消失を先行して起こることが示唆された。

### 3. 生殖系列における中心体消失を制御するシグナル因子の探索

中心体マトリクスの因子 SPD-2、SPD-5 および中心小体の因子 SAS-4 の中心体局在の減少

が、Pachytene 期から Diplotene 期の移行期であったことから、この時期に活性化するシグナル因子が中心体消失を促進することが考えられた。Pachytene 期から Diplotene 期の移行時に *let-60 ras* (MAP KKK)、*mek-2* (MAP KK)、および *mpk-1/sur-1* (MAP Kinase (K)) からなる MAP Kinase カスケードが活性化することが知られている (Church et al., 1995)。そこで、MAP KK (*mek-2*) の温度感受性株を用いて、制限温度における GFP::*SAS-4* の局在を観察した。その結果、*SAS-4* 中心体局在の減少開始が遅延した。従って、生殖系列における中心体の消失は Diplotene 期の移行に働く MAP Kinase カスケードによって引き起こされることが示唆された。

#### 4. Polo kinase および中心体マトリックス因子阻害が中心体消失に及ぼす影響

ショウジョウバエやヒトデを用いた研究から、卵中心体消失の初期に polo kinase および中心体マトリックス因子の中心体局在が減少することが報告されている (Pimenta-Marques et al., 2016; Borrego-Pinto et al., 2016)。しかしながら、これら因子の中心体局在を制御する分子機構は生殖系列においても初期胚の体細胞分裂期においても未解明な点が多い。そこで、polo kinase や中心体マトリックス因子の発現抑制が生殖系列における中心体の消失を促進するかを調べるために、polo kinase の線虫ホモログである PLK-1 および PLK-2、中心体マトリックス因子 SPD-2 および SPD-5 を RNA 干渉法 (RNAi) を用いて発現抑制し、GFP::*SAS-4* を用いて生殖系列の中心小体に与える影響を観察した。その結果、SPD-2 の発現を抑制した条件においてはコントロール RNAi と比較して、GFP::*SAS-4* の消失が早期に起こっていることが分かった。PLK-1 および PLK-2 の発現を抑制した条件では、その機能の多様性から生殖系列の細胞周期自体に影響を与えてしまうため、Polo kinase の中心体特異的な機能阻害が必要とされた (実施状況 5 参照)。また、SPD-5 の RNAi による発現抑制は、生殖系列における効果が見られなかった。これらの結果から、線虫においては、SPD-2 が中心体消失におけるシグナル因子の標的となっていることが示唆された。

#### 5. 初期胚における SPD-2 の分子機能の解析

SPD-2/Cep192 は中心小体と中心体マトリックスの双方に局在し、中心小体の複製や中心体マトリックスの構築といった多様な機能を持つ (Pelletier et al., 2004)。また、SPD-2 は PLK-1 と直接相互作用し、その結合は PLK-1 の中心体局在に必須であることが報告されている (Decker et al., 2011)。ヒトデやショウジョウバエを用いた研究から、Polo kinase の消失が卵中心体消失の引き金となっていること、また本研究の解析より、卵中心体の消失初期に SPD-2

が関わっていることが示唆されたため、**Polo kinase** を中心体局在特異的に阻害した時に、卵中心体の消失に与える影響の解析を目指した。始めに、**SPD-2** の **PLK-1** 結合ドメインの変異体 (*spd-2 PBD* 変異体) を作製し、内在性 *spd-2* を RNAi によってノックダウンした際の致死性、および中心体に与える影響を解析した。その結果、**PLK-1** の局在が中心体特異的に減少しており、100%の胚で致死性が見られた。この致死性が中心小体の複製と中心体マトリックスのどちらに起因するものかを調べるために、**SAS-4** および **SPD-5** の局在を観察した結果、中心小体の複製は正常であったのに対して、中心体マトリックスの集積が極度に低くなっていることが見られた。従って、**SPD-2** は **Polo-Binding domain** を介して **Polo kinase** を中心体に集積し、中心体マトリックスの構築に機能していることが分かった。今後は作製した *spd-2 PBD* 変異体を用いて、**PLK-1** の中心体局在を阻害した時に、生殖系列で卵中心体の消失に与える影響を解析する。この成果は **Cell Cycle meeting 2018 at Salk Institute, ASCB 2018 in San Diego** において発表された。

## 6. オーキシングロン法を用いた **SPD-2** タンパク質分解システムの確立

RNAi 法は容易に目的遺伝子の発現を抑制することが可能であるが、その発現抑制の効果は dsRNA のインジェクションから 24 から 48 時間後に見られる。また、安定的に局在しているタンパク質を除去することが難しい。卵形成過程における中心体の消失は特定の短い期間に起こることから、その分子機構を調べるためには、短期間で目的因子を分解できるシステムが必要であった。オーキシングロン法は植物ホルモンであるオーキシン (IAA) の添加によって、その標的部位 (**Auxin Inducible Degron: AID**) を持つタンパク質を短期間で分解誘導できるシステムである (Nishimura et al., 2009)。CRISPR/Cas-9 システムを用いて、目的の内在性遺伝子に **AID** を付加することにより、線虫胚においても比較的短期間にタンパク質を分解することが報告された (Zhang et al., 2015)。さらに、この分解システムに必要なユビキチンリガーゼ **SCF-TIR1** 複合体の **TIR1** サブユニットを組織特異的なプロモーターを用いて発現することにより、目的タンパク質を組織特異的に分解することが可能であることから、細胞分裂に必須の中心体因子を生殖系列特異的に分解できることが期待された。本研究では **CRISPR/Cas9** システムを用いて内在性遺伝子 *spd-2* に **AID** を付加し、生殖系列特異的に **TIR1** が発現する胚と掛け合わせることで、卵細胞形成過程特異的に **SPD-2** を短時間で分解できる系を確立した。現在この株において **Auxin** 作用させた時の中心体消失に与える影響を解析中である。