

## 原始卵胞の休止期と活性化のバランス制御の解析

山梨大学 生命環境学域 生殖細胞発生研究室  
永松 剛

本研究では物理的な圧縮圧力という生体環境に着目して卵母細胞の休止期維持機構を明らかにすることを目的とした。哺乳類の卵母細胞は胎生期の始原生殖細胞を起源として増殖の後に胎児卵巣で減数分裂へと移行し、出生直後に周囲の顆粒膜細胞と原始卵胞を形成する。その後は原始卵胞を休止期で維持しながら一部を活性化することで成熟卵子を産生する。卵母細胞は胎児期に減数分裂へと移行するために出生後は増えることなくその数は限られており、休止期維持および活性化の機構やこれらのバランス制御は生殖期間と直結する重要な問題である。実際にヒトの早期閉経の原因の多くは原始卵胞の枯渇によって引き起こされている。これまでに原始卵胞の特性の理解には体外培養系が必須と考えて、生体内における発生過程を再現し受精を経て次世代個体となる成熟卵子を誘導する体外培養系を構築した(Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G et al. *Nature* 2016)。しかしながら、体外培養系では生体内の発生と大きく異なり、原始卵胞が形成されてこなかった。この理由を解明するために生体環境と体外培養環境の差異に着目した。組織学的に原始卵胞は卵巣皮質に存在し、髄質側と比べて豊富な細胞外基質に囲まれている。この卵巣皮質にある細胞外基質を酵素液で消化したところ、原始卵胞の維持に必須の転写因子FOXO3が卵母細胞の核外へと移行し、原始卵胞の活性化が誘導されることがわかった。作用機序として細胞外基質により原始卵胞内の卵母細胞は恒常的に静水圧を受けていると仮定し、実験的に圧力を付加できる細胞培養系を確立して加圧下で細胞外基質の消化を行った。その結果、原始卵胞内の卵母細胞はFOXO3を核内にとどめ静止期を維持することがわかった。そして加圧条件下の体外培養系により通常の培養方法では誘導されない原始卵胞の誘導に成功した(Nagamatsu G et al. *Sci Adv* 2019)。このことは卵母細胞が物理的ストレスを生理的シグナルに変えていることを示す初めての成果であるが、その詳細は不明であった。

生体内で細胞はそれぞれの組織における微小環境で様々な物理的刺激にさらされており、圧力刺激は恒常的に存在する重要な問題である。にもかかわらず、これまでに圧力刺激については実験的な障壁から作用機序はほとんど分かっていない。この点を克服するために組織の圧力状態を模倣する加圧培養系と単一細胞レベルの加圧ライブイメージングといった実験系の確立に成功した。加圧培養はコンプレッサーでチャンバー内の空気圧を調節するもので、従来のアクリルアミドゲルの硬さによって圧力を模倣させていた培養系に比べて直接的であり、接着に依存しないため汎用性が高い。一方で、空気圧による調節はライブイメージングに際してはピントがずれてしまうという難点があるため、マイクロデバイスを用いた静水圧による加圧方法によりこの難点を克服した。具体的にはマイクロ流路をシリンジポンプで制御することで加圧を行い、ステージトップのインキュベーターを用いて顕微鏡化で観察を行うシステムである。そして、蛍光タンパク質mScarletを転写因子FOXO3に融合させたFOXO3-mScarletを発現する

卵母細胞を用いて圧力に対する反応をFOXO3の細胞内局在変化として検出した。その結果、実際に圧力値に応じてFOXO3の核局在が促進することを見出すことに成功した。このことは卵母細胞が直接圧縮圧力に反応していることを示しており、次にどのようにFOXO3の局在変化につながっているのかを解析した。FOXO3の局在変化については卵母細胞の細胞膜状のc-KitにSCFが結合することによるリン酸化シグナルがPI3K,AKTと伝達され、最終的にFOXO3がリン酸化されることでその局在が核内から細胞質へと移行することが知られている。そこで圧縮圧力の作用点の検討を行った。圧縮圧力は卵母細胞へのSCF添加によるFOXO3の核外移行は抑制するものの、下流のPI3Kの活性化を誘導するbpV (PTENの阻害剤)の添加においては阻害作用を示さなかった。そこでレセプターであるc-Kitのリン酸化を調べたところ圧縮圧力によってc-Kitのリン酸化の抑制が明となった。そのメカニズムに関しては、圧縮圧力は細胞膜上のc-Kitの細胞室内における凝集体形成を促進し、細胞外からのSCFとの結合を阻害することでそのシグナルを抑制していることが明らかとなった。これらの成果については現在論文としてまとめ投稿中である。

今後は作用機序をさらに詳細に解析を進めていく。これまでに細胞外の圧力はチャネル分子に代表されるメカノセンサーによる物理的な構造変化による作用と、アクチンの重合を介して核内へと情報を伝え遺伝子発現の変化を誘導する作用とが考えられている。まずは卵母細胞における圧力センサーの同定に関して、チオール基に特異的に結合するブロモビマンを作用させ質量分析することで物理的作用によって構造変化するタンパク質を同定した先行研究があり (Johnson CP et.al. *Science* 2007)、この方法の応用を試みている。新生児マウスから原始卵胞内の卵母細胞を単離し、加圧培養することで卵母細胞自身が単独で圧縮圧力に反応しFOXO3を核内に局在させることを見出しており、この実験系にブロモビマンを添加する。そして質量分析を用いて加圧依存的に構造変化している分子を同定する。得られる候補分子に関してはアミノ酸置換で構造変化を阻害し、加圧依存的に原始卵胞が誘導される体外培養系において機能解析を行う。また、ライブイメージング系をさらに拡張して圧縮圧力による細胞動態のライブイメージングを試みている。原始卵胞内の卵母細胞は圧縮圧力の情報を核へと伝えていることが推測され、圧縮圧力によってどのように核まで情報が伝わっていくのかを明らかにする。圧縮圧力はまずアクチンの重合を介して核内へと情報を伝えていることからmicro tubuleを構成するアクチン、核膜の裏打ちタンパクであるラミン、そして核膜内膜からDNAに作用しているSUN1をそれぞれ可視化し、加える圧力値を変化させながらライブイメージングによりその動態変化を解析する。アクチンの可視化は蛍光プローブ (Spirochrome プローブ SiR-Actin) を用いて、ラミンおよびSUN1の可視化はそれぞれ蛍光ベクター (Lamin-Chromobody Plasmid (chromoteck)), SUN1-mScarletの導入によって行う。核の染色をHoechst 33342によって行い、4重蛍光タイムラプスイメージングとする。アクチンと核膜タンパクはダイニンが繋いでいることが知られているのでダイニンの阻害による変化についても明らかにしたい。さらに、加圧の前後で原始卵胞内の卵母細胞を回収し、クロマチン状態の変化についてH3K27me3およびH3K4me3のCut&Runにより解析を行うことや、遺伝子発現の変化に関してもRNA-seqにより解析して対応付けを行うことを検討しており、これらの実験結果から圧縮圧力がどのように核内へと伝わりクロマチン構造を変化させ遺伝子発現の変化を引き越しているのかを明らかにすることができると期待している。