

マウス卵母細胞において

紡錘体二極化を促進する因子 Prc1 の制御機構

西山 翠

目次

要旨	3
1. 序論	5
1-1. 卵母細胞の減数分裂	
1-2. 中心体非依存的な紡錘体形成	
1-3. 微小管依存的な紡錘体の二極化	
1-4. 動原体依存的な紡錘体の二極化	
1-5. Prc1の局在制御	
1-6. 本研究の目的と結果	
2. 材料と方法	12
3. 結果	16
3-1. Cdk1による、Prc1動原体・紡錘体局在の制御	

- 3-2. Plk1による、Prc1動原体・紡錘体局在の制御
- 3-3. Cdk1の高活性下での、Prc1の動原体・紡錘体局在の制御
- 3-4. Flavopiridolによる、Prc1の発現量の変化の有無
- 3-5. In vitroにおける、Cdk1によるPrc1のリン酸化
- 3-6. Prc1-3Aの局在
- 3-7. Cdk1の高活性下でのPrc1-3Aの局在
- 3-8. Cdk1の高活性下での紡錘体の伸長
- 3-9. Cdk1によるPrc1の紡錘体局在制御の役割

4. 考察 32

参考文献 37

謝辞 44

要旨

卵母細胞の減数分裂における染色体分配エラーは、流産や先天性疾患を引き起こす。染色体分配が正常に起こるためには、紡錘体の二極化が必要である。体細胞では2つの中心体が存在し、それらを足場にすることで紡錘体が二極を持ち、染色体を均等に分配する。しかしながら、卵母細胞には、紡錘体の二極の足場となる中心体が存在しないにも関わらず、染色体は均等に分配される。したがって、非中心体依存的な紡錘体二極形成メカニズムが、卵母細胞減数分裂では存在すると考えられる。所属する研究室において、アンチパラレル微小管架橋タンパク質 Prc1 が卵母細胞減数第一分裂において動原体に局在し、紡錘体の二極化に必要であることが報告された。

今回、卵母細胞減数分裂における Prc1 の役割について検証したところ、Prc1 の卵母細胞の減数第一分裂で Cdk1 が Prc1 の動原体局在をネガティブに制御することがわかった。Cdk1 によってリン酸化されない変異体 Prc1 の免疫染色やライブイメージングを行った結果、変異体 Prc1 では紡錘体の二極化が早くなり、減数第一分裂が進行しない(MI arrest の)頻度が高くなった。以上の結果より、Prc1 が Cdk1 によってネガティブに制御されることで、紡錘体の二極化の時間的な制御をもたらし、正常に減数第一分裂が進行することを見出した。

本研究から、卵母細胞減数第一分裂で特異的な Cdk1 の活性が緩やかに上昇することで、Prc1 の紡錘体への局在を可能にさせ、時間的な紡錘体二極化の制御を行っていることが明らかとなった。また、体細胞分裂に比べ卵母細胞減数第

一分裂での Cdk1 の活性が低いことや、動原体に局在する複数のキナーゼが、Prc1 の動原体局在を可能にさせていることがわかった。

1. 序論

1-1. 卵母細胞の減数分裂

卵母細胞は減数分裂によって卵子になる。受精後、胚発生が始まり最終的に個体が発生する。正しい数の染色体が卵母細胞から卵子に分配されることが胚発生に非常に重要である。染色体分配の異常により染色体数の異常な卵子ができてしまい、受精したとしても流産や先天性疾患を引き起こすことが分かっている。この卵子の染色体分配異常の発生の多くは、減数第一分裂で起こると知られている (Holubcová et al., 2015)。

1-2. 中心体非依存的な紡錘体形成

染色体分配では、微小管からなる紡錘体が二極を形成することで、染色体が正確に分配される。体細胞分裂では2つの中心体が両極に存在し、それらを足場にして紡錘体の二極は形成される (Tanenbaum and Medema., 2010)。しかしながら、卵母細胞の減数分裂や早期初期胚では中心体が存在せず、中心体に非依存的な紡錘体二極化メカニズムが働いている (図 1)。

< 体細胞分裂 >



< 卵母細胞の減数第一分裂 >

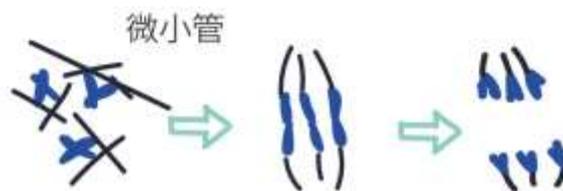


図 1 体細胞分裂と卵母細胞の減数第一分裂

体細胞分裂では中心体が存在するが、卵母細胞の減数第一分裂では中心体が存在しない。卵母細胞の減数第一分裂では、非中心体性の紡錘体の二極化制御が働く。

中心体非依存的な紡錘体形成に寄与するものとして、染色体が微小管の形成を誘導する(1)RanGTP パスウェイ、(2)CPC パスウェイ、そして(3)Augmin パスウェイが挙げられる。

(1) RanGTP パスウェイは染色体近傍で生じる、微小管形成の経路である。Ran は低分子量 GTP 結合タンパク質 Ras ファミリーの 1 つである。細胞分裂において、染色体近傍の RanGEF (Ran guanine nucleotide exchange factor) によって RanGTP の濃度勾配が形成される (Kalab et al., 1999 ; Kahana and Cleveland., 1999)。この濃度勾配によって、微小管結合タンパク質である Tpx2 などの SAF (spindle assembly factors) が活性化され、微小管重合が形成されていく。ヒト、マウス、キイロショウジョウバエの卵母細胞で RanGTP

を阻害すると、微小管重合が遅くなることから (Holubcová et al., 2015; Dumont et al., 2017; Cesario and McKim, 2011)、非中心体性減数分裂においても、RanGTP パスウェイが紡錘体形成のための微小管重合を促進すると考えられている。

- (2) 細胞分裂期に活性化した Aurora B が、INCENP (inner centromere rotein)、Survivin、Borealin のタンパク質とクロモソームパッセンジャー複合体 (chromosome passenger complex;CPC)を形成する (Adams et al., 2000; Bolton et al., 2002; Dumont and Desai, 2012)。アフリカツメガエルの卵抽出液やショウジョウバエの卵母細胞を用いた研究において、この CPC が微小管集合や紡錘体形成に関与していることが明らかにされた (Sampath et al., 2014; Kelly et al., 2007; Colombie et al., 2008)。
- (3) 紡錘体内部の微小管自身も、紡錘体の形成に重要な役割を果たしているとして、Augumin 複合体が挙げられる (Sanchez-Huertas and Luders, 2015)。ショウジョウバエの培養細胞から Dgt 遺伝子が紡錘体内部の微小管生成に寄与することが明らかになった。8つの Dgt 遺伝子産物が複合体を形成し、Augumin 複合体となる (Goshima et al., 2007; Goshima et al., 2008)。Augumin 複合体は紡錘体微小管に γ -チューブリンをリクルートし、そこから新しい微小管が形成される。アフリカツメガエルの卵抽出液を用いた実験においても、Augumin 複合体による微小管形成の役割が確認されている (Petry et al., 2011)。

以上の3点が、中心体非依存的な卵母細胞における紡錘体微小管形成のメカニズムとして明らかになっている。しかしながら、紡錘体の二極化メカニズムの

多くは未だに明らかになっていない。

1-3. 微小管依存的な紡錘体の二極化

紡錘体を二極化する為には、反対方向に微小管を配向させたアンチパラレル微小管が形成される必要がある。双極紡錘体内の逆平行に並んだ微小管を架橋し、それらをスライドさせながらプラスエンドに移動する微小管モーターが、紡錘体の二極化に寄与している。アフリカツメガエルの卵抽出液やマウス卵母細胞では、微小管モーターである Kinesin-5 が紡錘体の二極化を形成するのに必要である (Walczak et al., 1998; Schuhand and Ellenberg, 2007)。また、マウスの卵母細胞には中心体の代わりに複数の微小管形成中心 (microtubule-organizing center: MTOC) が核膜の周囲に形成され、それらが Kinesin-5 によって2極に集められていくことで紡錘体の二極化が起こる (Clift and Schuh, 2015)。このプロセスにおいて、微小管結合タンパク質 HURP が kinesin-5 によって紡錘体中心部にリクルートされ紡錘体の二極化に寄与する (Breuer et al., 2010)。以上のように、微小管に依存して二極化に貢献する因子は明らかになってきていたが、微小管が紡錘体を二極化させるための足場が存在するかについては、明らかにされていなかった。

1-4. 動原体依存的な紡錘体の二極化

微小管は染色体上にある動原体に接続し、紡錘体を形成する (Cheeseman and Desai, 2008)。動原体を構成するうちの 1 つに Ndc80 複合体が挙げられる。Ndc80 複合体は Hec1 (Ndc80 と呼ばれている)、Nuf2、Spc24 と Spc25 によって成り立っている。この Ndc80 複合体のうち Hec1 に微小管と結合するドメインが存在する。Hec1 の変異体やノックアウトしたマウス卵母細胞では、動原体と微小管の接続がうまくいかずに紡錘体の二極化が崩壊するため (Gui and Homer., 2013; Yoshida et al., 2020)、機能的な動原体が紡錘体の二極化に必要であると考えられた。以前、マウス減数第二分裂の卵母細胞やアフリカツメガエルの卵抽出液内で DNA ビーズを入れて培養すると、DNA ビーズの周囲に紡錘体が形成されることから、減数第二分裂の非中心体細胞においては動原体が不要であると言われていた (Heald et al., 1996 ; Deng et al., 2007)。したがって、卵母細胞の減数第一分裂と減数第二分裂では、紡錘体の二極化メカニズムが異なることが示唆された。

1-5. Prc1 の局在制御

最近、マウス卵母細胞の減数第一分裂において、動原体構成タンパク質 Hec1 とアンチパラレル微小管架橋タンパク質 Prc1 が相互作用を示すこと、Hec1 依存的に Prc1 が動原体に局在すること、Hec1 と Prc1 の相互作用が紡錘体の二極化に重要な役割を果たすことが、所属する研究室で明らかにされた (Yoshida et

al., 2020)。しかしながら、Prc1 がどのように動原体に局在するのか、またどのように紡錘体の二極化に役割を果たすのかについてはまだ解明されていない。

Prc1 は細胞質分裂の際に微小管モーターである Kif4 によって紡錘体のミッドゾーンに輸送され、ミッドゾーンの微小管が束化することにより細胞質分裂に貢献する (Glotzer 2009; Mollinari et al., 2005)。体細胞分裂が始まってから細胞分裂後期になるまで Prc1 は Cdk1 によってリン酸化され、細胞分裂中期で細胞質分裂が起こらないように抑制されている。また体細胞において Prc1 の発現をロックダウンすると、紡錘体形成は起こるものの細胞質分裂は起こらない。(Mollinari et al., 2002, 2005)。さらに、細胞質分裂の際には、Cdk1 の活性が下がることで、Prc1 の Plk1 との相互作用が可能になることが細胞質分裂に必要であることも報告されている (Neef et al., 2007)。Plk1 は Prc1 の C 端の部位をリン酸化することで、Prc1 の微小管への局在をポジティブに制御する。体細胞分裂における Prc1 の微小管局在の制御は、Cdk1 による制御により Plk1 による制御が重要であるとの主張もある (Hu et al., 2012)。

Prc1 の微小管結合メカニズムやその機能については上述のように様々な研究が報告されているが、Prc1 の動原体局在メカニズムやその機能については明らかになっていない。また、上述したように体細胞分裂では Prc1 は紡錘体の二極化に必要ではなく、マウス卵母細胞において Prc1 がどのように紡錘体二極化に寄与しているのかについても解明の余地がある。

1-6. 本研究の目的と結果

今回、卵母細胞における Prc1 の役割について検討した。その結果、Prc1 は Cdk1 によってネガティブに制御され、紡錘体の二極化を制御する役割を持つことが明らかになった。

2. 材料と結果

2-1. マウスと卵母細胞の培養

RIKEN Kobe Branch (IACUC) の International Animal Care and Use Committee で承認されたマウスを実験に使用した。8~12 週齢の B6D2F1 (C57BL/6 × DBA/2) の雌マウスから卵母細胞を採卵した。腹腔内に 0.1 mL (5 IU) 妊馬血清性腺刺激ホルモン (Pregnant Mare Serum Gonadotropin, PMSG, ASKA Pharmaceutical) を注射し、48 時間後に卵核胞 (germinal vesicle, GV) 期の卵母細胞を採取し、37°C 下で 200 nM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX) を添加した M2 培養液で培養した。減数分裂の再開は M2 培養液で卵母細胞を 3 回洗浄することで行った。また、5 μ M Flavopiridol hydrochloride hydrate (Sigma), 100 nM BI2536 (Chemscene), 1 μ M reversine (Cayman) は卵母細胞の培養の際に添加した。

2-2. RNA マイクロインジェクション

mRNA は mMMESSAGE mMACHINE T7 kit (Thermo Fisher Scientific) を使って合成した。合成した mRNA は 200 nM IBMX を添加した M2 培地の中で、GV 期の卵母細胞にマイクロインジェクションをした。マイクロインジェクションした量は、0.4 pg CyclinB1 Δ N (a. a. 91-430); 0.26 pg 24xGCN4-Prcl-WT/mutants, scFv-sfGFP (SunTag-Prcl-WT/mutants); 0.5 pg H2B-mcherry; 2 pg EGFP-MAP4; 0.13 pg (図 11-B, 図 13) or 0.4 pg (図 14) non-tagged Prcl である。マイクロインジェクション後は 3 時間 200 nM IBMX を添加した M2 培地の中で培養した。

2-3. 卵母細胞の免疫染色

卵母細胞は 100 μ L の固定液 (100 mM PIPES (pH 7.0), 1 mM $MgCl_2$, 0.1% Triton-X100) に 最終濃度 1.6% Formaldehyde を加えた液で 30 分固定した。その後、100 μ L PBT で 4 回洗浄し、4 $^{\circ}$ C で一晩置いた。100 μ L 3% BSA-PBT で 30 分ブロッキングした後、1 次抗体 (rabbit anti-Prcl (1:100, H-70 sc-8356, Santa Cruz), human anti-centromere (1:100, ACA, 15-234, Antibodies Incorporated)) を添加した 50 μ L 3% BSA/PBT の中で、4 $^{\circ}$ C 下で一晩置いた。50 μ L 3%BSA/PBT で 4 回洗浄した後、2 次抗体 (1:500) を添加した 3% BSA/PBT の中で、4 $^{\circ}$ C 下で一晩置いた。2 次抗体は Alexa Flour 555 goat anti-human IgG (H+L) (Invitrogen, A21433) と Alexa Flour 488 goat anti-rabbit (H+L) (Invitrogen, A11029) を使用した。

2-4. 卵母細胞のライブイメージング

40 \times C-Apochromat 1.2NA 水浸対物レンズ (Carl Zeiss) を設置した、LSM780 共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss) を使用した。EMBL Heidelberg の Dr. Jan Ellenberg のグループが開発したマルチポジションオートフォーカスのマクロ AutofocusScreen (Rabut & Ellenberg, 2004) と Zen ソフトウェアを使用した。Prcl-SunTag と染色体の観察では、512 \times 512 ピクセル xy イメージで少なくとも 17 z-confocal sections (every 1.5 μ m) で記録した。また、5 分または 10 分のインターバルで少なくとも 12 時間撮影した。紡錘体と染色体の観察では、512 \times 512 ピクセル xy イメージで少なくとも 11 z-confocal sections (every 4 μ m) で記録した。また、5 分または 10 分のインターバルで少なくとも 12 時間

撮影した。

2-5. 卵母細胞免疫染色のイメージング

40×C-Apochromat 1.2NA 水浸対物レンズ (Carl Zeiss)を設置した、LSM780 共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss)を使用した。512 × 512 ピクセル xy イメージで少なくとも 30 z-confocal sections (every 0.5 μm)で記録した。

2-6. シグナル強度の定量

蛍光シグナルの定量には Fiji ソフトウェアを使用した。動原体、微小管の Prc1 の局在レベルを決定するために、測定したい領域の Prc1 の蛍光強度を測定し、そこから細胞質の Prc1 の蛍光強度を差し引いた。同様に ACA のシグナルも測定し、そこから細胞質の ACA の蛍光強度を差し引いた。Prc1 と ACA の蛍光強度の比率を計算し、動原体、微小管の Prc1 の局在レベルを決定した。各卵母細胞において、動原体 10 個、もしくは微小管 10 箇所 of Prc1 のシグナルを解析し、平均を取った。

2-7. 3D 解析

紡錘体の形を解析するために Imaris ソフトウェアを使用し、EGFP-MAP4 のシグナルの 3D 表面変換を行った。

2-8. In vitro kinase assay

GST タグを融合させた Prc1-WT (a. a. 451-500) と Prc1-3A (a. a. 451-500) のリ

コンビナントタンパク質は、BL21(DE3) pLysS E. coli (Promega)で発現させ、GST SpinTrap (GE)で精製した。600 μ Lの10 mM PBS (pH 7.4)で2回洗浄し、抽出液 (50 mM Tris-HCl, 20 mM 還元化グルタチオン (pH 8.0))で抽出した。キナーゼとリコンビナントタンパク質の反応は3 μ Lの1 mM ATP, 1 μ Lの5 mM ATP[γ - 32 P] (1 mCi/mL, PerkinElmer, Inc.), 1 μ Lのリコンビナントタンパク質を0.2 μ g Cdk1/Cyclin B1 (Carna Biosciences Inc.)を含んだ5 μ Lのキナーゼバッファー (40 mM KCl, 80 mM Na- β -glycerophosphate, 20 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT (pH7.3))に添加することで行った。キナーゼとリコンビナントタンパク質の混合物は36°Cで30分間インキュベートした。その後、SDS-PAGEを行い、リン酸化をオートラジオグラフィーで検証した。また、クマシーブリリアントブルー染色はOne-step CBB (Biocraft, CBB-250)を使用した。

2-9. 統計解析

グラフの作成と統計解析にはExcelとGraphPad Prismを使用した。有意差テストに使用した方法は図のレジェンドに記載している。

3. 結果

3-1 Cdk1 による、Prc1 動原体・紡錘体局在の制御

卵母細胞減数分裂で Prc1 の動原体局在が見られることを受け、Prc1 の動原体局在が減数分裂特異的な因子によって制御されている可能性が考えられた。そこで、卵母細胞特異的な活性制御が報告されている Cdk1 に着目した。Prc1 は Cdk1 によって微小管への局在が制御されるという報告もある (Mollinari et al., 2002, 2005)。そこで、Prc1 の動原体局在が Cdk1 によって制御されているのかについて検討した。Cdk1 は細胞分裂のマスターキナーゼとして知られている。体細胞分裂において、核膜の崩壊とともに、Cdk1 の活性が高まり、細胞質分裂の直前まで Cdk1 の活性は高いまま維持される (Gavet and Pines, 2010)。一方で、卵母細胞の減数分裂においては、核膜の崩壊から細胞質分裂までの間にゆっくりと Cdk1 の活性が上がることが知られている (Choi et al., 1991; Polanski et al., 1998)。また、体細胞分裂において、Cdk1 の活性が下がることで Prc1 の脱リン酸化が起こり、細胞質分裂の紡錘体ミッドゾーンに Prc1 が強く局在し、体細胞分裂に寄与することが知られている (Mollinari et al., 2002, 2005)。以上のことから、Cdk1 の時間的な活性の制御が、Prc1 の局在に影響を与えているのではないかと考え、Cdk1 に着目した。

Cdk1 の阻害剤である Flavopiridol を使用し (Solc et al., 2015)、核膜崩壊を起こして 2 時間後の Prc1 の局在を免疫染色で観察した。Flavopiridol を添加した卵母細胞では、Prc1 の動原体局在と紡錘体局在がコントロールと比べて高かった。また、Prc1 の紡錘体局在が、束のように強く局在しているところが部分的に観察された (図 2, 白矢印)。以上のことから、Cdk1 によって Prc1 の動

原体局在と紡錘体局在がネガティブに制御されていることが明らかとなった。

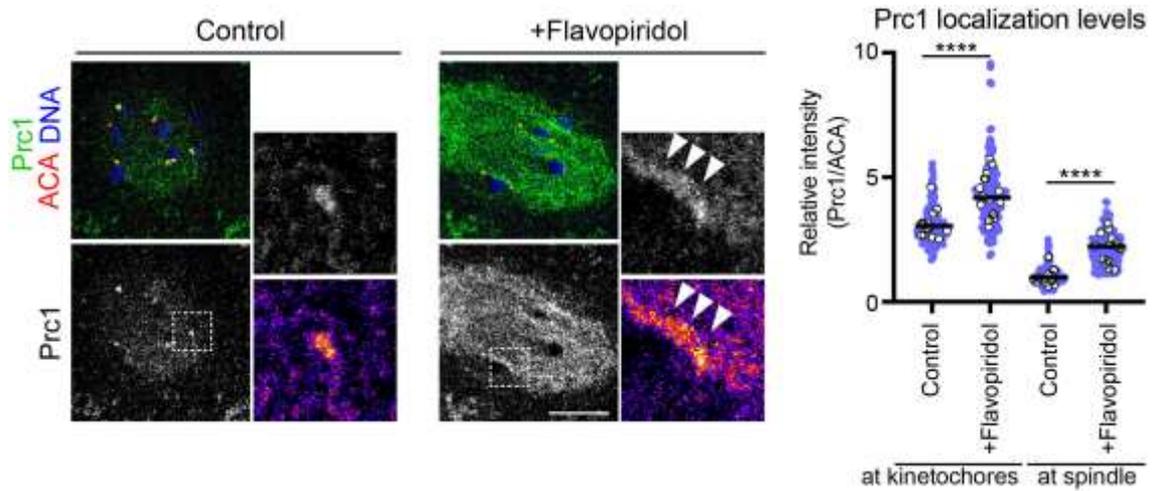


図 2 Cdk1 の阻害をした卵母細胞では、Prc1 の動原体局在レベルと紡錘体局在レベルの両方が上昇する

核膜崩壊後 1 時間 45 分後に Flavopiridol を卵母細胞に添加し、15 分後に固定した。Prc1 (green)、動原体 (ACA, red)、DNA (Hoechst33342, blue) で免疫染色した。定量は動原体 Prc1 のシグナル強度と紡錘体 Prc1 のシグナル強度を各々、ACA のシグナル強度で比率を算出した。青丸はそれぞれの動原体や微小管を示し、動原体は 1 つの卵母細胞から 10 個の動原体、紡錘体は 10 の紡錘体の部分を定量した (n=150, 160 kinetochores, and 150, 160 microtubules)。白丸は卵母細胞内での動原体と紡錘体の値の平均を示している (n=15, 16 oocytes)。スケールバー、10 μ m。****P<0.0001, by two-tailed unpaired Student' s t-test。

3-2. Plk1 による、Prc1 動原体・紡錘体局在の制御

また、体細胞分裂において、Prc1 の紡錘体局在は Plk1 によって制御されており、Cdk1 より Plk1 の方がその制御に重要であるとの報告がある (Hu et al., 2012)。そこで、卵母細胞減数分裂での Plk1 による Prc1 の制御について検証した。

Plk1 阻害剤 BI2536 を使用し、核膜崩壊を起こして 2 時間後の Prc1 の局在を免疫染色で観察した。BI2536 を添加した卵母細胞では、Prc1 の動原体局在がコントロールと比べて減少し、紡錘体局在がコントロールと比べて上昇した (図 3)。以上のことより、Plk1 によって Prc1 の動原体局在はポジティブに、紡錘体局在はネガティブに制御されていることが明らかとなった。また、少なくとも本実験の条件では、Plk1 を阻害した時よりも Cdk1 を阻害した時の方が、Prc1 の局在に与える影響が大きいことが分かった。

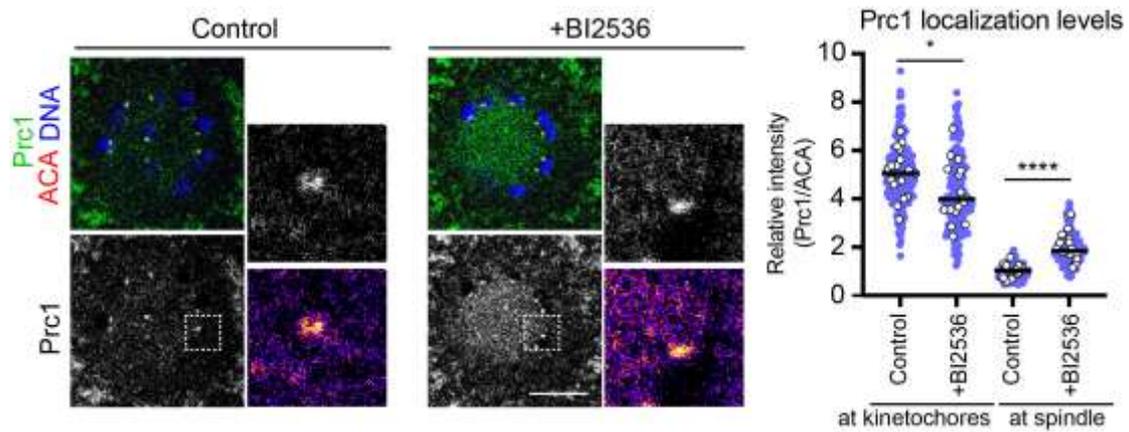


図 3 Plk1 の阻害をした卵母細胞では、Prc1 の動原体局在レベルが減少し、紡錘体局在レベルが増加する

Prc1 (green)、動原体 (ACA, red)、DNA (Hoechst, blue) で免疫染色した。定量は動原体 Prc1 のシグナル強度と紡錘体 Prc1 のシグナル強度を各々、ACA のシグナル強度で比率を算出した。青丸はそれぞれの動原体や微小管を示し、動原体は 1 つの卵母細胞から 10 個の動原体、紡錘体は 10 の紡錘体の部分を定量した (n=190, 170 kinetochores, and 190, 170 microtubules)。白丸は卵母細胞内での動原体と紡錘体の値の平均を示している (n=19, 17 oocytes)。スケールバー、10 μm 。****P<0.0001, *P=0.033, by two-tailed unpaired Student's t-test。

3-3. Cdk1 の高活性下での、Prc1 の動原体・紡錘体局在の制御

Cdk1 の阻害剤を用いた研究により、Prc1 の動原体と紡錘体の局在がネガティブに制御されることが明らかになった (図 2) ことを受け、Cdk1 の活性を上げた時の Prc1 の局在がどうなるのかについて検証した。分解されないフォームの Cyclin B1 (CyclinB1 Δ N) (Glotzer et al., 1991) を過剰発現させることで、Cdk1 の活性を過剰活性化させ、核膜崩壊を起こして 2 時間後の Prc1 の局在を免疫染色で観察した。CyclinB1 Δ N をマイクロインジェクションした卵母細胞では、Prc1 の動原体局在と紡錘体局在がコントロールと比べて低かった (図 4)。以上のことから、Cdk1 の高活性は Prc1 の動原体局在と紡錘体局在を減少させることが明らかになった。

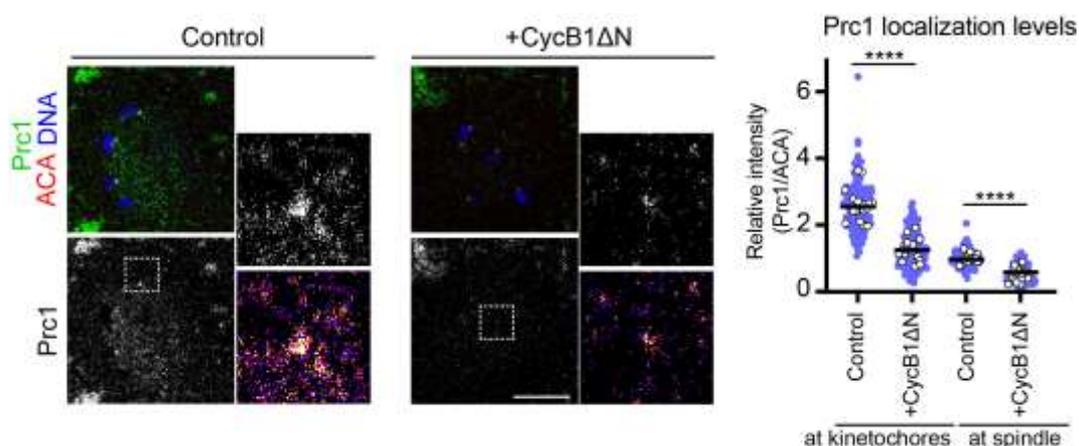


図 4 Cdk1 の過剰活性は Prc1 の局在を減少させる

CyclinB1 Δ N を過剰発現させた卵母細胞は核膜崩壊後 2 時間で固定し、免疫染色した。定量は動原体 Prc1 のシグナル強度と紡錘体 Prc1 のシグナル強度を各々、ACA のシグナル強度で比率を算出した。青丸はそれぞれの動原体や紡錘体を示し、動原体は 1 つの卵母細胞から 10 個の動原体、紡錘体は 10 の紡錘体の部分を定量した (n=160, 150 kinetochores, and 160, 150 microtubules)。白丸は卵母細胞内での動原体と紡錘体の値の平均を示している (n=16, 150ocytes)。スケールバー、10 μ m。****P<0.0001, by two-tailed unpaired Student's t-test。

3-4. Flavopiridol による、Prc1 の発現量の変化の有無

Cdk1 阻害剤 Flavopiridol 存在下で Prc1 の動原体と紡錘体の局在レベルが上がった(図 2) ことが、Prc1 の発現量の変化によるものか否かを検討した。

Flavopiridol を添加した際に Prc1 の発現量が変化するか比べることで検証した。減数分裂を起こして 2 時間後の卵母細胞を使用し、ウエスタンブロッティングで検証したところ、Flavopiridol を添加した培養液で培養した卵母細胞の Prc1 の発現量は、ほぼ変化していないことが分かった (図 5)。以上のことから、Cdk1 の活性レベルは Prc1 の発現量に影響は与えずに、局在の制御に影響を与えることが明らかとなった。

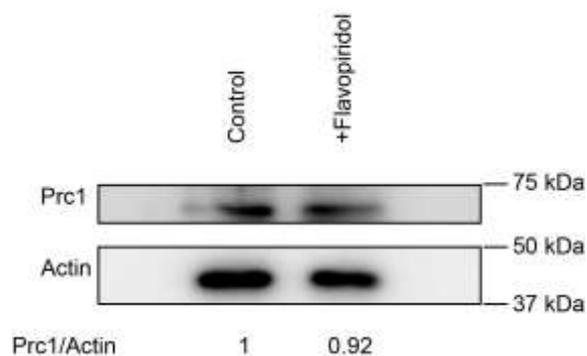


図 5 Cdk1 の阻害は Prc1 の発現量に影響を与えない

核膜崩壊後 1 時間 45 分後に Flavopiridol を添加し、2 時間でサンプリングした (n=150, 150 oocytes)。

3-5. In vitro における、Cdk1 による Prc1 のリン酸化

Cdk1 はどのように Prc1 の局在を制御するのかを検討するため、Cdk1 による制御を受けない Prc1 の変異体を作成することにした。

ヒトの体細胞において、Prc1 の C 端にある unstructured domain の Thr478 と Thr480 が、Cdk1 によってリン酸化されることが報告されている (Mollinari et al., 2002; Neef et al., 2007) (図 6-A)。In vitro kinase assay において、マウス Prc1 のフラグメント (a. a. 451-500) が Cdk1 によってリン酸化されることが分かった (図 6-B)。Cdk1 によってリン酸化されうるコンセンサス配列と、ヒト Prc1 のリン酸化部位をベースに、マウス Prc1 の Thr467, Thr470 そして Thr478 の 3 つの部位が Cdk1 によってリン酸化されると仮定した。この 3 つの部位をアラニンに置換し、非リン酸化型フォームを作成した (Prc1-3A) (図 6-A)。In vitro kinase assay において、この Prc1-3A は Cdk1 によってリン酸化されなかった (図 6-B)。以上のことから、in vitro で Cdk1 がマウスの Prc1 の Thr467、Thr470、Thr478 を直接的にリン酸化することが分かった。

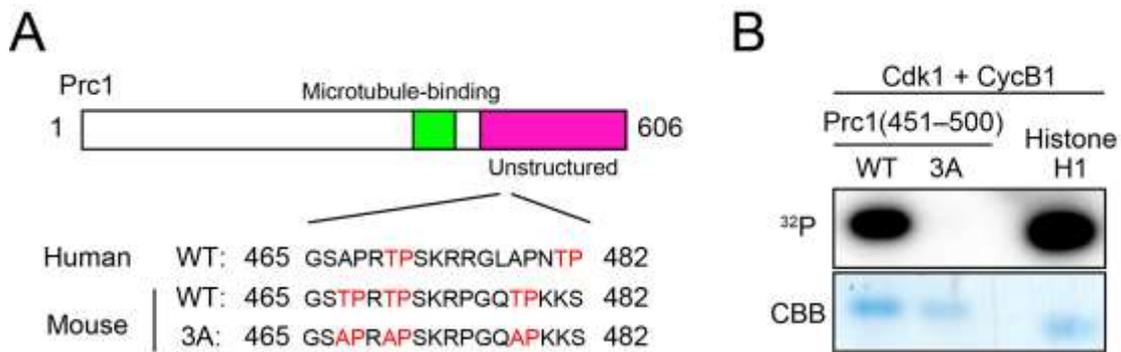


図 6 Cdk1 は Prc 1 を直接的にリン酸化する。

ヒトとマウスのPrc1の略図。Prc1には微小管結合ドメイン (green)と非構造ドメイン (pink)が存在する。Cdk1によってリン酸化されるコンセンサス配列は強調している (red)。ヒトのPrc1ではThr470とThr481がCdk1によってリン酸化される。マウスPrc1-3AはThr467、Thr470、Thr478の3箇所をアラニンに変異置換したものである (図 10-A)。In vitroにおいてCdk1はPrc1をリン酸化する。GSTタグを融合したPrc1フラグメント (a. a. 451-500)のリコンビナントタンパク質GST-Prc1(451-500)-WTとGST-Prc1(451-500)-3AをCdk1とCyclin B1を混ぜ、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在下でインキュベートした。リン酸化レベルはSDS-PAGEとオートラジオグラフィーを用いた (図 10-B 上)。また、タンパク質はクマシーブリリアントブルー (CBB)で染色した (図 10-B 下)。コントロールにHistone H1を使用した。

3-6. Prc1-3A の局在

Cdk1 によって Prc1 のリン酸化される部位が分かったことをもとに、このリン酸化の役割について検証した。非リン酸化型 Prc1-3A の局在パターンをライブイメージで観察することで、Prc1 の Cdk1 による制御の役割を検討した。観察するにあたり、SunTag システムを使った蛍光を認識するタグのついた Prc1 を用いた (Tanenbaum et al., 2014; Yoshida et al., 2020)。まず、卵母細胞に SunTag の付いた Prc1-WT を発現させライブイメージングを行った。Prc1-WT は動原体に強く局在していることが見られ、また紡錘体にも弱く局在していた。次に、卵母細胞に SunTag の付いた Prc1-3A を発現させライブイメージングを行った。Prc1-3A の紡錘体局在はコントロールの Prc1-WT と比べて上昇していた (図 7-A)。

また、免疫染色でも Prc1-3A の局在パターンを観察した。卵母細胞にタグなしの Prc1-WT もしくは Prc1-3A を発現させ、核膜崩壊を起こして 2 時間後の Prc1 の局在を免疫染色で観察した。ライブイメージングと同様に、Prc1-3A を発現させた卵母細胞では、Prc1 が強く紡錘体に局在していた (図 7-B)。以上のことから、Prc1 は Thr467、Thr467、Thr478 を介して、微小管への局在がネガティブに制御されていることが明らかとなった。

3-7. Cdk1 の高活性下での Prc1-3A の局在

Cdk1 による非リン酸化型 Prc1 の変異体 Prc1-3A が紡錘体に強く局在する結果から、この変異体の局在が Cdk1 の活性に影響を受けないかについて検証した。まず、卵母細胞に SunTag の付いた Prc1-WT を発現させ、CyclinB1 Δ N を過剰発現させライブイメージングを行った。CyclinB1 Δ N を過剰発現させた Prc1-WT では、Prc1 の紡錘体局在が著しく減少した。次に、卵母細胞に SunTag の付いた Prc1-3A を発現させ、CyclinB1 Δ N を過剰発現させライブイメージングを行った (図 8-A 左)。CyclinB1 Δ N を過剰発現させた Prc1-3A の紡錘体局在は、CyclinB1 Δ N を発現させていないコントロールと比べて減少した (図 8-A 右)。しかしながら、紡錘体局在の減少率を調べたところ、Prc1-WT の方が Prc1-3A に比べて減少率が大きかった (図 8-B)。以上の結果から、Cdk1 は Prc1 の Thr467、Thr467、Thr478 を介して紡錘体局在をネガティブに制御することが分かった。また、Cdk1 はこれらのリン酸化サイトを介さずに紡錘体局在をネガティブに制御する経路も持つことが示唆された。

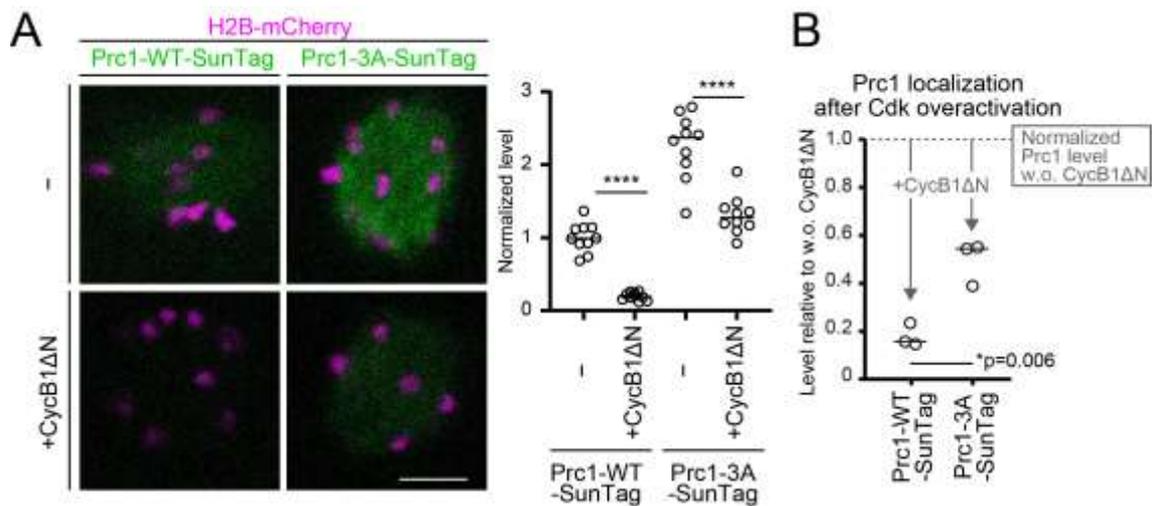


図 8 Prc1-3A は Cdk1 の過剰発現に比較的影響を受けづらい

CyclinB1ΔN を過剰発現させ、一緒に Prc1-WT-SunTag もしくは Prc1-3A-SunTag を発現させた卵母細胞をライブイメージングした。イメージは減数分裂開始後 2 時間。スケールバー、10 μm (図 8-A 左)。核膜崩壊後 2 時間の紡錘体 Prc1 のシグナルを測定した (n=15, 15, 14, 13 oocytes)。****p<0.0001 by two-tailed unpaired Student's t-test (図 8-A 右)。図 8-A 右のデータセットを使用し、CyclinB1ΔN を添加後の Prc1 の紡錘体局在の減少率を示した (図 8-B)。

3-8. Cdk1 の高活性下での紡錘体の伸長

Cdk1 が Prc1 の紡錘体局在をネガティブに制御していることから、この制御が卵母細胞の減数分裂にどのような影響を与えうるのかについて検討した。

まず、卵母細胞における CyclinB1 Δ N の Prc1 の局在制御が紡錘体二極化に影響を与えるのかについて検討した。蛍光タンパク質のついた微小管マーカー (EGFP-MAP4) と染色体マーカー (H2B-mCherry) を卵母細胞に発現させ、紡錘体の二極化の過程を観察した (図 9-A)。コントロールでは、紡錘体はまずボール状の形をとり、その後、核膜崩壊後 4~6 時間にかけて伸長することで二極化する。Prc1-WT を発現させた卵母細胞では、コントロールに比べて紡錘体の二極化が早く起こり、核膜崩壊後およそ 4 時間で見られる。また、Prc1-3A を発現させた卵母細胞では、紡錘体の二極化がさらに早く起こり (およそ 3 時間)、その程度も大きかった (図 9-B)。

一方で、CyclinB1 Δ N を過剰発現させた卵母細胞では、紡錘体の二極化が遅延した。この CyclinB1 Δ N 過剰発現による紡錘体二極化の遅延は、Prc1-WT を発現させてもキャンセルすることができなかった。しかし、Prc1-3A を発現させた卵母細胞においては、CyclinB1 Δ N 過剰発現による紡錘体二極化の遅延が有意にキャンセルされた (図 9-B)。以上のことから、Prc1 の紡錘体二極化を促進させる機能が Cdk1 によってネガティブに制御されていることが分かった。また、Prc1 の紡錘体への局在レベルが、紡錘体の二極化のタイミングを制御しうることも明らかとなった。

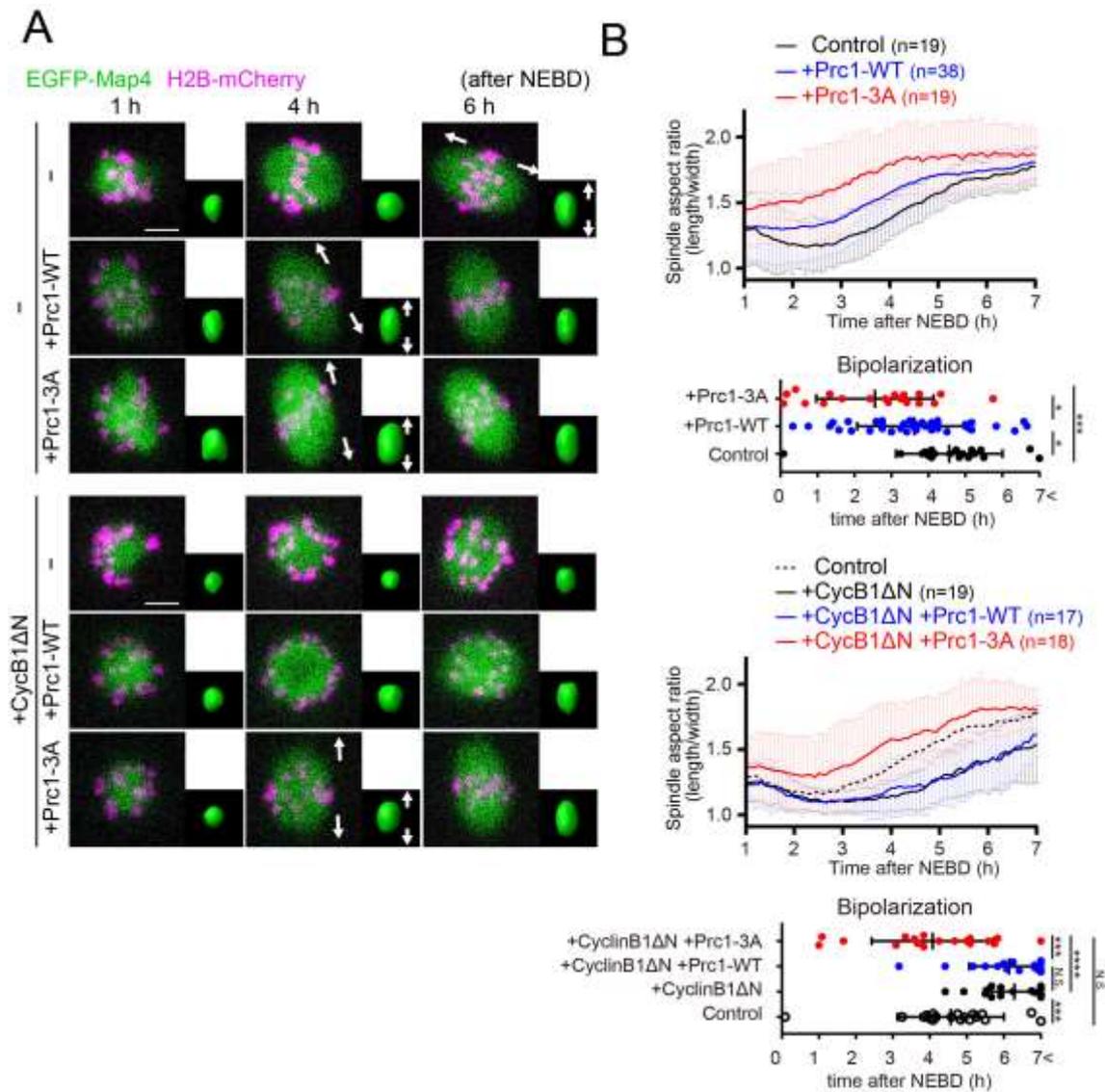


図 9 Cdk1 の過剰発現は紡錘体二極化を遅らせるが、Prc1-3A ではその遅れをキャンセルさせる

EGFP-MAP4 (microtubule, green)、H2B-mCherry (chromosome, magenta)と一緒に、CyclinB1 ΔN の過剰発現、Prc1-WT もしくは Prc1-3A を発現させた卵母細胞をライブイメージングした。紡錘体の形状は 3D で再構築した。矢印は紡錘体の伸長を示す。スケールバー、10 μm (図 9-A)。

紡錘体の二極化を定量化した (図 9-B)。2つのグラフ内のコントロールの線は同一である。

* $P < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ by two-tailed unpaired Student's t-test with holm-correction.

3-9. Cdk1 による Prc1 の紡錘体局在制御の役割

Cdk1 による Prc1 の紡錘体局在の制御が、紡錘体二極化のタイミングに影響を与えることが分かった。次に、この紡錘体二極化のタイミングが、卵母細胞の減数分裂進行にどのような影響を与えうるのかについて検討した。Prc1-WT と Prc1-3A をそれぞれ過剰発現させた卵母細胞で、減数第一分裂を終えて第二分裂の中期まで進行する細胞の割合を調べた。Prc1-3A を過剰発現させた卵母細胞では、減数第一分裂中期で停止する細胞 (MI arrest) の割合が極めて高いことが分かった (図 10-A, C)。そこで、これらの停止が、紡錘体チェックポイントの働きによるものなのか検証した。紡錘体チェックポイント阻害剤である Reversine を添加したところ、Prc1-3A を過剰発現させた卵母細胞の減数第一分裂後期に入るタイミングが Prc1-WT と同様になった (図 10-B)。以上の結果から、Cdk1 によって Prc1 が制御されない場合、紡錘体チェックポイントの働きによって減数分裂の進行が停止しやすいことが明らかとなった。

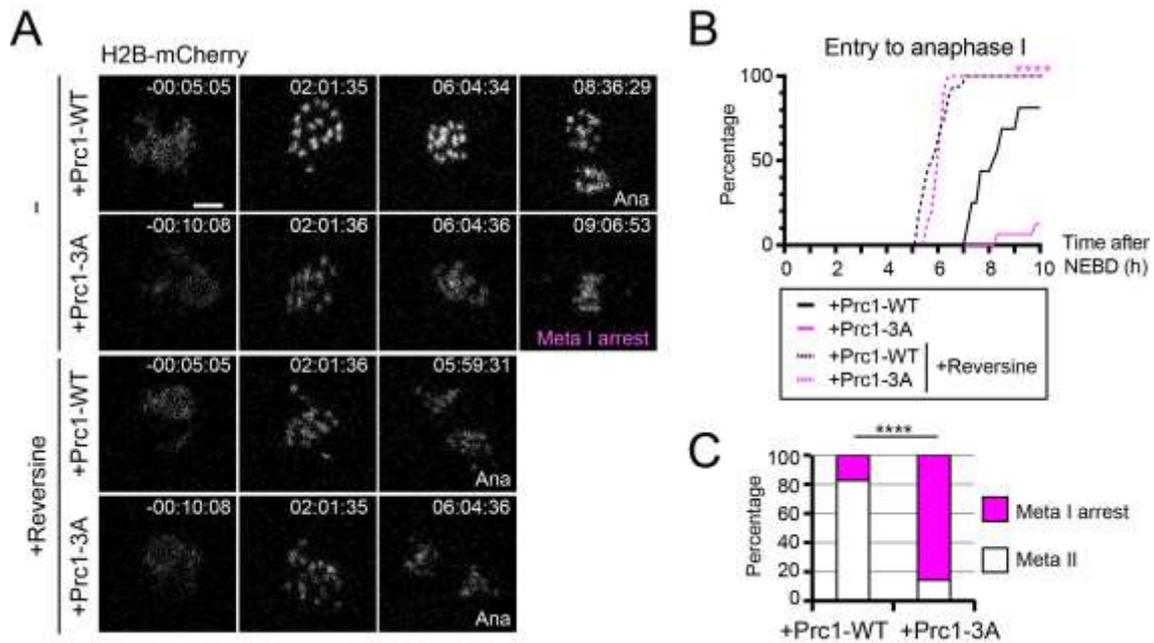


図 10 非リン酸化型 Prc1 は、減数第一分裂中期で停止することによる紡錘体チェックポイントの活性を引き起こす

Prc1-WT もしくは Prc1-3A を過剰に発現させた卵母細胞に、Reversine を不添加/添加させラ イブイメージングを行った。減数第一分裂後期への移行は H2B-mCherry をラベルした染色体に よりモニターした。核膜崩壊後の時間 (hh:mm:ss)。スケールバー、10 μm (図 10-A)。減数第 一分裂後期への移行が見られた卵母細胞の割合 (n=16, 16, 16, 15)。****p<0.0001 by Fisher' s Exact test (図 10-B)。リン酸化欠如 Prc1 は減数第一分裂中期で停止する割合が高い。Prc1-WT もしくは Prc1-3A を過剰発現させオーバーナイトで培養し固定し、動原体 (ACA) と DNA (Hoechst33342) で免疫染色した。減数第一分裂中期 (MI arrest) と減数第二分裂中期 (MII) に 分類した。****p<0.0001 by Fisher' s Exact test (図 10-C)。

4. 考察

中心体のない卵母細胞に特異的にPrc1の動原体局在が見られたため、卵母細胞特異的な因子がPrc1の動原体局在を可能にすることが考えられた。そこで、卵母細胞特異的な活性制御を示すCdk1に着目した。体細胞分裂においてCdk1がPrc1の紡錘体局在を制御するメカニズムは以前から報告されていたため (Mollinari et al., 2002, 2005)、卵母細胞におけるPrc1の動原体局在もCdk1によって制御されている可能性があると考えた。また、Cdk1は中心体性の因子の1つである。体細胞分裂において、Cdk1は中心体に局在し、中心体の複製・成熟・分離などの役割を担っている。卵母細胞の減数分裂では中心体が存在しないため、Cdk1によるPrc1のリン酸化が弱くなり、それによってPrc1が動原体に局在できるようになるのではないかと考えた。中心体性の細胞においては、Cdk1によってPrc1の動原体局在がネガティブに制御されているために、Prc1の動原体への局在が見られない可能性がある。

本研究のマウス卵母細胞を用いた研究において、Cdk1の阻害剤はPrc1の動原体局在と紡錘体局在を増加させること、Cdk1の人工的な過剰活性はPrc1の動原体局在と紡錘体局在を減少させることが分かり、Prc1はCdk1によってネガティブに制御されていることが明らかとなった (図2、図4)。Cdk1によってリン酸化されない非リン酸化型Prc1-3Aを発現させた卵母細胞では、Prc1は強く紡錘体に局在することが分かった (図7)。さらに、Prc1-3Aを発現させた卵母細胞では紡錘体の二極化が早まることも分かった (図9)。以上のことより、Cdk1によってPrc1はリン酸化され紡錘体への局在がネガティブに制御され、紡錘体二極化のタイミングを制御しうることが分かった。卵母細胞の減数第一分裂にお

いて、Cdk1 は緩やかに活性が上昇する。Cdk1 の活性を人工的に急峻に活性化させると、動原体と微小管の接続に異常が生じ (Davydenko et al., 2013)、このような異常は紡錘体チェックポイントを活性化することが知られている。今回、Cdk1 活性が Prc1 の紡錘体局在をネガティブに制御することで、紡錘体の二極化のタイミングが制御されることが明らかとなった。Cdk1 活性による Prc1 の制御を欠くと、紡錘体チェックポイント依存的な減数第一分裂停止が起きやすい (図 10)。したがって、Cdk1 による Prc1 の紡錘体への局在制御は減数第一分裂の進行に必要であることが示唆される (図 11)。

Cdk1 の活性を下げると動原体の Prc1 局在が上昇したこと、Cdk1 の活性を上げると動原体の Prc1 局在が減少したという結果から、Cdk1 が Prc1 の動原体局在をネガティブに制御していることが分かった。Cdk1 による Prc1 の動原体局在メカニズムは明らかにされなかったが、中心体性の因子の 1 つである Cdk1 が Prc1 の動原体局在をネガティブに制御していることが明らかになったことは興味深い。体細胞分裂において Cdk1 の活性を阻害した場合、Prc1 の動原体局在が見られるという可能性も考えられる。

また、体細胞分裂において、Prc1 の制御は Cdk1 より Plk1 によるものが重要であると報告があったが (Hu et al., 2012)、本研究による卵母細胞の減数第一分裂における実験では、Cdk1 による制御が大きいことが示唆された (図 2、図 3)。卵母細胞減数第一分裂において、なぜ Plk1 よりも Cdk1 が Prc1 の局在を制御するのかについては議論の余地がある。可能性として、Cdk1 によって Prc1 がリン酸化されることが、卵母細胞の減数第一分裂に特異的な Prc1 の局在を可能にして

いることが挙げられる。そのため、Plk1のリン酸化よりCdk1のリン酸化が重要になると示唆される。

本研究において、マウス卵母細胞ではPrc1の非構造部位であるC端のCdk1によるリン酸化がPrc1の紡錘体局在に関与していることは分かったが、Cdk1によるPrc1の動原体局在の制御がどのように起こっているのかについては明らかにならなかった。Cdk1によってPrc1の動原体局在はネガティブな制御を受けることは明らかとなったので、その制御に関わるPrc1のリン酸化部位の同定が今後の課題となった。

なぜ卵母細胞の減数分裂ではPrc1の局在が制御されるのかについても、興味深い問題と言える。1つの仮説として、減数第一分裂での動原体の構造が挙げられる。体細胞分裂においては、姉妹染色体分体上で動原体が背中合わせに形成される。減数第一分裂においては、姉妹染色体上の動原体は同じ方向を向いている。体細胞分裂と減数第一分裂では動原体の構造が上記のように異なるため、減数第一分裂ではキナーゼによってリン酸化されたPrc1が動原体に局在できる可能性がある。減数第一分裂に特異的に発現している1つの因子として、MEIKINが挙げられる。MEIKINは姉妹染色体分体の動原体の一方向性を制御していると言われている (Kim et al., 2015)。減数第一分裂に特異的なMEIKINが動原体の構造を制御することでPrc1の動原体局在を可能にすることも、1つの仮説として考えられる。

今回、マウス卵母細胞においてPrc1の動原体局在が見られたが、ヒトではPrc1の動原体局在は見られない (Yoshida et al., 2020)。マウスの卵母細胞減数第一分裂では紡錘体の二極化は核膜崩壊後 4-6 時間で見られる (Schuh and

Ellenberg, 2007)。それに対し、ヒトの卵母細胞減数第一分裂では紡錘体の二極化は核膜崩壊後 16 時間で見られる (Holubova et al., 2015)。紡錘体の二極化がヒトに比べてマウスで早いことは、Prc1 が動原体に局在することと関係する可能性がある。また、マウスよりもヒトの卵母細胞の減数分裂の方が染色体分配エラーを起こしやすいという報告もあり (Holubova et al., 2015)、マウスの減数分裂では Prc1 の動原体局在メカニズムを獲得したことによって、染色体分配エラーが少なくなったという可能性も示唆される。マウスは世代交代のスペンが短く子孫を多く残さないと繁殖できないという性質から、Prc1 の動原体局在能を獲得し、染色体分配エラーの少ない減数分裂のメカニズムを獲得したという可能性が考えられる。Prc1 の動原体局在メカニズムをさらに突き詰めることで、非中心体性に紡錘体二極化が形成されるメカニズムの理解が深まり、卵母細胞の染色体分配エラーの防止に繋がることを期待する。

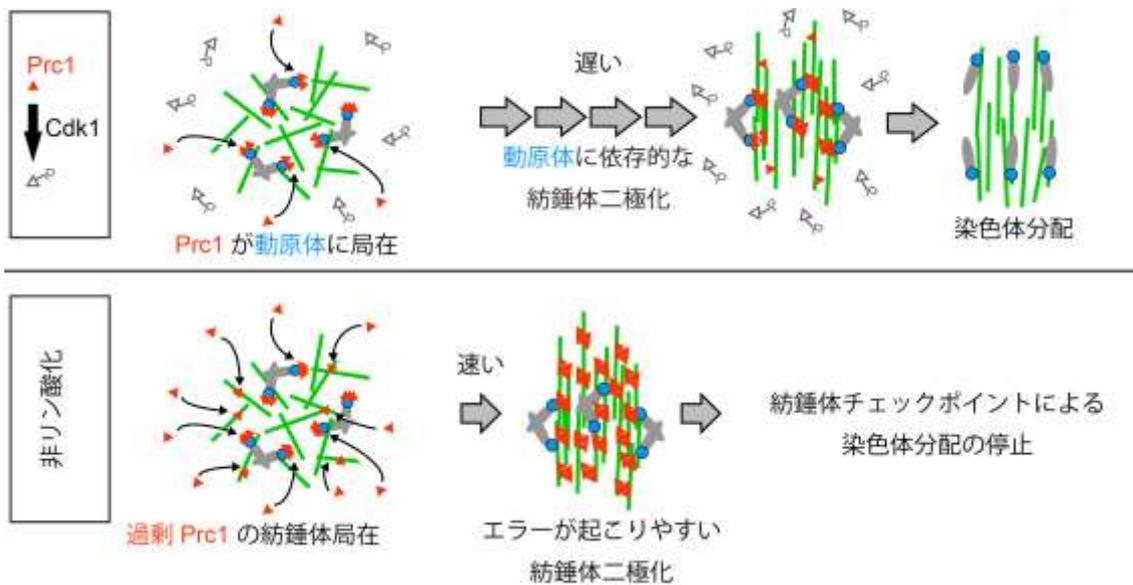


図 11 Cdk1 による Prc1 のリン酸化は紡錘体二極化のタイミングを制御する

モデル図。Prc1 は Cdk1 によってリン酸化され、動原体や紡錘体への局在が制御される。その結果、紡錘体の二極化のタイミングが調節され、染色体分配が正常に起こる。Cdk1 によって Prc1 がリン酸化されない場合、過剰に Prc1 が紡錘体に局在してしまい、紡錘体の二極化のタイミングが早くなる。その結果、染色体分配の停止が引き起こされる。

参考文献

Adams RR, Wheatley SP, Gouldsworthy AM, et al. INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr Biol.* 2000;10(17):1075-1078.

Bolton MA, Lan W, Powers SE, McClelland ML, Kuang J, Stukenberg PT. Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol Biol Cell.* 2002;13(9):3064-3077.

Breuer M, Kolano A, Kwon M, et al. HURP permits MTOC sorting for robust meiotic spindle bipolarity, similar to extra centrosome clustering in cancer cells. *J Cell Biol.* 2010;191(7):1251-1260.

Cesario J, McKim KS. RanGTP is required for meiotic spindle organization and the initiation of embryonic development in *Drosophila*. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 22):3797-3810.

Cheeseman IM, Desai A. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):33-46.

Choi T, Aoki F, Mori M, Yamashita M, Nagahama Y, Kohmoto K. Activation of p34cdc2 protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. *Development*. 1991;113(3):789-795.

Clift D, Schuh M. A three-step MTOC fragmentation mechanism facilitates bipolar spindle assembly in mouse oocytes. *Nat Commun*. 2015;6:7217.

Published 2015 Jul 6.

Colombié N, Cullen CF, Brittle AL, et al. Dual roles of Incenp crucial to the assembly of the acentrosomal metaphase spindle in female meiosis. *Development*. 2008;135(19):3239-3246.

Davydenko O, Schultz RM, Lampson MA. Increased CDK1 activity determines the timing of kinetochore-microtubule attachments in meiosis I. *J Cell Biol*. 2013;202(2):221-229.

Deng M, Suraneni P, Schultz RM, Li R. The Ran GTPase mediates chromatin signaling to control cortical polarity during polar body extrusion in mouse oocytes. *Dev Cell*. 2007;12(2):301-308.

Dumont J, Petri S, Pellegrin F, et al. A centriole- and RanGTP-independent spindle assembly pathway in meiosis I of vertebrate oocytes. *J Cell Biol.* 2007;176(3):295-305.

Dumont J, Desai A. Acentrosomal spindle assembly and chromosome segregation during oocyte meiosis. *Trends Cell Biol.* 2012;22(5):241-249.

Gavet O, Pines J. Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev Cell.* 2010;18(4):533-543.

Glotzer M. The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(1):9-20.

Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature.* 1991;349(6305):132-138.

Goshima G, Mayer M, Zhang N, Stuurman N, Vale RD. Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle. *J Cell Biol.* 2008;181(3):421-429.

Goshima G, Wollman R, Goodwin SS, et al. Genes required for mitotic spindle assembly in *Drosophila* S2 cells. *Science.* 2007;316(5823):417-421.

Gui L, Homer H. Hecl-dependent cyclin B2 stabilization regulates the G2-M transition and early prometaphase in mouse oocytes. *Dev Cell*. 2013;25(1):43-54.

Heald R, Tournebize R, Blank T, et al. Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature*. 1996;382(6590):420-425.

Holubcová Z, Blayney M, Elder K, Schuh M. Human oocytes. Error-prone chromosome-mediated spindle assembly favors chromosome segregation defects in human oocytes. *Science*. 2015;348(6239):1143-1147.

Hu CK, Ozlü N, Coughlin M, Steen JJ, Mitchison TJ. Plk1 negatively regulates PRC1 to prevent premature midzone formation before cytokinesis. *Mol Biol Cell*. 2012;23(14):2702-2711.

Kahana JA, Cleveland DW. Beyond nuclear transport. Ran-GTP as a determinant of spindle assembly. *J Cell Biol*. 1999;146(6):1205-1210.

Kalab P, Pu RT, Dasso M. The ran GTPase regulates mitotic spindle assembly. *Curr Biol*. 1999;9(9):481-484.

Kelly AE, Sampath SC, Maniar TA, Woo EM, Chait BT, Funabiki H. Chromosomal enrichment and activation of the aurora B pathway are coupled to spatially regulate spindle assembly. *Dev Cell*. 2007;12(1):31-43.

Kim J, Ishiguro K, Nambu A, Akiyoshi B, Yokobayashi S, Kagami A, Ishiguro T, Pendas AM, Takeda N, Sakakibara Y, Kitajima TS, Tanno Y, Sakuno T, Watanabe Y. Meikin is a conserved regulator of meiosis-I-specific kinetochore function. *Nature*. 2015 Jan 22;517(7535):466-71.

Mollinari C, Kleman JP, Jiang W, Schoehn G, Hunter T, Margolis RL. PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J Cell Biol*. 2002;157(7):1175-1186.

Mollinari C, Kleman JP, Saoudi Y, et al. Ablation of PRC1 by small interfering RNA demonstrates that cytokinetic abscission requires a central spindle bundle in mammalian cells, whereas completion of furrowing does not. *Mol Biol Cell*. 2005;16(3):1043-1055.

Neef R, Gruneberg U, Kopajtich R, et al. Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1. *Nat Cell Biol*. 2007;9(4):436-444.

Petry S, Pugieux C, Nédélec FJ, Vale RD. Augmin promotes meiotic spindle formation and bipolarity in *Xenopus* egg extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(35):14473–14478.

Polanski Z, Ledan E, Brunet S, et al. Cyclin synthesis controls the progression of meiotic maturation in mouse oocytes. *Development*. 1998;125(24):4989–4997.

Sampath SC, Ohi R, Leismann O, Salic A, Pozniakovski A, Funabiki H. The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell*. 2004;118(2):187–202.

Sánchez-Huertas C, Lüders J. The augmin connection in the geometry of microtubule networks. *Curr Biol*. 2015;25(7):R294–R299.

Schuh M, Ellenberg J. Self-organization of MTOCs replaces centrosome function during acentrosomal spindle assembly in live mouse oocytes. *Cell*. 2007;130(3):484–498.

Solc P, Kitajima TS, Yoshida S, et al. Multiple requirements of PLK1 during mouse oocyte maturation. *PLoS One*. 2015;10(2):e0116783. Published 2015 Feb 6.

Tanenbaum ME, Gilbert LA, Qi LS, Weissman JS, Vale RD. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*. 2014;159(3):635–646.

Tanenbaum ME, Medema RH. Mechanisms of centrosome separation and bipolar spindle assembly. *Dev Cell*. 2010;19(6):797–806.

Walczak CE, Vernos I, Mitchison TJ, Karsenti E, Heald R. A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity. *Curr Biol*. 1998;8(16):903–913.

Yoshida S, Nishiyama S, Lister L, et al. Prc1-rich kinetochores are required for error-free acentrosomal spindle bipolarization during meiosis I in mouse oocytes. *Nat Commun*. 2020;11(1):2652. Published 2020 May 27.

謝辞

本研究の全般にわたり懇切な指導を頂いた京都大学大学院生命科学研究科高次生命科学分子病態学分野教授 北島智也教授に心より感謝申し上げます。指導役として終始丁寧なご指導を頂いた理化学研究所の吉田周平博士、解析方法を丁寧に細部に渡りご教授頂きました日本学術振興会特別研究員の三品達平博士、数多くの有益な助言および実験技術の指導を頂きました理化学研究所染色体分配研究チームの皆様、心よりお礼を申し上げます。理化学研究所大学院生リサーチアソシエイトに採用して頂き、研究をサポートして下さった理化学研究所の皆様に感謝致します。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Sui Nishiyama, Shuhei Yoshida, and Tomoya Kitajima

Cdk1 negatively regulates the spindle localization of Prcl in mouse oocytes

Genes to Cells. 2020. doi: 10.1111/gtc.12803