

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02353

研究課題名(和文) 哺乳類減数分裂における相同染色体間の結合を確立する仕組み

研究課題名(英文) Mechanism for establishing connections between homologous chromosomes in mammalian meiosis

研究代表者

李 智博 (Lee, Jibak)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：50372660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本申請課題では、減数分裂特異的に発現するコヒーシンサブユニットRAD21LとREC8を3×FLAタグ付きで発現する2系統のノックインマウスを作製した。タグに対する抗体を用いたウェスタンブロット解析により、精母細胞におけるRAD21LとREC8の発現量比とコヒーシンの絶対量を明らかにした。また、野生型とノックインマウスの精巣抽出液を材料に、免疫沈降法と質量分析により、RAD21LとREC8のそれぞれに相互作用している分子を同定した。その中には、これまで体細胞型コヒーシンとの相互作用が報告されている分子の他に、減数分裂型コヒーシンとだけ相互作用している考えられる新規のタンパク質も含まれていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の減数分裂におけるコヒーシンの解析は、免疫組織染色法による局在やノックアウトマウスを利用した生体内機能解析が進む一方で、細胞内の発現量や個々のコヒーシンの生化学的解析は遅れていた。本研究では、マウス精母細胞でコヒーシンの発現量を初めて明らかにした。卵母細胞では、コヒーシン量の減少が母体の加齢に伴う染色体異常の原因の一つと考えられているので、本研究はそれを今後調べる上で重要な基礎的知見と今後の研究資料を提供している。また、減数分裂で発現する種類の異なるコヒーシンがどのような分子と相互作用しているかを明らかにすることにより、役割分担の理解も進むと思われる。

研究成果の概要(英文)：In this project, we made two lines of knock-in mice that express meiosis-specific cohesin subunit, RAD21L or REC8, tagged with 3×FLAG. We determined the expression ratio of RAD21L and REC8 and the absolute amount of cohesins in a mouse spermatocyte by western blot analysis with anti-3×FLAG antibody. Furthermore, we sought to identify RAD21L- and REC8-associated proteins by MS/MS analysis following immunoprecipitation using testes extracts from wild-type (control) and knock-in mice. As a result, besides the proteins that are known to associate with mitotic cohesin, a novel protein whose interaction with cohesin has never known was found in the immunoprecipitates.

研究分野：生殖生物学

キーワード：減数分裂 コヒーシン 精母細胞 相同染色体 対合

### 1. 研究開始当初の背景

減数分裂は、配偶子形成過程における染色体数の半減と遺伝的多様性の増大を担う特殊な分裂であり、体細胞分裂とは染色体の振る舞いが異なる。その決定的な違いは、体細胞分裂では姉妹染色分体が分離するのに対し、減数分裂ではその第一分裂で相同染色体が分離するという点である(図1)。近年の研究により、染色体の接着は、コヒーシンによって担われ、コヒーシンが染色体からはずれると染色体が分離することがわかってきた。コヒーシンは4つのサブユニットからなるタンパク質複合体で、減数分裂においては、幾つかの特異的なサブユニットが発現する(図2)。しかし、体細胞分裂、減数分裂に関わらず、コヒーシンの機能は根本的に同じ(姉妹染色分体の接着)で、その制御が異なるために染色体の分離様式が異なるのである。つまり、第一減数分裂後期には染色体腕部のコヒーシンだけが分解されることで相同染色体の分離が起こる(この時セントロメア部分のコヒーシンが残ることによって、姉妹染色分体間の接着は維持される)(図1)。それでは何故、いくつもの減数分裂特異的サブユニットが発現する必要があるのだろうか？それら特異的サブユニットは、体細胞分裂では起こらない減数分裂に特有のイベント(相同染色体の対合と組換え)において、姉妹染色分体の接着以外の特別な機能を有する可能性がある。

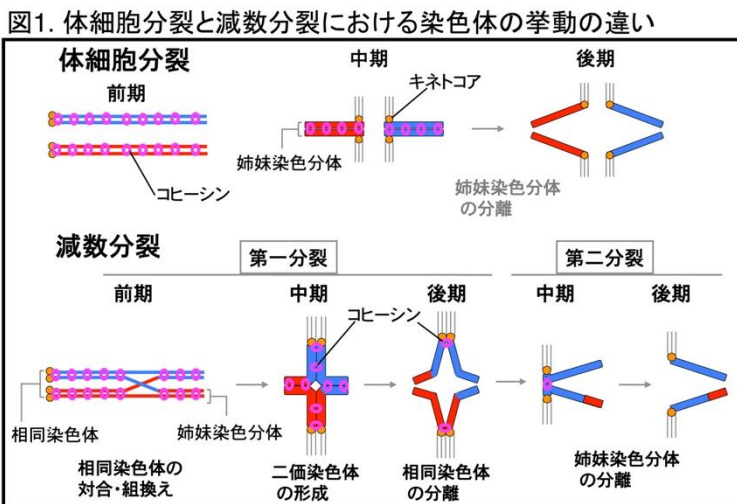
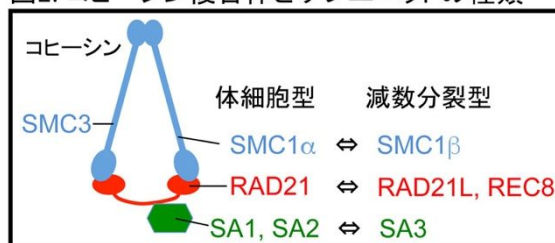


図1. 体細胞分裂と減数分裂における染色体の挙動の違い

図2. コヒーシン複合体とサブユニットの種類



### 2. 研究の目的

本研究では、RAD21L あるいは REC8 を含む2種類のコヒーシンの形状、ゲノムワイドな局在、相互作用分子、細胞内機能と制御における特異性を調べることによって、相同染色体間の結合の確立過程において異種のコヒーシンがどのように関与するかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 3×FLAG タグ付 RAD21L および REC8 のノックインマウスの作製

RAD21L と REC8 の2つのコヒーシンサブユニットに3×FLAG タグが付加された状態で発現するノックインマウスの作製は、連携研究者の堀居(群馬大学)の協力のもと行った。既報(Yoshimi et al, 2016)を参考に、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を利用して Stop コドン近辺に二本鎖切断を誘導し、ssODN(一本鎖のオリゴ DNA)により3×FLAG タグをゲノム上の目的の位置にノックインする。作製したノックインマウスは、以下の実験に使用した。

#### (2) 減数分裂型コヒーシンの形状解析

電子顕微鏡を用いた形状解析により、体細胞型のコヒーシンはリング状の形状をとることが示されている。それにより、そのリングの中に2本のDNA分子を抱え込むことによって姉妹染色分体を接着することが想定されている。しかし、減数分裂型コヒーシンの形状は調べられていないため、作製したノックインマウスを材料に、免疫沈降法と、Heparin カラム、ゲル濾過カラムを用いて、コヒーシン複合体の精製し、精製したタンパク質の電子顕微鏡による観察を試みた。

#### (3) 減数分裂型コヒーシンのゲノムワイドな局在解析

全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス法(ChIP-Seq)により、RAD21L と REC8 のゲノム上の集積場所を特定することを試みた。

#### (4) 減数分裂型コヒーシと相互作用するタンパク質の探索

2系統のノックインマウスの精巣抽出液と野生型マウスの精巣抽出液(対照区)を用いて,抗FKAG抗体による免疫沈降を行い,その免疫沈降物を質量分析計にかけて,RAD21LとREC8の相互作用分子に違いがあるかを調べた。

(5)14.5日齢の2系統のノックインマウスの抽出液を材料に抗3×FLAG抗体を用いたウェスタンブロット解析により,第一減数分裂初期の精母細胞におけるRAD21LとREC8の発現量を調べた。

#### 4. 研究成果

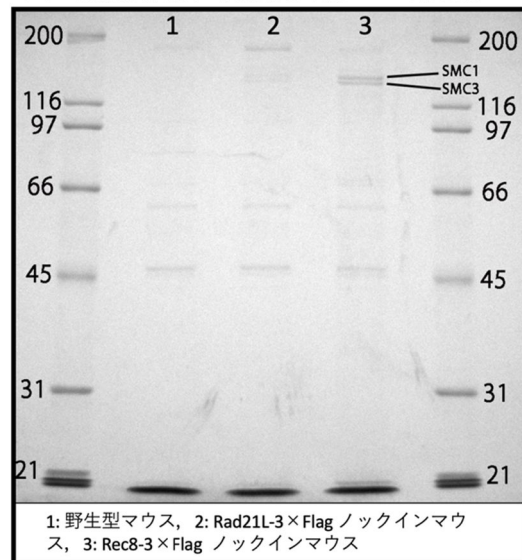
(1)ゲノム編集により計画通りに*Rad21L-3×Flag*ノックインマウスと*Rec8-3×Flag*ノックインマウスを作製できた。作製された2系統のノックインマウスは,どちらも完全な生殖能力を持ち,タンパク質の発現や局在も通常の野生型マウスと変わらないことから,3×FLAGタグの付加により,タンパク質の機能や発現様式に影響は無いと考えられる。また,RAD21L,REC8ともに,それぞれに特異的な抗体を用いた免疫沈降よりも,anti-FLAG抗体を用いた免疫沈降の方が,効率良くコヒーシ複合体として回収できることがわかった。

(2)2系統のノックインマウス由来の精巣抽出液から,抗FLAG抗体による免疫沈降を行い,3×FLAGペプチドにより効率良くコヒーシ複合体を回収できた。また,Heparinカラムやゲル濾過カラムにより,精巣抽出液からコヒーシ複合体リッチな分画を得ることもできたが,免疫沈降法と組み合わせた時に,溶出時の条件がうまく合わなかったため,高純度のコヒーシ複合体の精製はできず,電子顕微鏡による形状解析には至らなかった。

(3)ChIP-Seq用のサンプルを調整し,解析を試みたが,良い結果を得られなかった。ペプチド添加による免疫沈降物の溶出が適さなかったと考えられる。

(4)2系統のノックインマウスと野生型マウスの精巣抽出液を用いて,抗FLAG抗体を用いた免疫沈降を行い,電気泳動後にタンパク質のゲル内消化を行い,相互作用分子を質量分析で調べた。免疫沈降物のCBB染色像を図3に示す。RAD21LとREC8に結合するタンパク質として,コヒーシの他のサブユニットであるSMC1 $\alpha$ , SMC1 $\beta$ , STAG3,体細胞型コヒーシの制御因子としても知られている分子,PDS5A, PDS5B, NIPBL, WAPL,シナプトネマ複合体構成因子であるSYCP1, SYCP2, SYCP3などを同定できたが,それらタンパク質のRAD21LとREC8に対する結合比には違いが見られた。このうち,SMC1 $\alpha$ については,これまでの研究でREC8に特異的な抗体を用いた場合に共免疫沈降されることはなかったが,本研究ではタグに対する抗体を使用したため,免疫沈降過程でSMC1 $\alpha$ との相互作用が阻害されずに,うまく複合体として回収できたと考えられた。また,コヒーシと相互作用する新規なタンパク質も複数検出されたため,今後これらのタンパク質とコヒーシとの相互作用を*in vitro*の実験系で確かめ,論文として報告したい。

図3. 精巣抽出液の免疫沈降物のCBB染色像



(5)標準サンプルとして濃度既知の3×FLAGタグ付きタンパク質を用意し,2系統のマウスの精巣抽出液中のREC8-3×FLAGとRAD21L-3×FLAGをウェスタンブロットで解析することにより,2つのタンパク質の発現量比と減数分裂細胞におけるコヒーシの絶対量を明らかにした。RAD21LとREC8は,第一減数分裂の初期には,同程度の発現量を示し,両方のコヒーシを合わせた発現量は,体細胞において報告されているものより多いことがわかった。

今後の展望として,本研究で作製したノックインマウスを材料に,RAD21LとREC8をそれぞれ含む2種類のコヒーシ複合体を高純度で精製できれば,コヒーシの形状解析や*in vitro*でのDNAとの相互作用解析により,2つのコヒーシがどのような機能して減数分裂の染色体動態に関わるかについてより理解が進むと考えられる。また,本申請課題では精母細胞におけるコヒーシ量を明らかにしたが,ヒトを含む哺乳動物では,母体の加齢に伴う卵母細胞の染色体異常率の上昇と卵母細胞内のコヒーシ量の減少が関係すると考えられているため,今後の研究により卵母細胞内のコヒーシ量も明らかになれば,その因果関係の理解も進むと期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Lee J.	4. 巻 19
2. 論文標題 Is age-related increase of chromosome segregation errors in mammalian oocytes caused by cohesin deterioration?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reprod Med Biol	6. 最初と最後の頁 32-41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12299	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Lee J.
2. 発表標題 How do different cohesins contribute to the connection between homologs in mammalian meiosis?
3. 学会等名 IPR international seminar on “Genome stability and instability in mitotic and meiotic cells”（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 李 智博, 魏 興強, 堀居 拓郎, 畑田 出穂
2. 発表標題 マウス精母細胞における減数分裂特異的コヒーシンの解析
3. 学会等名 第51回精子研究会・神戸大学先端融合研究環研究プロジェクト（開拓09-神戸大学発次世代農資源生産システム）共催講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	平谷 伊智朗 (Hiratani Ichiro) (40583753)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー  (82401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	堀居 拓郎  (Horii Takuro)  (00361387)	群馬大学・生体調節研究所・助教    (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関