

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19248

研究課題名（和文）体細胞におけるコヒーシンの異所性発現による減数分裂模倣系の構築

研究課題名（英文）Construction of a meiotic mimic system by ectopic expression of cohesin in somatic cells

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、減数分裂特異的コヒーシンサブユニットを体細胞において薬剤誘導により異所性発現させる系の開発を目指した。その結果、導入した4つの減数分裂特異的遺伝子のうち2つの異所性発現が確認できたが、残り2つについてはタンパク質の発現が確認できなかった。また、減数分裂特異的コヒーシンRAD21LとREC8の細胞内の発現量を調べ、第一減数分裂前期の前半まではほぼ等量存在し、両方を合わせると既報の体細胞のコヒーシンの発現量よりも多いことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

減数分裂特異的コヒーシンの機能を解析するためには生殖細胞が必要であるが、体細胞で発現系を構築すれば生殖細胞を採取するために使用する実験動物の数を減らすことができる。本研究ではその系の構築までには至らなかったが、部分的に進めることができた。また、これまで減数分裂細胞にコヒーシン分子がどの程度存在するかわかっていなかったが、RAD21L型とREC8型の2種類のコヒーシンが減数分裂の初期の時期にはほぼ等量存在し、合わせると体細胞よりも量的には多いことがわかった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a drug-inducible ectopic expression system for meiosis-specific cohesin subunits in somatic cells. We introduced four meiosis-specific genes into somatic cells, but we could not detect the ectopic expression of two of the four genes at the protein level. In addition, we investigated the intracellular expression levels of meiosis-specific cohesin subunits, RAD21L and REC8, and found that they were present in approximately equal amounts up to the early stages of meiotic prophase I, and that the total expression level of both molecules was higher than the expression levels of cohesin in somatic cells previously reported.

研究分野：動物生命科学

キーワード：減数分裂 生殖細胞 コヒーシン 体細胞

1. 研究開始当初の背景

減数分裂は生殖細胞だけが行う特殊な分裂であり、配偶子の染色体の半数化と遺伝的多様性の増大という生物学的意義を持つ。そのため、体細胞分裂とは異なり、減数分裂では DNA 複製期 (S 期) の後に 2 回の分裂期 (M 期) が続き、特に第一減数分裂では染色体は特徴的な動きを示す。すなわち、相同染色体どうしが交差を伴う組換えにより連結して二価染色体を形成し、相同染色体の分離が起こる (図 1)。相同染色体がどのようにしてお互いを認識し結合を確立するか、その詳細な分子機構はまだ解明されていないが、近年の研究により、コヒーシンと呼ばれるタンパク質複合体が関わることを示されている。体細胞分裂で、コヒーシンは姉妹染色分体の接着を担うが、減数分裂では、コヒーシンサブユニットのいくつかの特異的なものに置き換わり (図 2)、そのことが相同染色体の対合・組換えに必須であることがわかってきた。申請者は、コヒーシンサブユニット RAD21 の減数分裂特異的パラログ REC8 と RAD21L について哺乳類で初めて調べ、REC8 が減数分裂を通して発現するのに対し、RAD21L の発現は相同染色体の結合が確立される時期に限られることを見出した (Lee et al 2003; Lee and Hirano, 2011)。さらに RAD21L を体細胞に異所的に発現させると、間期の核内で相同染色体間の距離が縮まることを発見した (Rong et al, 2017)。

図1. 第一減数分裂における染色体動態とコヒーシン

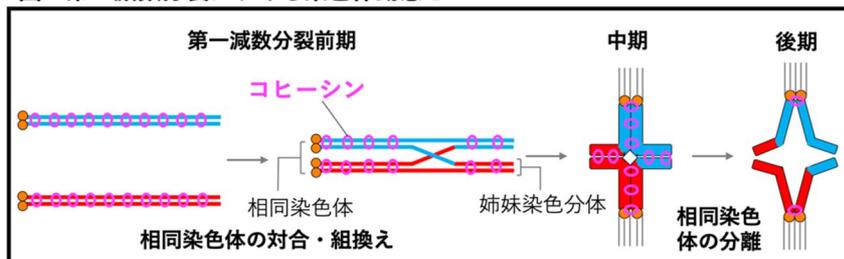
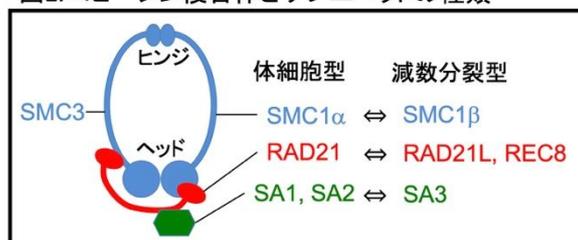


図2. コヒーシン複合体とサブユニットの種類



2. 研究の目的

将来的な革新的繁殖技術の創出 (体細胞の半数体化) を見据えて、まずは体細胞において減数分裂特異的な遺伝子を導入することにより相同染色体の連結を促す減数分裂模倣系の構築を目的とする。

3. 研究の方法

実験 1: RAD21L 安定発現細胞株の樹立

発現プラスミドの NIH3T3 細胞 (マウス胎児線維芽細胞) へのトランスフェクションにより、一過性に RAD21L を発現させると、間期の核内における相同染色体間の距離が短くなることを FISH 法により確認できたが、M 期での影響は確認できていない。その原因として、トランスフェクション効率の低さのために RAD21L を発現している M 期細胞を見つけにくいこと、RAD21L が M 期までに分解されてしまう可能性、異所性発現による毒性のために M 期までに細胞が死滅してしまう可能性が挙げられる。そのため、本申請課題では、薬剤誘導による RAD21L の安定発現細胞株を樹立し、その影響を調べる。Tet-On システムを利用して、市販の NIH3T3 Tet-On 3G Cell Line に、Rad21L cDNA を挿入した pTRE3G-ZsGreen1 ベクターを導入し、ドキシサイクリン (Dox) 添加による RAD21L と緑色蛍光タンパク質 (GFP) の発現誘導を行う。RAD21L と同時に GFP を発現するプラスミドを用いることにより、GFP 陽性の M 期細胞を観察することで、RAD21L が M 期前に消失しているのか、あるいは異所性発現による毒性のために RAD21L 発現細胞は M 期前に死滅してしまうのかを判別できる。GFP 陽性の M 期細胞が見られる場合は、RAD21L の有無と染色体の形状と動態 (相同染色体の結合状態) を調べる。

実験 2: RAD21L 相互作用タンパク質の同定

RAD21L 単独の異所性発現により、安定的に相同染色体が連結される可能性は低い。そこで、RAD21L と結合するタンパク質を同時に異所性発現させれば、その生体内機能を補完できると思われる。当研究室所有の RAD21L を 3×FLAG タグ付きで発現するノックイン (KI) マウスを使用し、その精巣抽出液から抗 FLAG 抗体による免疫沈降と質量分析により、RAD21L 相互作用タンパク質を同定し、実験 3 の共発現の候補とする。

実験 3: 体細胞におけるコヒーシン相互作用タンパク質の共発現

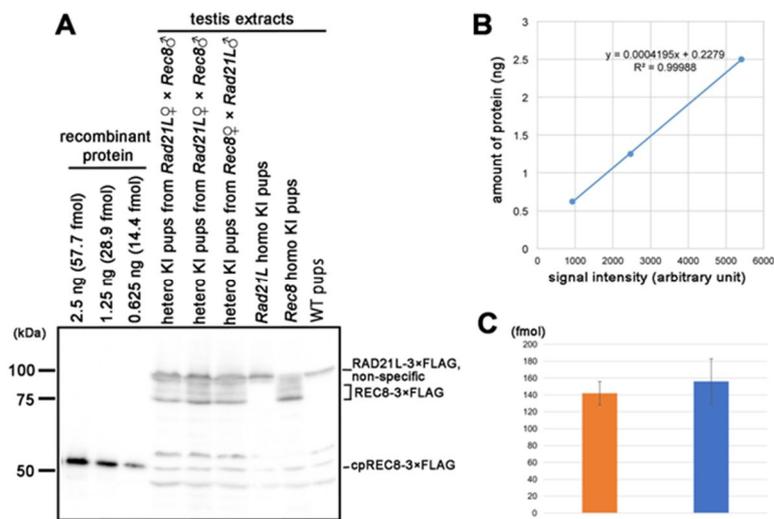
実験2で同定したタンパク質や既知の減数分裂特異的タンパク質のRAD21Lとの共発現を試みる。また、RAD21Lと同様に減数分裂特異的なコヒーシサブユニットであるREC8は、体細胞で発現させた時には別のサブユニットSA3が核内局在に必要なため、REC8とSA3の安定発現株も同様に作製し、相同染色体の結合が起こるかを調べる。

実験4：生殖細胞におけるコヒーシサブユニットの発現量の測定

RAD21LとREC8の2種類のコヒーシサブユニットが生殖細胞内にどの程度存在しているかは明らかとなっていない。本実験ではウェスタンブロット法により、RAD21LとREC8の3×FLAGノックインマウスの精巣内のタンパク質のバンドを既知濃度の3×FLAGタグ組換えタンパク質のバンドのシグナル強度と比較することにより定量できる。同時に精巣内に存在する減数分裂細胞の数を調べることにより、細胞内のタンパク質発現量を計算する。

4. 研究成果

(1) 上述の2系統の2週齢のノックインマウスの精巣抽出液を用いて、RAD21L-3×FLAGとREC8-3×FLAGの発現量を、3×FLAGタグ組換えタンパク質をスタンダードとして、FLAGタグに対する抗体でウェスタンブロット法により調べた結果、第一減数分裂の前半まではRAD21LとREC8はほぼ等量発現しており、両方を合わせると、既報の体細胞のコヒーシンの発現量より一細胞あたりの発現量が多いことが明らかとなった（下図A:組換えタンパク質と精巣抽出液中のRAD21L-3×FLAGとREC8-3×FLAGのウェスタンブロット解析、B:検量線、C:精巣1個当たりのタンパク質含有量）。この発見により、遺伝学的手法により示唆されているRAD21LとREC8の機能差は、そのタンパク質の発現量の差に起因するものではなく、各タンパク質の持つ特性に起因すると考えられる。また、減数分裂過程の染色体動態の制御に、体細胞と比較して細胞内のコヒーシ量が多いことが影響を与える可能性が示唆された。



(2) ノックインマウスの精巣抽出液から免疫沈降法に精製したコヒーシ複合体と相互作用するタンパク質を質量分析法により調べた結果、体細胞型のコヒーシと相互作用することがわかっている分子 (PDS5A/B, WAPL, NIPBL) や、シナプトネマ複合体の構成分子 (SYCP2, SYCP3) は同定できたが、その他に相互作用する分子は同定できなかった。そのため、本研究でRAD21Lの他に細胞に導入する遺伝子としては減数分裂特異的コヒーシサブユニットのみとした。

(3) Rad21L-cDNAをクローニングしたpTRE3G-ZsGreen1を細胞に導入し、薬剤(ドキシサイクリン)誘導性の安定発現細胞株を複数採取し、RAD21LとZsGreenのシグナルを免疫蛍光染色法により調べたところ、RAD21LとZsGreen(緑色蛍光)の発現が誘起されることが確認できた。そこで緑色蛍光を発するM期細胞を観察したが、明確な染色体異常は観察されなかった。しかし、薬剤誘導によるタンパク質発現の割合が100%ではなく、株化した細胞コロニーを採取する際に他の細胞が混ざってしまい、うまくクローン化できなかったことも考えられるため、今後クローン化した細胞で分裂期細胞の染色体異常について再検討する必要がある。

(4) 複数の減数分裂型コヒーシサブユニットを同時に発現するために、pTRE3G-IRESベクターにcDNAを挿入した。しかし、購入したcDNAをシーケンス解析で調べたところ変異が多数見つかったため、まずその変異をポイントミューテーションにより修正することから始めなければならず、予想外の時間と労力を割く必要があった。最終的には、Stag3遺伝子の6箇所を修正した後、REC8, RAD21, STAG3, SMC1βの4つの遺伝子を2つのpTRE3G-IRESベクターに挿入して、同時に細胞に導入することにより、4遺伝子の発現細胞株の樹立を試みた。得られた細胞株で薬剤誘導によるタンパク質の発現をウェスタンブロット法により調べた結果、RAD21LとREC8の発現は検出できたが、他の2つのタンパク質の発現は検出できなかった。IRESの下流に挿入された遺伝子はプロモーター直後の遺伝子と比較して発現量が極端に低くなることあるとの報告もあるため、それがSMC1βとSTAG3の発現が検出できなかった原因ではないかと考えられる。

得られた細胞株のうちまだ遺伝子発現を知られていないものもあるため、それらの検査を引き続き行う。また、2つの減数分裂特定遺伝子の発現は確認できたので、残りの2つの遺伝

子をそれぞれ単独で発現するベクターを2つ構築し、それらをこの樹立済みの細胞株に導入することで、薬剤誘導による4つの減数分裂特異的コヒーシサブユニットの安定発現細胞株を樹立できる可能性が高いと考えられる。

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 TANIUCHI Yuto, HIRAIDE Kazutaka, SU Rilige, IJUIN Kazune, WEI XingQiang, HORII Takuro, HATADA Izuhō, LEE Jibak	4. 巻 69
2. 論文標題 Analysis of absolute amounts of two meiotic cohesin subunits, RAD21L and REC8, in mouse spermatocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 78 ~ 86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2022-075	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平出一鷹, 谷内悠人, スルリグ, 伊集院和音, 堀居拓郎, 畑田出穂, 李智博
2. 発表標題 マウス精母細胞における減数分裂特異的のコヒーシンサブユニットRAD21LとREC8の発現量の解析
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------