

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 1 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340031

研究課題名(和文)生殖幹細胞における放射線・化学物質に対するゲノム安定性分子機構の解明

研究課題名(英文) genome stability in germ-line stem cells to irradiation and exposure to chemicals

研究代表者

川崎 勝己 (kawasaki, katsumi)

摂南大学・理工学部・教授

研究者番号：60177665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：RecQヘリカーゼファミリーのひとつであるRecQ5は、DNAの傷を直す時やDNAの絡まりをほく時やDNAからRNAへの転写が行われる時など様々なDNAでの反応過程に関与してゲノム安定性を維持しているらしい。ヒトではRecQ5は普遍的に発現しているが、特に精巣で発現しているという報告がある。しかし、精巣のどの細胞に発現しているかやどのように機能しているかは不明である。そこで私たちはRecQ5がショウジョウバエ精巣での発現に関して解析し、ショウジョウバエRecQ5の機能について明らかにした。

研究成果の概要(英文)： We analyzed the expression of RecQ5 in *Drosophila* testes. The RecQ5 protein was specifically expressed in germline cells in larval, pupal, and adult testes. *Drosophila* RecQ5 was localized in nuclei of male germline stem cells, spermatogoniablasts, spermatogonia, and early spermatocytes. As growth of the early spermatocyte proceeded, the amount of RecQ5 increased in the nuclei. However, before maturation of the spermatocyte, the level of RecQ5 declined. Thus, RecQ5 expression was regulated. Furthermore, we compared recq5 mutant testes with the wild-type ones. The most conspicuous alterations were swelling of the apical region of and an increase in the number of spermatocytes in the recq5 testis, suggesting a relative accumulation of spermatocytes in the recq5 mutant testes. Therefore, *Drosophila* RecQ5 may contribute to the proper progression from germline stem cells to spermatocytes for maintenance of genome stability.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNAヘリカーゼ 生殖幹細胞 放射線 化学物質 ゲノム安定性 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

地震における破壊や原子力発電所事故は放射線や化学物質の影響が身近に起こることを認識させた。放射線や化学物質が次世代にどのような影響を及ぼすかについては不安が残る。少子化・晩婚化が進む中で子孫にこのような影響が及ばないことが望まれる。次世代への影響を考えると、生殖細胞におけるゲノム安定性は重要である。

生殖細胞系列、とりわけ生殖幹細胞に変異が導入されると、生殖可能期間を通して、影響を受けた生殖細胞が作り続けられる可能性がある。雄性生殖幹細胞は生殖可能期間(ヒトの場合、約40年間)にわたって存在する。それゆえ、他の精子形成時期の細胞(精子形成にかかる期間は約75日間)よりも200倍以上の危険が生殖幹細胞に蓄積する。生殖幹細胞に変異が導入されると変異生殖幹細胞が生み出され自己複製する。さらに生殖幹細胞に変異導入がくりかえされると、変異が蓄積していくことになる。そして、変異が蓄積した生殖幹細胞は変異した生殖細胞を生み続ける。結果として、配偶子ができない、あるいは受精できない配偶子を作り出し、不妊となる。もしくは変異を持ったまま受精が行われ発生していくと発生異常となるなどの可能性がある。したがって、生殖幹細胞におけるゲノム安定性は重要であると考えられる。しかしながら、生殖幹細胞における放射線・化学物質の影響、および生殖幹細胞におけるゲノム安定性の分子機構について、国内・国外での研究は少なく、よくわかっていない。

2. 研究の目的

生殖幹細胞において、どのような放射線・化学物質が影響するかについてはよくわかっていないし、放射線・化学物質に対し生殖幹細胞がどのように応答するかについても不明である。私たちが研究している RecQ5 はゲノム安定性維持に関わり、生殖幹細胞で特異的に発現していることがわかった。本研究は環境からのストレス(放射線・化学物質)の生殖幹細胞への影響を解析し、RecQ5 を切り口に生殖幹細胞での放射線・化学物質に対するゲノム安定性の分子機構を明らかにすることを目的とする。

RecQ5 は良く保存された RecQ DNA ヘリカーゼであり(Jeong et al (2000) Mol. Gen. Genet. 263, 183-193, Kawasaki et al (2002) Nucleic Acids Res. 30, 3682-3691)、ヒトでは他に RecQL1, BLM, WRN, RTS、と4種あり、後者の3つはそれぞれの変異がブルーム症候群、ワーナー症候群、ロスメント・トムソン症候群の原因となる。これら3種の変異に共通するのは、ガンになりやすくゲノムが不安定になることである。したがって、RecQ ファミリーはゲノム安定性維持に関わ

ると考えられている。一方で、RecQ5 については変異と遺伝性疾患の関係はあきらかでなく、RecQ5 の機能の詳細は不明である。ただ、RecQ5 ノックアウトマウスはガンになりやすく、私たちがつくった RecQ5 欠失八エは染色体異常を引き起こした。RecQ5 は初期胚および卵で強く発現している。遡って卵巣内での発現を調べると、RecQ5 は雌性生殖幹細胞に特異的に発現していた。さらに精巣においても、雄性生殖幹細胞で RecQ5 が特異的に発現していることがわかった。

RecQ5 が特異的に発現している生殖幹細胞における RecQ5 の機能については不明であり、これを明らかにしていくことが生殖幹細胞での放射線・化学物質に対するゲノム安定性の分子機構につながると考える。

3. 研究の方法

放射線・化学物質の種類や量(強さ)により、RecQ5 量や局在が生殖幹細胞でどのように変化するかを共焦点蛍光顕微鏡を用いて調べた。RecQ5 を指標に生殖幹細胞に影響を与える放射線・化学物質を特定し、そこから想定されるゲノムストレスのタイプにより、生殖幹細胞におけるゲノムストレス応答の経路を絞り込んだ。絞り込んだ応答経路の結果に基づき、RecQ5 欠損生殖幹細胞において、ゲノム安定性維持タンパク質の動態を調べる。RecQ5 変異体へ放射線照射および化学物質投与をし、マーカーを用いて変異の種類や頻度の計測した。また、精巣・卵巣の形態、形成過程、不完全な精子・卵子、ガン化などを野生型と RecQ5 変異型を比較して調べた。さらに、アポトーシス、幹細胞の更新について解析し、生殖幹細胞での放射線・化学物質に対するゲノム安定性の分子機構を明らかにした。

(1) EGFP-RecQ5 タンパク質の生殖幹細胞および生殖細胞系列での空間的・時間的変化

転写制御領域下流に位置させた EGFP-RecQ5 タンパク質(q5p-egfp-recq5 1))を用いて、生殖幹細胞に特異的に最も高く発現する時期を探した。EGFP-RecQ5 タンパク質が生殖細胞系列の核内局在が空間的変化するか、分化過程の中で時間的変化するかどうかを共焦点蛍光顕微鏡により調べ、次の実験を行う際の至適条件を決めた。

(2) 生殖幹細胞および生殖細胞系列における環境からのストレスの影響

RecQ5 はシヨウジョウバエ培養細胞において、シスプラチン(DNA 架橋性白金抗がん剤)、MMS(DNA アルキル化剤)に応答し誘導がかかる(Nakayama et al (2006) FEBS Lett. 580, 6938-6942)。また、RecQ5 欠損個体はシスプラチン感受性であり、RecQ5 は DNA 修復に関わるヘリカーゼである(Kawasaki et al

(2002) Nucleic Acids Res. 30, 3682-3691, Nakayama et al (2004) DNA Repair 3, 369-378)。環境物質の生殖幹細胞への影響は生態系の保護からも重要与えるこれらにより、RecQ5 を指標に生殖幹細胞に影響を与える放射線・化学物質の種類や量(強さ)を検討した。また、それらから想定されるゲノムストレスのタイプにより、生殖幹細胞におけるゲノムストレス応答の経路を検討した。

(3) 生殖幹細胞におけるゲノム安定性維持タンパク質の挙動

生殖幹細胞についてはゲノム安定性維持に関わるタンパク質について報告がほとんどない。網羅的ハエ遺伝子発現解析プロジェクト(modENCODE)により、RecQ5 とともにいくつかのゲノム安定性維持に関わる遺伝子が生殖幹細胞で特異的に発現していることがわかった。これらの中でポリ ADP リボースポリメラーゼ (PARP) について抗体を供与していただき解析した。また、RecQ5 と共局在するゲノム安定性維持タンパク質を探し、次の RecQ5 欠損個体での実験の解析対象を検討した。

4. 研究成果

(1) RecQ5 タンパク質の挙動を可視化する為に enhanced green fluorescent protein (EGFP) を融合した RecQ5 を発現するトランスジェニックハエを用いて、精巣での EGFP-RecQ5 の局在を共焦点顕微鏡により観察した。RecQ5 は精巣において、生殖幹細胞、精原細胞、未熟な第一精母細胞の核に特異的に局在し、それ以外の生殖細胞や体細胞にはみられなかった。

(2) 次に、recq5 欠損精巣と正常精巣とを比較した。その結果、recq5 欠損精巣では、先端部の肥大が有意にみられた。

(3) recq5 欠損精巣では、成熟した第一精母細胞の蓄積がみられた。

(4) recq5 欠損精巣内には、正常精巣内とくらべて位相差像で区別できる構造物 (cystic bulge および waste bag) が多く観察され、かつ発達していた。また、活性型カスパーゼを含む顆粒状の構造物も同様の傾向を示した。カスパーゼが活性がされている可能性が高い。

(5) 正常精巣内とくらべて、精細胞から精子への細胞骨格再編を示す構造物 elongation cone が recq5 欠損精巣内には、多く観察された。

(6) recq5 欠損精巣内でも精細胞から精子への伸長自体は正常精巣と同様に起きてい

るようであった。また、recq5 欠損株が生殖に問題がないことも正常な精子形成産出を支持する。

ショウジョウバエ RecQ5 が雄性生殖細胞、精原細胞、未熟な第一精母細胞の核に局在し、recq5 欠損精巣でこれらの細胞から成熟した第一精母細胞の蓄積がみられたことや精子形成過程途中の中間体として生じる構造物 (elongation cone, cystic bulge および waste bag) がより高頻度で観察されたことは recq5 欠損精巣において精子形成の分化は進行しているものの不適切な精子が確率的に生じている可能性や開始から終了までのどこかで精子形成の分化進行過程がゆっくりとなっている可能性、また確率的に生じるかもしれない不適切な精子を排除するような過程が活性化している可能性などがある。以上のことから、RecQ5 は精巣において正常な精子形成の分化進行に重要であると考えている。

一方で、当初予想したようには RecQ5 欠損精巣において不完全な精子が産出されていないようである。これは不完全な精子あるいはその前駆体を排除するようなシステムが働いていることを示唆する。結果として完全な精子が生産放出されている。ゲノム安定性を維持するシステムは、機能的に完全な精子の品質を保証するシステムと関連して働いていると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

川崎勝己 Response for DNA damage in *Drosophila melanogaster* Raidiation Biology Center Annual Report 2015-16 (2016) 12. 査読無

川崎勝己 ショウジョウバエにおけるゲノムストレス応答機構の研究 放射線生物研究センター年報 (2014) 31-2. 査読無

Sakurai H, Takai S, Kawamura K, Ogura Y, Yoshioka Y, Kawasaki K. "Drosophila RecQ5 is involved in proper progression of early spermatogenesis." *Biochem Biophys Res Commun.* (2014) 452(4):1071-7. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

小椋裕司、高井理、干場和貴、文殊宏平、筒井翔太、桜井(田代)晴奈、伊藤文昭、川崎勝己 生殖細胞における RecQ5 について 日本薬学会第 137 回年会 2017 年 3 月 25 日 仙台国際センター/東北大学川内キャンパス(仙台)

小椋裕司、高井理、干場和貴、吉岡泰秀、文殊宏平、桜井晴奈、川崎勝己 生殖細胞に

おける RecQ5 の DNA ヘリカーゼ機能について
第 88 回日本生化学会大会 第 38 回日本分子
生物学会 合同年会 2015 年 12 月 2 日 神
戸国際会議場 / ポートピアホテル (神戸)

河村香寿美、桜井晴奈、筒井彩夏、吉岡
泰秀、川崎勝己 ショウジョウバエ DNA ヘリ
カーゼ RecQ5 の発現制御機構 第 88 回日本
生化学会大会 第 38 回日本分子生物学会
合同年会 2015 年 12 月 1 日 神戸国際会議
場 / ポートピアホテル (神戸)

川崎勝己 個体におけるゲノムストレス
とゲノム安定性維持機構 シンポジウム
「DNA ダイナミクスと遺伝情報の維持機構」
2015 年 3 月 7 日 早稲田大学大隈会館(早稲
田)

川崎勝己、桜井晴奈、吉岡泰秀、高井理、
河村香寿美、小椋裕司、伊藤文昭 雄性生殖
細胞における RecQ5 の役割 Impact of
Drosophila RecQ5 in male germline
maintenance 第 37 回日本分子生物学会年会
2014 年 11 月 25 日-72 日 パシフィコ横浜(横
浜)

川崎勝己、桜井晴奈、吉岡泰秀、高井理、
河村香寿美、小椋裕司、伊藤文昭 ショウシ
ョウバエ精巣における RecQ5 の発現と機能
Expression of RecQ5 in *Drosophila* testis
第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 16
日 京都国際会館 (京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.setsunan.ac.jp/~bio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 勝己 (KAWASAKI, Katsumi)
摂南大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 60177665

(2) 研究分担者

長田 武 (NAGATA, Takeshi)
摂南大学・大学院理工学研究科・講師
研究者番号: 70411709

(3) 研究分担者

吉岡 泰秀 (YOSHIOKA, Yasuhide)

摂南大学・理工学部・助教

研究者番号: 40572839

(4) 連携研究者

小林 純也 (KOBAYASHI, Junya)
京都大学・放射線生物研究センター・准教
授
研究者番号: 30301302

(5) 連携研究者

益谷 美都子 (MASUTANI, Mitsuko)
独立行政法人国立がん研究センター・ゲノ
ム安定性研究分野・分野長
研究者番号: 60238904