| 28　初期胚分裂の必須遺伝子を見出す標的蛋白分解系の樹立 | 清光　智美 |
|---|---|

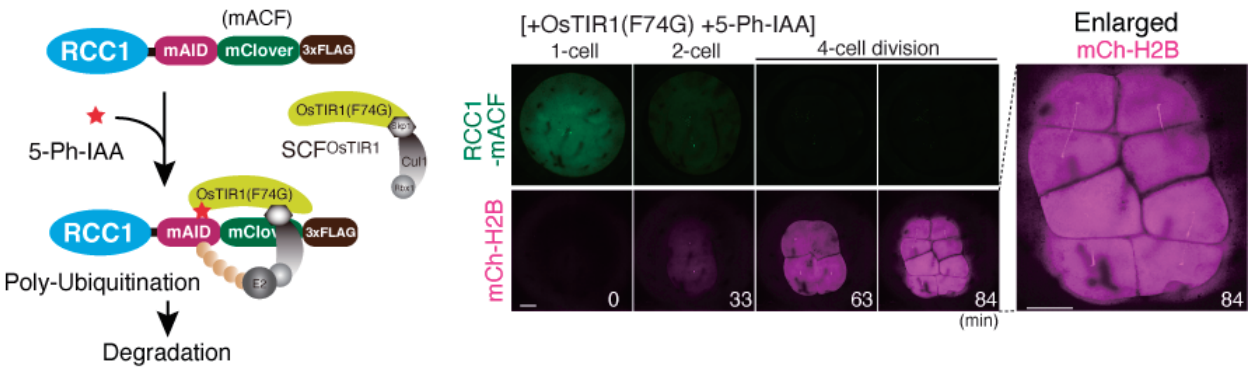
**【目的】**初期胚分裂の異常は、出生異常や発生異常につながりうる。しかしヒトの初期胚分裂の研究は、技術的、倫理的制約があるため、体細胞分裂に比べてほとんど進んでいない。また脊椎動物の初期胚は、分裂周期が速く、かつ母親由来の mRNA やタンパク質をすでに内包するため、DNA や mRNA を標的とした従来の手法では必須遺伝子の機能を適切なタイミングで十分に解析することができない。本研究では、最新のタンパク分解技術である改良型オーキシン誘導デグロン（auxin inducible degron 2：AID2）法をメダカ初期胚に適用し、メダカ初期胚分裂において必須遺伝子を同定するための実験系を樹立することを目的とした。標的遺伝子としては、高度に保存され、初期胚でも発現が見られると予想される *RCC1* 遺伝子とダイニン重鎖遺伝子（*DHC1*）を選定した。

**【方法】**まずは CRISPR/Cas9 法を用いて、メダカの汎用系統 OK-Cab の *RCC1* 遺伝子部位に mAID-mClover-3×FLAG（mACF）タグを挿入し、ホモ接合体を作製した。次に、AID2 法に必要な補因子 OsTIR1（F74G）と mCherry-H2B を共に発現する mRNA を合成し、それをホモ接合体のペアから採取した 1 細胞期の初期胚にマイクロインジェクションした。インジェクションした初期胚を、オーキシンアナログの 5-Ph-IAA（10 μM）に 30 分間浸した後、顕微鏡観察用の dish に移動し、5-Ph-IAA を含む溶液中で分裂の様子を観察した。撮影は、スピニングディスク型共焦点顕微鏡（CSU-W1）と 20×水浸レンズを用いて行った。コントロールとしては DMSO、あるいは OsTIR1（F74G）を含まない mRNA を用いた。

**【結果】**ビオチン化 dsDNA をドナーに用いることにより、mACF タグの cDNA を *RCC1* 遺伝子にノックインすることに成功した。同様の手法により *DHC1* 遺伝子にもインジェクションを行ったが、複数回の試行にも関わらずノックイン系統を取ることができなかったため、その後の実験は RCC1-mACF ノックイン系統を用いて行った。RCC1-mACF の緑色蛍光は、ヒトの培養細胞同様に、間期核と分裂期染色体上に強く観察された。OsTIR1（F74G）と mCherry-H2B を発現させると、mCherry-H2B の赤色蛍光が、2 細胞期あたりから観察され、4 細胞期あたりにはより強く観察された。コントロールの DMSO を浸しても RCC1-mACF の緑色蛍光の様子に変化は見られなかったが、5-Ph-IAA を添加すると、mCherry-H2B の赤色蛍光の輝度の増加に伴い、RCC1-mACF の緑色蛍光は減少し、4 細胞期あたりにはほとんど検出されなくなった。コントロールの細胞ではこのような RCC1-mACF の輝度の減少は見られなかったことから、メダカの初期胚において、AID2 法による標的タンパク分解系の樹立に成功したと結論付けた。

また重要なことに、RCC1 を分解した細胞では、分裂期に進行するものの、染色体が正しく娘細胞に分配されずに異常に伸びて収縮環に挟まれる様子が観察された。コントロールの細胞では、このような染色体の異常分配の様子は全く観察されなかったことから、メダカ初期胚では RCC1 が染色体の均等な分配に必須の役割を担うことが示唆された。

AID2 法の概要とメダカ初期胚における RCC1 タンパク分解の様子



# 28. 初期胚分裂の必須遺伝子を見出す標的蛋白分解系の樹立

清光　智美

沖縄科学技術大学院大学 Cell Division Dynamics Unit

Key words：オーキシン誘導デグロン法，RCC1，メダカ初期胚，紡錘体，染色体

## 緒　言

哺乳類の初期胚分裂はエラーを起こしやすく、それらの異常は出生異常や発生異常につながりうる［1］。しかしながら、ヒト初期胚を用いた研究は、倫理的・技術的な制約が大きく、培養細胞に比べ十分に進めることができない。また脊椎動物の初期胚は、分裂周期が速い上に、卵由来の mRNA やタンパクを内包するため、既知の遺伝子ノックアウトや mRNA の阻害による方法では、初期胚分裂に必須の遺伝子を同定することが難しい。

一般的に、受精卵は極めて大きく、ゲノムからの転写は抑制されている。また卵割期には DNA 複製期（S 期）と分裂期（M 期）を連続して繰り返し、その間に細胞成長に必要な GAP 期はなく、細胞周期の秩序を維持するチェックポイントも、機能が欠損あるいは低下している［2，3］。このような特殊な状況では、体細胞分裂とは異なる仕組みが働いていると推定されるが、その仕組みは十分に理解されていない。

近年、タンパク質を標的とした分解技術が開発されている。中でも鐘巻将人教授（国立遺伝学研究所）により開発された改良型オーキシン誘導デグロン法（Auxin Inducible Degron 2 : AID2）［4］は、オーキシンアナログ 5-Ph-IAA と OsTIR1（F74G）変異タンパク質を用いることにより、mAID タグ融合タンパク質を、より選択的、効率的に分解誘導可能である。また酵母や培養細胞に限らず、マウス個体においても毒性がほとんどなく、標的タンパクを分解することが報告されている。

私の研究室では、これまで AID 法をヒト培養細胞に用いて、染色体分配装置紡錘体の形成や配置に関する保存された制御因子群の機能解析を行ってきた［5〜8］。特に微小管結合分子モーターのダイニンや、紡錘体形成に重要とされる RanGTP の生成因子 RCC1 について解析を行ってきた。またヒトとよく似た遺伝子をもち、ゲノム編集やイメージング、取り扱いの容易なメダカ初期胚に注目し、飼育環境やイメージング技術をセットアップしてきた。ダイニンや RCC1 はその機能の重要性を考慮すると、メダカ初期胚分裂でも発現していると推定されるが、初期胚分裂における機能はほとんどわかっていない。よって、本研究では、まずはダイニンと RCC1 を標的として、AID2 の実験系をメダカ初期胚で樹立することを第一の目的とした。

## 方　法

### 1. メダカ系統および飼育

メダカ汎用系統 OK-Cab（基礎生物学研究所、NBRP Medaka、Strain ID : MT830）を用いた。水温は約 26.5℃に調整し、照明は、毎日 14 時間 ON-10 時間 OFF の明暗周期下で飼育した。朝 9 時に照明を点灯後、自然に交配した雌の腹から、ガラスピペットで卵を採取し、実体顕微鏡（Leica M80）下で受精卵を選別後、マイクロインジェクションに用いた。

### 2. マイクロインジェクション

マイクロインジェクションは、マイクロマニピュレーターMN-153（Narishige）に電動マイクロインジェクター Femtojet 4i（Eppendorf）を接続して行った。ガラスキャピラリーは PC-100（Narishige）を用いて作製した。

### 3. CRISPR/Cas9 によるノックイン系統の作製

ヒトの培養細胞同様に［7］、メダカ *RCC1* 遺伝子の C 末に mACF をノックインするために、まず既知のプロトコルに従い［5, 7］、ホモロジー領域を含む plasmid を遺伝子合成し、その後 mACF をコードする cDNA を BamHI サイトに挿入した。その後、そのプラスミドをテンプレートにし、Gutierrez-Triana らの方法［9］に従って、ビオチン付加 dsDNA を合成、精製した。gRNA 配列は、CCTop-CRISPR/Cas9 target online predictor を利用した。sgRNA は、MEGAscript T7 transctiption Kit（Thermo Fisher Scientific、AM1334）を用いて、Cas9 mRNA は pCS2＋Cas9 プラスミドを NotI で消化し直鎖にしたのち、mMachine SP6 kit（Thermo Fisher Scientific、AM1340）を用いて *in vitro* で合成した。

### 4. AID2 法によるタンパク質ノックダウン

mAID-mClover-3xFLAG（mACF）の cDNA［6］をメダカ Cab のゲノムに挿入し、RCC1-mACF を発現する F2 ホモ接合体を得たのち、それらを掛け合わせて受精卵を得た。OsTIR1（F74G）は OsTIR1（F74G）-P2A-mCherry-H2B の mRNA を一細胞期の受精卵に打ち込むことで発現させた。OsTIR1（F74G）の発現量は、mCherry-H2B で間接的にモニターすることとした。また mCherry-H2B は染色体マーカーとして用いた。OsTIR1（F74G）はオーキシンアナログ 5-Ph-IAA の存在下で、mAID タグと結合し、mAID 融合タンパクにポリユビキチン化を促し、プロテアソーム依存的なタンパク分解へと誘導する（図 1a）。

### 5. ライブイメージング

ガラス底 dish（Greiner CellView #627860）に液体状の 1.5～2%アガロースを乗せ、カバーガラス S1.5 を 7 枚まとめたものを挿し、アガロースを固めたのちに抜き取って、卵を載せる溝を自作した。岩松のメダカ生理食塩水（BSS）溶液で満たしたのちに、卵を乗せ、表面にある胚盤がガラス面に接するように向きを調整後、倒立顕微鏡 Nikon Ti2E のステージに乗せた。20×水浸レンズ（CFI apochromat LWD Lambda S 20XC WI）、横河 CSU-W1 共焦点ユニット、浜松 ORCA-Fusion デジタル cMOS カメラ、NIS elements software を用いて共焦点画像を撮影した。大半の場合、5μm 間隔で 13 枚の Z 軸切片画像、3 分間隔で撮影した。通常一度の実験で 5 個程度の初期胚画像を撮影した。AID2 法を用いる際には、ガラス底 dish に初期胚を入れる前に、10μM 5-Ph-IAA あるいは DMSO を含むシャーレで 30 分間振とうし、その後それぞれの薬剤入りの溶液は、観察用のガラスボトム dish にも加えた（図 1b）。

## 結果および考察

### メダカ初期胚細胞における AID2 法の確立

AID2 法では、標的タンパク質に mAID タグを付加し、OsTIR1（F74）タンパク質を発現する必要がある（図 1a）［4］。ヒトの培養細胞では、OsTIR1（F74G）は恒常的に発現させても細胞の生育に問題は見られなかったが、メダカ個体で OsTIR1（F74G）を恒常的に発現させるトランスジェニックメダカは得ることができなかった。一方、mAID-mClover-3×FLAG（mACF）を RCC1 の C 末部位にノックインしたトランスジェニックメダカは作製でき、F2 ホモ接合体も得ることができた。RCC1-mACF は予想通り、1 細胞期から核、および分裂期染色体上に局在した（図 1c）。そこで、当初の方法を変更し、OsTIR1（F74G）は一過的に発現させ、AID 法が機能するかどうか検討した（図 1b）。OsTIR1（F74G）の発現は、mCherry-H2B の発現で間接的にモニターした（方法の欄を参照）。DMSO を添加したコントロールの胚では、mCherry-H2B が発現した細胞でも RCC1-mACF の蛍光は観察された（図 1c）。しかし、5-Ph-IAA を添加した胚では、mCherry-H2B の発現に伴い、RCC1-mACF の蛍光が減少し、4 細胞期の分裂期に入る前には、ほとんど検出できない程度まで蛍光輝度が減少した（図 1d）。興味深いことに、RCC1 を分解した初期胚のうち約 35%（N＝49）の胚では、染色体が分裂期後期に異常に伸びて正常に分離せずに、細胞質分裂の際に切断されるような表現型が観察された（図 1d 右拡大図）。2 日後の胚を観察すると、インジェクション後 5-Ph-IAA を添加した胚では全てが発生異常を示し、体軸の形成が見られず致死となった（図 1e）。OsTIR1（F74G）を発現させず、mCherry-

H2B のみを発現し、5-Ph-IAA を添加した場合には、RCC1-mACF の輝度は変化せず、発生も正常に進行した。以上の結果から、メダカ初期胚においても AID2 法が機能し、RCC1 の分解は異常分配を示すことが示唆された。

本研究によりメダカ初期胚において AID2 法が機能することが示された。またヒト体細胞で RCC1 を分解してもこのような異常分裂は観察されなかったことから、巨大で特殊な初期胚細胞では、RCC1 など分裂制御因子の機能の必須性に違いがあることも示唆された。今後はその他の保存された因子の初期胚での機能解析が可能となるのみならず、他の組織で特異的に OsTIR1（F74G）を発現することができれば、組織特異的に標的タンパクを分解することも可能と思われる。

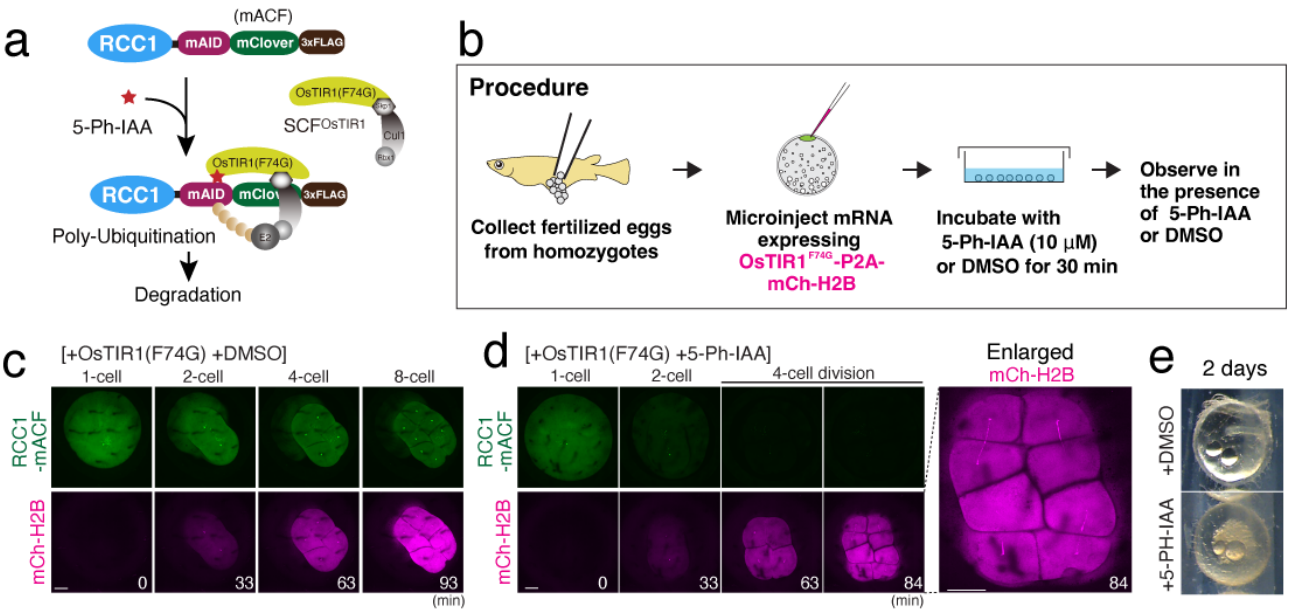



図 1. メダカ初期胚における AID2 法による選択的タンパク質分解系の樹立

a）改良型オーキシン誘導デグロン法（AID2 法）の概略。

b）メダカ受精卵での AID2 依存的タンパク分解誘導実験の作業過程。

c）コントロール実験。オーキシンアナログ 5-Ph-IAA の代わりに DMSO で受精卵を処理した。RCC1-mACF の蛍光は mCh-H2B が発現した後でも残る。スケールバー：100 μm。

d）分解実験。オーキシンアナログ 5-Ph-IAA を加えると、RCC1-mACF の蛍光は mCh-H2B の発現に応じて減少し、4 細胞期の分裂では、異常な染色体分配の様子が観察された。スケールバー：100 μm。

e）2 日後の胚の実体顕微鏡画像。コントロール（+DMSO）では体の一部ができているが、5-Ph-IAA で RCC1 を分解すると発生が停止する。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、沖縄科学技術大学院大学 Science Technology Group の清光愛、名古屋大学理学研究科の田中実、西村俊哉（現北海道大学大学院水産科学研究院）、遺伝学研究所分子細胞工学研究室の鐘巻将人、東北大学生命科学研究科分子行動分野の安齊賢（現京都大学農学研究科ゲノム編集育種講座）である。

## 文　献


1) Cavazza T, Takeda Y, Politi AZ, Aushev M, Aldag P, Baker C, et al. Parental genome unification is highly error-prone in mammalian embryos. Cell. 2021;184(11):2860-77 e22. Epub 20210507. doi: 10.1016/j.cell.2021.04.013. PubMed PMID: 33964210; PubMed Central PMCID: PMC8162515.

2) Jukam D, Shariati SAM, Skotheim JM. Zygotic Genome Activation in Vertebrates. Dev Cell. 2017;42(4):316-32. doi: 10.1016/j.devcel.2017.07.026. PubMed PMID: 28829942; PubMed Central PMCID: PMC5714289.

3) Duro J, Nilsson J. SAC during early cell divisions: Sacrificing fidelity over timely division, regulated differently across organisms: Chromosome alignment and segregation are left unsupervised from the onset of development until checkpoint activity is acquired, varying from species to species. Bioessays. 2021;43(3):e2000174. Epub 20201130. doi: 10.1002/bies.202000174. PubMed PMID: 33251610.

4) Yesbolatova A, Saito Y, Kitamoto N, Makino-Itou H, Ajima R, Nakano R, et al. The auxin-inducible degron 2 technology provides sharp degradation control in yeast, mammalian cells, and mice. Nat Commun. 2020;11(1):5701. Epub 20201111. doi: 10.1038/s41467-020-19532-z. PubMed PMID: 33177522; PubMed Central PMCID: PMC7659001.

5) Natsume T, Kiyomitsu T, Saga Y, Kanemaki MT. Rapid Protein Depletion in Human Cells by Auxin-Inducible Degron Tagging with Short Homology Donors. Cell Rep. 2016;15(1):210-8. Epub 20160324. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.001. PubMed PMID: 27052166.

6) Okumura M, Natsume T, Kanemaki MT, Kiyomitsu T. Dynein-Dynactin-NuMA clusters generate cortical spindle-pulling forces as a multi-arm ensemble. Elife. 2018;7. Epub 20180531. doi: 10.7554/eLife.36559. PubMed PMID: 29848445; PubMed Central PMCID: PMC6037482.

7) Tsuchiya K, Hayashi H, Nishina M, Okumura M, Sato Y, Kanemaki MT, et al. Ran-GTP Is Non-essential to Activate NuMA for Mitotic Spindle-Pole Focusing but Dynamically Polarizes HURP Near Chromosomes. Curr Biol. 2021;31(1):115-27 e3. Epub 20201112. doi: 10.1016/j.cub.2020.09.091. PubMed PMID: 33186548.

8) van Toorn M, Gooch A, Boerner S, Kiyomitsu T. NuMA deficiency causes micronuclei via checkpoint-insensitive k-fiber minus-end detachment from mitotic spindle poles. Curr Biol. 2023;33(3):572-80 e2. Epub 20230109. doi: 10.1016/j.cub.2022.12.017. PubMed PMID: 36626904.

9) Gutierrez-Triana JA, Tavhelidse T, Thumberger T, Thomas I, Wittbrodt B, Kellner T, et al. Efficient single-copy HDR by 5' modified long dsDNA donors. Elife. 2018;7. Epub 20180829. doi: 10.7554/eLife.39468. PubMed PMID: 30156184; PubMed Central PMCID: PMC6125127.