

【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

