

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16045

研究課題名（和文）減数分裂期の部位特異的な組換えにおける染色体構造とゲノム・エピゲノム情報の意義

研究課題名（英文）The specification of meiotic recombination sites: chromosomal structures, genome and epigenome

研究代表者

今井 裕紀子 (Imai, Yukiko)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・特任研究員

研究者番号：00814782

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、減数分裂期の組換え開始における「ゲノム・エピゲノム情報」と「染色体構造」の役割を明らかにすることである。ヒトとゼブラフィッシュの精子形成では、染色体末端近傍で相同組換えが起こりやすいことが知られているが、そのメカニズムは未知である。本研究では、減数分裂期特有の染色体構造が異常となる変異体ゼブラフィッシュを解析し、染色体末端指向的な組換えに与える影響を明らかにした。また、組換え開始部位とヒストン修飾のゲノムワイドマッピングを行い、組換え開始のホットスポットに見られる特徴を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

減数分裂期に起こる相同組換えは、遺伝情報のシャッフリングによって生物に多様性をもたらす重要なメカニズムである。また、卵子や精子などの配偶子形成において正常な染色体分配を担うプロセスでもあることから、ヒトにおける不妊や染色体異常を理解する上で重要な課題である。ヒトの精子形成では、染色体末端近傍で相同組換えが起こりやすいが、そのメカニズムは全くの未知であった。類似した特徴が見られるゼブラフィッシュをモデルとした本研究の成果は、組換え制御の新規メカニズムを理解するための足がかりになると期待される。

研究成果の概要（英文）：In human and zebrafish males, meiotic recombination occurs preferentially near the ends of chromosomes. However, how recombination is induced in these regions remains largely unknown. In this project, mutant zebrafish lines deficient for meiotic chromosomal structures were examined for their phenotypes in meiotic recombination. In addition, genome-wide mapping of recombination initiation sites and a histone modification identified characteristic features of recombination sites.

研究分野：減数分裂

キーワード：ゼブラフィッシュ 減数分裂 相同組換え

## 1. 研究開始当初の背景

減数分裂期の染色体分配を担う相同組換えは、DNAの二重鎖切断( DSB: Double Strand Break )によって始まる。ヒトやマウスのDSBの場所は配列特異的なDNA結合タンパクによるヒストン修飾で決まる一方で、ヒトでは組換えの起こりやすい領域に大きな性差が見られ、精子形成ではテロメア近傍に集中する。従って、ゲノム・エピゲノム情報とは異なるレベルでのDSBの制御が予想されるが、そのメカニズムは未知であった。研究代表者は、ゼブラフィッシュのDSBがテロメア近傍で起こりやすく、テロメアから形成が始まる染色体軸構造に依存して起こることを発見した (Takemoto et al, 2020, *Plos Genet*)。このことから、染色体構造がDSB形成に関わる可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、テロメア指向的な組換えにおいて、「染色体構造」と「ゲノム・エピゲノム情報」が果たす役割を明らかにすることである。具体的には、野生型と染色体構造の変異体ゼブラフィッシュを用いた DSB・ヒストン修飾のゲノムワイドマッピングを行う。これにより、DSBが起こりやすい領域(ホットスポット)のゲノム・エピゲノム情報と、染色体構造がテロメア指向的な組換えに与える影響を明らかにする。加えて、DSB に必須の因子の局在も検討し、テロメア近傍で DSB を起こす仕組みを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 野生型ホットスポットにおける「ゲノム・エピゲノム情報」の同定

近年、減数分裂特異的な一本鎖 DNA 結合タンパク Dmc1 のクロマチン免疫沈降シークエンス (Dmc1 ChIP-seq) により、DSB のゲノムワイドマッピングが行われている (Khil et al, 2012, *Genome Res*; Pratto et al, 2014, *Science*)。この手法をゼブラフィッシュに応用する。まず、野生型ゼブラフィッシュの精巢を用いた Dmc1 ChIP-seq を行い、DSB ホットスポットをゲノムワイド・配列レベルで同定する。これにより、ゼブラフィッシュの野生型ホットスポットにおける「ゲノム情報」を得る。

出芽酵母や脊椎動物の DSB 部位で広く見られるトリメチル化ヒストン H3K4 (H3K4me3) の ChIP-seq を、野生型ゼブラフィッシュの精巢を用いて行う。Dmc1 ChIP-seq でマッピングされた DSB 近傍にこの修飾が見られるか検討し、野生型ホットスポットの「エピゲノム情報」を得る。

### (2) 野生型と染色体構造変異体における「ゲノム・エピゲノム情報」の比較

減数分裂期特異的な染色体構造である軸構造・シナプシス・核膜-テロメア接着を担うタンパク質を欠損した変異体ゼブラフィッシュについて、組換えにおける表現型を免疫細胞化学によって解析する。核膜-テロメア接着の変異体では、異所的な軸形成が起こると予想されることから、その精巢を用いた Dmc1 ChIP-seq を行い、軸がテロメア近傍以外の場所から形成された場合の DSB マップを野生型と比較し、その違いを検討する。

### (3) DSB マシナリー因子の局在解析

酵母やマウスでは、DSB マシナリーと呼ばれる一群のタンパク質が DSB 形成に必要であることが知られている。そこで、DSB マシナリー因子と DSB の局在に関連が見られるか、ゼブラフィッシュ精母細胞の免疫染色により検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 野生型ホットスポットにおける「ゲノム・エピゲノム情報」の同定

Dmc1 ChIP-seq による DSB のゲノムワイドマッピングは、ゼブラフィッシュでは前例がない。そこで、新たに作製した抗ゼブラフィッシュ Dmc1 抗体を用いてゼブラフィッシュ精巣における条件検討を行い、Dmc1 ChIP プロトコルを確立した。得られたライブラリーは、NextSeq500 を用いてシーケンスした。Dmc1 ChIP-seq では、シーケンスデータから一本鎖 DNA 由来のリード配列を選択してマッピングする特殊なパイプラインによる解析が求められる。そこで、この解析について実績のある Dr. Bernard De Massy の研究室（フランス・Institute of Human Genetics）の Dr. Julie Clement との共同研究により解析を行い、Dmc1 結合ピークのマップを得ることができた。Dmc1 は、DSB 修復の過程でできる一本鎖に結合することから、これらのピーク（Type1 ピーク）は DSB 部位を反映している（図 1）。得られた DSB マップを染色体スケールで見ると、染色体末端近傍に多くのピークが見られた。この結果は、精母細胞スプレッドの免疫染色でテロメア近傍に多くの Dmc1 foci が見られることと一致する。

また、野生型ゼブラフィッシュ精巣を用いた H3K4me3 ChIP-seq を行い、次世代シーケンス解析を行った。H3K4me3 は、転写活性の高いプロモーターの修飾として知られている。マッピングの結果、減数分裂特異的な遺伝子のプロモーター領域などに強いシグナルが見られたことから、H3K4me3 についてもゲノムワイドマップを得ることができた。

次に、野生型ゼブラフィッシュの DSB マップと H3K4me3 マップを比較したところ、目立ったオーバーラップは見られなかった（図 2）。H3K4me3 が出芽酵母やヒト・マウスで広く保存された DSB 部位の修飾であることを考えると、この結果は予想外であった。しかしながら、ヒト精巣では、染色体末端に近づくほど DSB シグナルと H3K4me3 シグナルの相関が弱くなることが報告されている（Pratto et al, 2014, *Science*）。従って、この結果は、染色体末端近傍の DSB 形成が H3K4me3 に依存しない新しいメカニズムで起こることを強く示唆している。今後、DSB がマップされた領域に共通の特徴（GC 含量や DNA モチーフなど）が見られるか検討を行う。

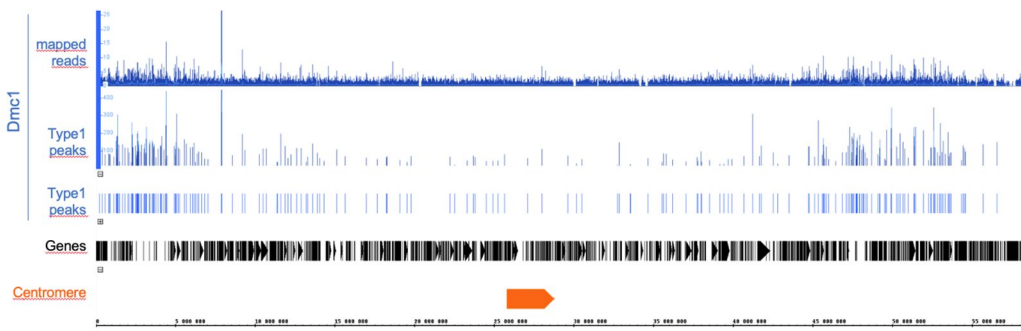


図 1: ゼブラフィッシュ精巣の DSB マップ (1 番染色体)

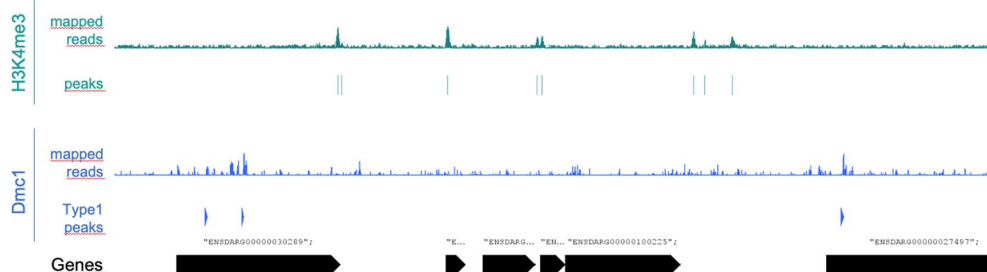


図 2: H3K4me3 と DSB マップの重ね合わせ (1 番染色体上の約 0.2Mb の領域)

## (2) 野生型と染色体構造変異体における「ゲノム・エピゲノム情報」の比較

本研究では、減数分裂特有の染色体構造である軸構造・シナプシス・核膜-テロメア接着の変異体を同定し、組換えに与える影響を免疫細胞化学により解析した。その結果、軸構造因子である Sycp2 の変異体では DSB 形成のマーカが見られないのに対し、シナプシスを担う Sycp1 の変異体ではテロメア近傍指向的な DSB 形成が維持されていることを発見した (Takemoto et al, 2020, *Plos Genet*; Imai et al, 2021, *Front Cell Dev Biol*)。また、核膜-テロメア接着変異体では、異所的な軸形成が見られたことから、この変異体の精巢を用いて Dmc1 ChIP-seq を行い、DSB マップを得た。現在、(1)で得られた野生型の DSB マップと比較することで、軸の形成という「染色体構造」が DSB 部位に与える影響を与えるか、検討を行っている。

## (3) DSB マシナリー因子の局在解析

本研究では、DSB 形成に関わる因子として、Iho1 の免疫細胞化学による局在解析を行った。マウス IH01 は、DSB 形成に必須な因子の一つであり、既知の DSB マシナリー因子のうち、一番はじめにクロマチンへ局在する (Stanzione et al., *Nat Cell Biol*, 2016)。このことから、ゼブラフィッシュでも DSB の場所を決める上で、重要な役割を果たすのではないかと考えた。抗ゼブラフィッシュ Iho1 抗体を作製して、精母細胞における局在を解析したところ、減数分裂の初期にテロメア近傍へ局在することがわかった。また、DSB 形成が起こらない *spo11* 変異体の精母細胞では、テロメア近傍に強い Iho1 シグナルの停留が見られた。従って、Iho1 がテロメア近傍へ局在することにより、この領域で DSB 形成が起こることが示唆された。

## 今後の展望

脊椎動物の組換えメカニズムに関するこれまでの知見は、マウスモデルを中心に得られてきた。しかしながら、染色体末端指向的な組換えはマウスでは顕著でないため、そのメカニズムは全くの未知であった。本研究では、組換え研究の新規モデルとしてゼブラフィッシュに着目し、ゲノムワイド DSB マップを得るとともに、テロメア近傍で組換えを起こすメカニズムについて、多方面から検討した。その結果、ゼブラフィッシュの DSB は、既知の H3K4me3 依存的な DSB 形成とは異なる特徴を持つことがわかった。さらに、そのメカニズムとして、DSB マシナリー因子の局在が重要な役割を担うことが示唆された。染色体末端指向的な組換えは、ゼブラフィッシュに限らず、ヒトやその他の脊椎動物にも広く見られる特徴である。本研究の成果は、DSB 形成の新規メカニズムを明らかにするための重要な足がかりになると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Imai Yukiko, Saito Kenji, Takemoto Kazumasa, Velilla Fabien, Kawasaki Toshihiro, Ishiguro Kei-ichiro, Sakai Noriyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Sycp1 Is Not Required for Subtelomeric DNA Double-Strand Breaks but Is Required for Homologous Alignment in Zebrafish Spermatocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 664377
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.664377	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 -

1. 著者名 Takemoto Kazumasa*, Imai Yukiko*, Saito Kenji, Kawasaki Toshihiro, Carlton Peter M., Ishiguro Kei-ichiro, Sakai Noriyoshi (*co-first authors)	4. 巻 16
2. 論文標題 Sycp2 is essential for synaptonemal complex assembly, early meiotic recombination and homologous pairing in zebrafish spermatocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1008640
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1008640	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 -

1. 著者名 Imai Yukiko, Olaya Ivan, Sakai Noriyoshi, Burgess Sean M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Meiotic Chromosome Dynamics in Zebrafish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 2764
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.757445	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yukiko Imai
2. 発表標題 The synaptonemal complex and recombination in zebrafish meiosis
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会・シンポジウム「Dynamic and structural regulation of chromosome inheritance in meiosis」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukiko IMAI and Noriyoshi SAKAI
2. 発表標題 The synaptonemal complex and recombination in zebrafish meiosis
3. 学会等名 第38回 染色体ワークショップ・第19回 核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukiko IMAI and Noriyoshi SAKAI
2. 発表標題 Sycp1 is not required for subtelomeric DNA double-strand breaks but is required for homologous alignment in zebrafish spermatocytes.
3. 学会等名 The Students and Postdocs Meiosis Workshop v3.0, PDSM 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今井裕紀子
2. 発表標題 ゼブラフィッシュをモデルとした減数分裂期相同組換えの開始メカニズムへのアプローチ
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会・フォーラム「有性生殖における染色体・クロマチン・核動態」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukiko Imai
2. 発表標題 Sycp2 is essential for synaptonemal complex assembly, early meiotic recombination and homologous pairing in zebrafish spermatocytes.
3. 学会等名 Meiosis In Quarantine (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukiko Imai
2. 発表標題 Initiation of meiotic recombination in zebrafish
3. 学会等名 遺伝研研究会「有性生殖における染色体・クロマチン・核動態に関する若手研究者の会」
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		
フランス	Institute of Human Genetics		