

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15716

研究課題名(和文) 減数分裂期交叉型組換えの選択機構の解明

研究課題名(英文) Investigating the mechanisms of crossover recombination during meiosis

研究代表者

伊藤 将 (Ito, Masaru)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：30869061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類における減数分裂組換え制御タンパク質の機能解析を行った。特に、RAD51をDNAから解離させる機能を持つFIGNL1に着目した。Fignl1の精巣特異的なコンディショナルノックアウト(cKO)マウスを作製し、FIGNL1が交叉型組換えに必須であることを明らかにした。Fignl1 cKOマウスではRAD51が減数分裂期の精母細胞のみならず、減数分裂前DNA複製期の染色体にも蓄積し、また、減数分裂組換えが起こらないSpo11 KOマウスでもRAD51が蓄積したことから、FIGNL1による無傷の二本鎖DNA及び組換え部位の一本鎖DNAからのRAD51の解離が減数分裂に必須であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

減数分裂組換えの破綻は不妊症やダウン症等の疾患の一因であることが知られており、FIGNL1はヒトの早期卵巣不全の原因遺伝子としても報告されている。従って、本研究により明らかになったFIGNL1の機能は、将来的な生殖補助医療や不妊治療へと繋がることが期待される。また、相同組換えは体中の細胞で生じるDNA損傷の修復に必須であり、相同組換えの破綻が細胞のがん化を引き起こすことも知られている。FIGNL1は体細胞でも発現していることから、本研究で明らかにした、RAD51のDNAからの解離を解した相同組換え制御の仕組みの理解は、将来的ながん予防やがん治療へと繋がるのが想定される。

研究成果の概要(英文)：I generated several mutant mice and analyzed phenotypes in meiosis, particularly in meiotic recombination. Among them, a germ-line specific conditional knockout (cKO) of Fignl1 resulted in defective synapsis of homologous chromosomes and crossing over. RAD51, a central player of meiotic recombination, was accumulated on chromosomes in not only early meiotic prophase I where meiotic recombination takes place but also in pre-meiotic S-phase in Fignl1 cKO spermatocytes. Importantly, RAD51 accumulation was also seen in Spo11 KO Fignl1 cKO spermatocytes where DNA double-strand breaks that initiate meiotic recombination do not occur. This suggests that RAD51 removal from both single-stranded DNA at the sites of meiotic recombination and intact double-stranded DNA is critical for meiotic recombination and fertility.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：減数分裂組換え 配偶子形成 相同組換え DNA修復 生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

減数分裂期の相同組換え(減数分裂組換え)は、相同染色体間の物理的な交叉(キアズマ)を形成することで正常な染色体分配を保障する。キアズマの欠損に伴う染色体分配の異常は異数体配偶子の形成を引き起こし、不妊症やダウン症の原因となることが知られている。

DNA二本鎖切断によって開始される減数分裂組換えは、相同染色体を鋳型にした部分的なDNA交換反応(非交叉型組換え)、あるいは相同染色体のDNAの完全な交換反応(交叉型組換え)のいずれかの経路を辿り、交叉型組換えのみがキアズマを形成する。マウスやヒトなどの哺乳類の場合、1細胞当たり約300箇所で行われるDNA二本鎖切断のうち、約30箇所(全体の10%程度)が交叉型組換えを起こし、キアズマを形成するが、全ての相同染色体対が必ず1箇所は交叉型組換えを起こすように制御されている。

これまで、減数分裂組換え及び交叉型組換えに必要な因子が出芽酵母からマウスまで数多く発見されてきた。酵母からマウスまで種間で広く保存された仕組みがある一方で、哺乳類と酵母では交叉型組換えの選択比率が異なり(マウス:約10%、出芽酵母:約40%)、また、高等真核生物特異的な因子が減数分裂組換え制御に関与することから、哺乳類においては減数分裂組換えがより複雑かつ厳密な制御を受ける可能性が示唆される。しかしながら、哺乳類における減数分裂組換え及び交叉型組換え制御仕組みについては未解明の点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、哺乳類のモデル生物としてマウスを用い、減数分裂組換え制御に関与する因子の機能を新たに明らかにすることで、哺乳類における減数分裂組換え及び交叉型組換え制御の仕組みを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

他の生物種や、哺乳類の体細胞における先行研究の結果から、減数分裂組換え制御への関与が想定されるタンパク質の変異体を作製し、DNA二本鎖切断の形成や修復、交叉型組換え形成への影響を、主に免疫染色による細胞学的手法、及び、クロマチン免疫沈降法によるゲノムワイドな局在解析(ChIP-seq)により検証する。

4. 研究成果

FIGNL1は、ヒト培養細胞においてRAD51をDNAから解離させる機能を持つことが先行研究により報告されている(Matsuzaki et al., *Nature Communication* 2019)。また、FIGNL1のホモログFIGL1は、植物で減数分裂期の交叉型組換えの制御に関与することが報告されている(Fernandes et al., *PLoS Genet.* 2018)。しかしながら、哺乳類の減数分裂組換えにおける機能は未解明であった。*Figl1*のノックアウト(KO)マウスを作製したところ、胚性致死を示したため、生殖細胞特異的に*Figl1*をコンディショナルノックアウト(cKO)するマウスを作製し、減数分裂組換えへの影響を検証した。その結果、*Figl1* cKOオスマウスの精巣は縮小し、精子の大幅な減少が見られた。免疫染色の結果、*Figl1* KO細胞は減数分裂組換えが起こる減数分裂前期の途中で細胞周期が停止し、精子形成まで進行した細胞は*Figl1* cKOマウスの精巣の内、*Figl1* KOが起こっていない細胞であった。すなわち、FIGNL1は正常な減数分裂の進行及び精子形成に必須であることが明らかになった。

RAD51は相同組換えにおいて中心的な役割を果たし、DNA二本鎖切断後に露出した一本鎖DNAにフィラメント状に結合し、相同鎖(相同な配列を持ったDNA)を探索することで相同組換えを開始させる。RAD51のDNAへの結合は、安定化と不安定化のバランスによって制御されており、RAD51の不安定化はRAD51のDNAからの解離を促進する。出芽酵母や植物において、RAD51のDNAからの解離の抑制は、交叉型組換えの頻度を上昇させることが先行研究において報告されている。そこで、FIGNL1がマウスの減数分裂において交叉型組換えの頻度を制御するか、検証を行った。その結果、*Figl1* cKOマウスの精母細胞ではRAD51の蓄積が見られ(図1)、ヒト培養細胞における先行研究と同様に、FIGNL1がマウスの減数分裂期の精母細胞においてもRAD51をDNAから解離させる機能を持つことが明らかになった。一方、交叉型組換えの

マーカーであるMLH1は検出されず、FIGNL1はマウス減数分裂においては交叉型組換えに必須であることが明らかになった。

Figl1 cKOマウスの精母細胞におけるRAD51の蓄積は、野生型でDNA二本鎖切断後に組換え部位に結合するRAD51よりも多数検出された。また、RAD51の蓄積は、減数分裂前のDNA複製期

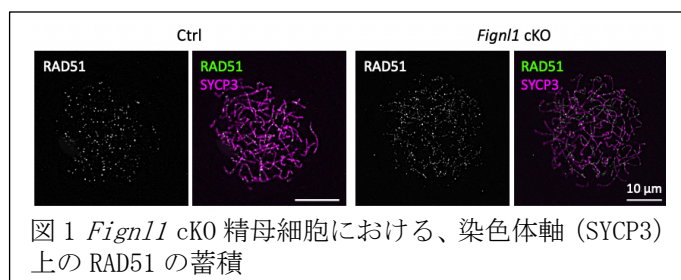


図1 *Figl1* cKO 精母細胞における、染色体軸(SYCP3)上のRAD51の蓄積

の精母細胞においても検出された。このことから、*Figl1* cKO 細胞においては減数分裂組換えに依存せずに RAD51 が染色体に蓄積する可能性が考えられた。そこで、DNA 二本鎖切断が起こらない *Spo11* KO マウスを用いて RAD51 の染色体への結合を調べたところ、RAD51 の蓄積は *Spo11* KO *Figl1* cKO マウスの精母細胞においても検出された。この結果から、FIGL1 非存在下では、RAD51 が組換え部位の一本鎖 DNA のみならず、無傷の二本鎖 DNA にも蓄積することが明らかになった。

Figl1 cKO 細胞における RAD51 の蓄積は、核全体ではなく、染色体軸上で特異的に見られた (図 1) ことから、RAD51 は特定の二本鎖 DNA に結合することが示唆された。そこで、RAD51 の結合を ChIP-seq によりゲノムワイドに検証したところ、RAD51 のピークは検出できなかった。そこで、一本鎖 DNA への結合を特異的に検出可能な ChIP-SSDS (single-stranded DNA sequencing) を実施したところ、組換え部位において、野生型と *Figl1* cKO マウスで同程度の RAD51 の結合が検出された。また、*Spo11* KO マウス及び *Spo11* KO *Figl1* cKO マウスいずれにおいても、一本鎖 DNA に結合する RAD51 のピークはほとんど検出されなかった。ゲノムワイド解析の結果、RAD51 が二本鎖 DNA に結合する部位の特定には至らなかったが、*Figl1* 欠損により RAD51 が無傷の二本鎖 DNA に結合することを裏付けるデータを得た。

本研究で使用した、Stra8-Cre を用いた生殖細胞特異的な *Figl1* の cKO は、精母細胞では 8 割程度の効率で KO 細胞を得られたのに対し、卵母細胞では 4 割程度の効率でしか KO 細胞を得られなかった。しかしながら、得られた KO 細胞を用いて、卵母細胞における FIGL1 の機能解析を行った。その結果、精母細胞と同様に、

Figl1 の欠損により染色体への RAD51 の蓄積が見られた (図 2)。 *Figl1* KO 精母細胞は相同染色体間の対合に異常が生じ、減数分裂前期の途中で細胞周期が停止したのに対し、*Figl1* KO 卵母細胞は正常な相同染色体間の対合を示し、減数分裂前期の最終ステージである dictyate 期まで減数分裂の進行が確認された。また、交叉型組換えマーカーである MLH1 の数はコントロールと同程度であり、FIGL1 は卵母細胞における交叉型組換えには必須ではないことが明らかになった。

以上のように、交叉型組換え形成や減数分裂の進行には性差が見られた一方で、FIGL1 はマウス精母細胞及び卵母細胞において、RAD51 を DNA から解離させることに必須であり、特に精母細胞においては正常な減数分裂の進行及び妊孕生に必須であることが明らかになった。

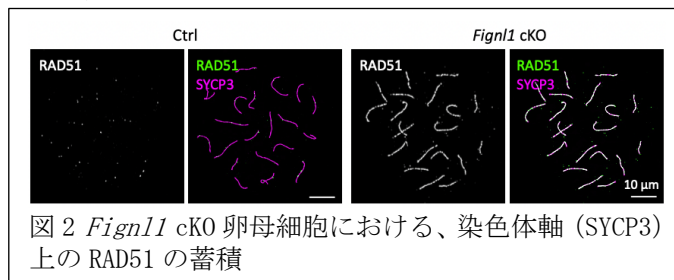


図 2 *Figl1* cKO 卵母細胞における、染色体軸 (SYCP3) 上の RAD51 の蓄積

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ito Masaru, Furukohri Asako, Matsuzaki Kenichiro, Fujita Yurika, Toyoda Atsushi, Shinohara Akira	4. 巻 14
2. 論文標題 FIGNL1 AAA+ ATPase remodels RAD51 and DMC1 filaments in pre-meiotic DNA replication and meiotic recombination	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6857
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-42576-w	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 Bondarieva A, Raveendran K, Telychko V, Rao H. B. D. P, Ravindranathan R, Zorzompokou C, Finsterbusch F, Dereji I, Papanikos F, Trankner D, Schleiffer A, Fei J, Klimova A, Ito M, Kulkarni D S., Roeder I, Hunter N, Toth A	4. 巻 11
2. 論文標題 Proline-rich protein PRR19 functions with cyclin-like CNTD1 to promote meiotic crossing over in mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-16885-3	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
1. 著者名 Kulkarni Dhananjaya S., Owens Shannon N., Honda Masayoshi, Ito Masaru, Yang Ye, Corrigan Mary W., Chen Lan, Quan Aric L., Hunter Neil	4. 巻 586
2. 論文標題 PCNA activates the MutL endonuclease to promote meiotic crossing over	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 623 ~ 627
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-020-2645-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Bhagwat Nikhil R, Owens Shannon N, Ito Masaru, Boinapalli Jay V, Poa Philip, Ditzel Alexander, Koppurapu Srujan, Mahalawat Meghan, Davies Owen Richard, Collins Sean R, Johnson Jeffrey R, Krogan Nevan J, Hunter Neil	4. 巻 10
2. 論文標題 SUMO is a pervasive regulator of meiosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.57720	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

1. 著者名 Yun Yan, Ito Masaru, Sandhu Sumit, Hunter Neil	4. 巻 2153
2. 論文標題 Cytological Monitoring of Meiotic Crossovers in Spermatocytes and Oocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 267 ~ 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0644-5_19	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ito Masaru, Fujita Yurika, Shinohara Akira	4. 巻 134
2. 論文標題 Positive and negative regulators of RAD51/DMC1 in homologous recombination and DNA replication	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103613 ~ 103613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2023.103613	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Masaru, Shinohara Akira	4. 巻 10
2. 論文標題 Chromosome architecture and homologous recombination in meiosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.1097446	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 Fajish Ghanim, Challa Kiran, Salim Sagar, VP Ajith, Mwaniki Stephen, Zhang Ruihao, Fujita Yurika, Ito Masaru, Nishant Koodali T., Shinohara Akira	4. 巻 29
2. 論文標題 DNA double strand breaks regulate the cleavage independent release of Rec8 cohesin during yeast meiosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 86 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sawant Priyanka, Mwaniki Stephen, Fujita Yurika, Ito Masaru, Furukohri Asako, Shinohara Akira	4. 巻 98
2. 論文標題 The role of conserved amino acid residues of Sae3 in Mei5?Sae3 complex for Dmc1 assembly in meiotic recombination	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 45 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1266/ggs.23-00015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 伊藤 将
2. 発表標題 FIGNL1-dependent removal of recombinases is essential for homologous recombination in male meiosis
3. 学会等名 2022 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 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaru Ito, Ken-ichiro Matsuzaki and Akira Shinohara
2. 発表標題 FIGNL1-dependent removal of recombinases is essential for homologous recombination in male meiosis
3. 学会等名 Gordon Research Conference on meiosis (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaru Ito, Ken-ichiro Matsuzaki and Akira Shinohara
2. 発表標題 FIGNL1-dependent removal of recombinases is essential for proper homologous recombination in mammalian meiosis
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤 将、篠原 彰
2. 発表標題 正の制御因子と負の制御因子を介した減数分裂組換え制御
3. 学会等名 第40回染色体ワークショップ・第21回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Anti-recombinase FIGNL1による減数分裂組換え制御
2. 発表標題 伊藤 将、松崎 健一郎、篠原 彰
3. 学会等名 第3回有性生殖研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 将、松崎 健一郎、篠原 彰
2. 発表標題 アンチリコンビナーゼによる減数分裂組換え制御
3. 学会等名 第26回 DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤 将、松崎 健一郎、篠原 彰
2. 発表標題 Anti-recombinase FIGNL1による減数分裂組換え制御
3. 学会等名 第39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 伊藤 将
2. 発表標題 RING型E3リガーゼRNF212Bによる減数分裂期交叉型組換え制御
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤 将
2. 発表標題 アンチリコンビナーゼFIGNL1による減数分裂期相同組換え制御
3. 学会等名 第50回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 将、篠原 彰
2. 発表標題 RAD51/DMC1を介した制御により明らかになる減数分裂組換え制御の性差
3. 学会等名 第27回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaru Ito
2. 発表標題 FIGNL1 AAA+ ATPase remodels RAD51 and DMC1 filaments during pre-meiotic DNA replication and meiotic recombination
3. 学会等名 MAYosis 2023（国際学会）
4. 発表年 2023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
---------	---------