

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790192

研究課題名（和文）哺乳類雄の減数分裂における XY body 形成の分子基盤と機能的意義

研究課題名（英文）Molecular basis and functional significance of XY body formation in mammalian male meiosis

研究代表者

向後 寛 (KOGO HIROSHI)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：20282387

研究成果の概要（和文）：哺乳類雄の減数分裂時に特異的に観察される XY body は、性染色体とそれを取り囲む特殊なヘテロクロマチン構造で、形成不全により精母細胞の細胞死が起こることが知られるが、その形成機構はこれまでほとんど明らかになっていない。本研究では XY body に局在する機能未知タンパク質 HORMAD2 を欠失したマウスを遺伝子ノックアウトにより作製し、XY body の形成には HORMAD2 による ATR キナーゼの活性化が重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The XY body is a specialized heterochromatic structure formed on the sex chromosomes during mammalian male meiosis. The failure of XY body formation leads to spermatocyte apoptosis, suggesting its crucial function in male gametogenesis. To date, however, the molecular basis of XY body formation has been largely unknown. In this study, we used gene targeting to generate mice lacking HORMAD2, a protein that localizes to the sex chromosome axes in mouse spermatocytes. Our results reveal that HORMAD2 is essential for the XY body formation via the recruitment of ATR activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：減数分裂、不妊症、無精子症、不育症

1. 研究開始当初の背景

有性生殖を行う生物において配偶子を形成するためには、染色体数を半減させる減数分裂が必要である。この特殊な細胞分裂を可能にするために重要な染色体動態の一つは、相同染色体間の対合である。相同染色体は相同組換えの機構を利用してお互いを認識し対合すると考えられ、対合がうまくいかなか

った場合にはチェック機構が働き、その細胞は除去される。一方で哺乳類の雄はXとYという非常に構造の異なる、つまり相同とは言えない染色体を性染色体の対として持っており、雄の性染色体が対合のチェック機構を回避して正常に分配されるためには特殊なメカニズムが必要と考えられる。実際に哺乳類雄の性染色体は減数分裂時には XY body と

呼ばれるヘテロクロマチン関連分子が集積した特殊な核内構造を形成し、転写や組換えが抑制された状態であることが知られるが、この現象の機能的意義や染色体分配機構への関与についてはまだ解明すべき点が多く残されており興味深い。私はこれまでの研究により、パキテン期精母細胞の性染色体に局在する機能未知分子の一つとしてHORMAD2を見いだした。またHORMAD2が進化的には鳥類と哺乳類にのみ見られることから、性染色体の二型性が顕著になることと関連した機能を持つ分子ではないかと推測した。これらの点を背景として、HORMAD2が哺乳類雄の減数分裂時の性染色体の動態やXY body形成において重要な機能を担う可能性について検討したいと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、パキテン期精母細胞の性染色体軸上に特異的に局在する分子HORMAD2について、遺伝子ノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析することにより、哺乳類雄の減数分裂におけるXY body形成の分子メカニズムに関する新規の知見を得ることを目的として研究を行った。またパキテン期精母細胞においてHORMAD2は高度にリン酸化されていたことから、リン酸化部位特異的抗体を作製し、リン酸化HORMAD2の局在を解析することによりそのリン酸化修飾の機能的意義を明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

(1) *Hormad2* 遺伝子ノックアウトマウスを作製し、HORMAD2を欠損した雄マウスの生殖能力の解析や、精巢の通常組織学および免疫組織化学により、HORMAD2欠損によって生じる表現型を解析した。

(2) HORMAD2を欠損した精母細胞の減数分裂期の染色体標本作製し、染色体の軸構造を形成する様々な分子や、XY bodyを構成する分子に対する免疫染色を行うことにより、相同染色体の対合の状態やXY bodyの形態などを詳細に解析し、XY bodyの形成過程においてHORMAD2が作用する分子機序を解析した。

(3) 既に報告されている複数のHORMAD2のリン酸化部位について、これらのリン酸化がいつどこで起こるのかを明らかにするため、いくつかのリン酸化部位に対しリン酸化特異的抗体を作製し、蛍光抗体染色を行った。

(4) HORMAD2の減数分裂に普遍的な機能についての知見を得るため、HORMAD2を欠損した雌の表現型についても生殖能力の解析や、卵巢の通常組織学および免疫組織化学による解析などを行った。特に対合不全によって卵

母細胞の細胞死が起こることが知られるSP011欠損雌マウスについて、HORMAD2との二重欠損マウスを作製し、HORMAD2が哺乳類の対合チェックポイントに関与する可能性を検討した。

4. 研究成果

(1) *Hormad2* 遺伝子ノックアウトマウスの妊性を解析した結果、雄のみが不妊であり、精巢重量は野生型の約1/3に減少し、組織学的解析の結果、パキテン期の精母細胞が細胞死を起こし無精子となっていた。

(2) HORMAD2欠損精母細胞の細胞死の原因を明らかにするため、免疫染色により染色体標本を観察したところ、相同染色体のペア形成や対合はほぼ正常であった。しかしXY bodyを観察すると、野生型では性染色体全体がヘテロクロマチン構造であるXY bodyの構成分子であるATRや γ H2AXに完全に取囲まれて存在するのに対し、HORMAD2欠損細胞では、性染色体の一部のみがATRや γ H2AXに取囲まれ、残りの部分はそのヘテロクロマチン構造の外に存在した。この結果からHORMAD2欠損によりXY body形成が異常になることで、性染色体の不活性化が不完全となるために精母細胞の細胞死が起こると考えられた。

(3) XY body形成に関与することが知られるDNA損傷応答因子(BRCA1、ATR、MDC1など)の動態にHORMAD2がどのように関与するのかを、正常精母細胞とHORMAD2欠損精母細胞の比較により解析した結果、HORMAD2欠損精母細胞ではBRCA1の性染色体軸上への局在は正常であるが、ATRの局在が異常になったことから、BRCA1に依存したATRの活性化の過程でHORMAD2が機能すると考えられた。

(4) 減数分裂において生理的なDNA切断を行うSP011との二重欠損マウスを作製して解析した結果、HORMAD2はDNA損傷に依存せずにDNA損傷応答因子、特にATRの活性化を引き起こす可能性が示唆された。このHORMAD2の活性は、DNA損傷に依存しない対合チェックポイントの機能に重要である可能性が示唆され非常に興味深い。

(5) マウスHORMAD2の2箇所リン酸化部位に対する特異的抗体を作製して免疫染色を行い、そのうち1箇所のリン酸化に対する抗体がパキテン期精母細胞の性染色体軸を特異的に染色した。今後さらに他のリン酸化部位に対する抗体などを作製して核内での局在とリン酸化修飾の関連を解析することで、各リン酸化とXY body形成の関連が推測できることが期待される。

(6) HORMAD2 欠損雌マウスの妊性は正常であり、HORMAD2 は減数分裂自体には必須ではないことが示された。一方、SP011 と HORMAD2 の二重欠損雌マウスを作製し、生後3週令の卵巣中の卵細胞数を解析すると、SP011 単独欠損雌マウスではほとんどの卵母細胞が細胞死を起こし、卵巣全体の卵の数が野生型の一割以下に減少したのに対し、SP011 と HORMAD2 の二重欠損の卵巣では野生型とほぼ同数の卵母細胞が存在した。この結果から、SP011 欠損による卵母細胞の細胞死、すなわち DNA 損傷に依存しない対合チェックポイントに HORMAD2 が必要であることが明らかになった。またこの細胞死には HORMAD2 による ATR の活性化が関与すると考えられた。

(7) HORMAD2 欠損マウスの雌雄の表現型から、雄の XY body 形成と雌の対合チェックポイントの両方において、HORMAD2 による ATR キナーゼの活性化が重要な役割を持つことが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Kogo, H., Tsutsumi, M., Ohye, T., Inagaki, H., Abe, T., Kurahashi, H. (2012) HORMAD1-dependent checkpoint/surveillance mechanism eliminates asynaptic oocytes. *Genes Cells*, 17: 439-454. 査読有、
DOI:10.1111/j.1365-2443.2012.01600.x
- ② Kurahashi, H., Tsutsumi, M., Nishiyama, S., Kogo, H., Inagaki, H., Ohye, T. (2012) Molecular basis of maternal age-related increase in oocyte aneuploidy. *Congenit. Anom. Kyoto*, 52: 8-15. 査読有、
DOI: 10.1111/j.1741-4520.2011.00350.x
- ③ Kurahashi, H., Ohye, T., Inagaki, H., Kogo, H., Tsutsumi, M. (2012) Mechanism of complex gross chromosomal rearrangements: a commentary on Concomitant microduplications of MECP2 and ATRX in male patients with severe mental retardation. *J. Hum. Genet.*, 57: 81-83. 査読有、
DOI:10.1038/jhg.2011.143
- ④ Kato, T., Inagaki, H., Tong, M., Kogo, H., Ohye, T., Yamada, K., Tsutsumi, M., Emanuel, B. S., Kurahashi, H. (2011) DNA secondary structure is influenced by

genetic variation and alters susceptibility to *de novo* translocation. *Mol. Cytogenet.*, 4(18): 1-8. 査読有、
DOI: 10.1186/1755-8166-4-18

- ⑤ Tsutsumi, M., Kogo, H., Kowa-Sugiyama, H., Inagaki, H., Ohye, T., Kurahashi, H. (2011) Characterization of a novel mouse gene encoding a SYCP3-like protein that re-localizes from the XY body to the nucleolus during prophase of male meiosis I. *Biol. Reprod.*, 85: 165-171. 査読有、
DOI:10.1095/biolreprod.110.087270
 - ⑥ Tong, M., Kato, T., Yamada, K., Inagaki, H., Kogo, H., Ohye, T., Tsutsumi, M., Wang, J., Emanuel, B. S., Kurahashi, H. (2010) Polymorphisms of the 22q11.2 breakpoint region influence the frequency of *de novo* constitutional t(11;22)s in sperm. *Hum. Mol. Genet.*, 19: 2630-2637. 査読有、
DOI: 10.1093/hmg/ddq150
- [学会発表] (計6件)
- ① 向後寛、堤真紀子、稲垣秀人、大江瑞恵、倉橋浩樹. 哺乳類の減数分裂における HORMAD2 の機能と対合異常の監視機構. 第117回日本解剖学会全国学術集会、甲府 (2012年3月28日)
 - ② 向後寛、堤真紀子、稲垣秀人、大江瑞恵、倉橋浩樹. HORMAD2 は哺乳類雌の減数分裂における対合チェックポイントに必要なものである. 第34回日本分子生物学会年会、横浜 (2011年12月13日)
 - ③ Kogo, H., Tsutsumi, M., Ohye, T., Inagaki, H., Kurahashi, H. HORMAD1-deficiency causes azoospermia in males and pregnancy loss in females. 12th International Congress of Human Genetics, Montreal (2011年10月12日)
 - ④ Kogo, H., Tsutsumi, M., Ohye, T., Inagaki, H., Kurahashi, H. HORMAD1-dependent synapsis checkpoint in mammalian meiosis. 2011 FASEB Summer Research Conferences "Genetic Recombination & Genome Rearrangements", Steamboat Springs (2011年7月26日)
 - ⑤ 向後寛、堤真紀子、稲垣秀人、大江瑞恵、

倉橋浩樹. 哺乳類雄の減数分裂における
HORMAD2 の機能. 第 116 回日本解剖学会
全国学術集会, 横浜 (誌上開催) (20
11年3月29日)

- ⑥ 向後寛、堤真紀子、稲垣秀人、大江瑞恵、
倉橋浩樹. 哺乳類雄の減数分裂における
HORMAD2 の機能. 第 33 回日本分子生物学
会年会, 神戸 (2010年12月9日)

[その他]

ホームページ等

<http://info.fujita-hu.ac.jp/~genome/mg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向後 寛 (KOGO HIROSHI)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助
教

研究者番号 : 20282387