

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15129

研究課題名（和文）減数分裂期におこるサブテロメア型組換えの分子基盤

研究課題名（英文）Molecular basis of subtelomeric recombination in meiosis

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：正確な染色体分配と多様性の創出を担う減数分裂期の相同組換えは、部位特異的なDNAの二重鎖切断（DSB）によって始まる。ヒトやゼブラフィッシュの精子形成では、テロメア近傍でDSBが起こりやすいことが知られている。本研究では、組換え初期にテロメア近傍へ局在するIho1が、ゼブラフィッシュのDSB形成に必須であることを明らかにした。また、DSB形成・テロメアブーケ構造・染色体軸構造とHormad1の変異体におけるIho1の局在解析から、Iho1のテロメア近傍への局在は、DSB形成とテロメアブーケ構造に非依存的であり、軸構造因子が重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組換えの理解は、ヒトにおける不妊・染色体異常や、生物の多様性を理解する上で重要な意義を持つ。DSBは組換えに必須である一方で、細胞に重篤な損傷をもたらす恐れがあり、厳密な制御を受ける。ヒトの精子形成にみられるサブテロメア型のDSB形成はマウスでは顕著でなく、研究モデルの欠如から、その分子基盤は全く明らかになっていなかった。本研究は、サブテロメア型のDSB形成メカニズムに着目した初めての研究であり、「ヒトの組換えメカニズムの理解」と「新規組換えメカニズムの理解」という観点から、重要な意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：Meiotic recombination plays an essential role in chromosome segregation during gametogenesis and promotes genome shuffling. Meiotic recombination is initiated by programmed DNA double-strand breaks (DSBs) that occur at discrete regions of a genome. In human and zebrafish males, DSBs are preferentially occur near at the end of chromosomes in unknown mechanisms. In this study, function and localization of Iho1 were analyzed in zebrafish. Analyses using Iho1 mutant zebrafish demonstrated that Iho1 is required for proper gametogenesis in both males and females. In zebrafish spermatocytes, Iho1 localizes near telomeres prior to DSB formation and is essential for DSB formation. Cytological analyses using meiotic mutant zebrafish lines supports an idea that subtelomeric localization of Iho1 occurs dependently of a component of chromosomal axes, but not the formation of telomere bouquet structure or Hormad1.

研究分野：減数分裂

キーワード：減数分裂 組換え ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

減数分裂期の組換えは、配偶子形成における正確な染色体分配を担うとともに、遺伝的多様性をもたらす重要なメカニズムである。減数分裂期の組換えは、DNAの二重鎖切断 (DNA double strand break: DSB) によって始まる。DSBは組換えに必須である一方で、細胞に重篤な損傷をもたらす恐れがあり、厳密な制御を受ける。このような制御の1つに、“ホットスポット”と呼ばれる部位特異的なDSBの形成がある。ヒトの精子形成では、染色体レベルでホットスポットが見られ、テロメア近傍で起こりやすい (Pratto *et al*, Science 2014)。しかしながら、この特徴はマウスでは顕著でなく、研究モデルの欠如から、「サブテロメア型」ホットスポットの形成メカニズムは全く明らかになっていなかった。本研究の研究代表者は、ゼブラフィッシュのオスで、DSBと減数分裂特有の染色体構造の形成がテロメア近傍で始まること、また、これらの構造の変異体では、組換えが異常となることを見つけた (Takemoto *et al*, Plos Genet 2020; Imai *et al*, Front Cell Dev Biol 2021)。また、マウスや出芽酵母のDSB形成に必須であるIHO1/Mer2のオルソログ (Iho1) が、組換え初期のテロメア近傍に局在することを発見しており、Iho1の特異的な局在により、これらの領域でDSBが起こりやすくなるのではないかと考えた。しかしながら、ゼブラフィッシュにおけるIho1の機能や局在メカニズムは全く明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒトの精子形成などに見られるサブテロメア型のDSB形成を担う因子を、ゼブラフィッシュをモデルとして明らかにすることである。特に、(1) サブテロメア型のDSB形成におけるIho1の機能、(2) Iho1の局在と減数分裂期特有の染色体構造の関係、(3) どのようにしてIho1がサブテロメア近傍にやってくるのかに着目して研究を行った。

3. 研究の方法

(1) サブテロメア型のDSB形成におけるIho1の機能を明らかにするために、CRISPR-Cas9法により作製した*ihol*欠失変異体 (*ihol* KO) と、218番目のアルギニンを欠失したアミノ酸欠失変異体 (*ihol* Δ R218)の表現型解析を行った。変異体におけるDSB形成を免疫細胞化学によって明らかにするとともに、生殖能を解析した。(2) Iho1の局在と減数分裂期特有の染色体構造の関係を明らかにするために、DSB形成やテロメアブーケ構造、染色体軸構造の変異体を用いて免疫細胞化学によるIho1の局在解析を行った。(3) Iho1のサブテロメアへの局在メカニズム明らかにするために、他の生物種においてIho1の局在を担うと考えられているHormad1に着目した解析を行った。

4. 研究成果

(1) サブテロメア型のDSB形成におけるIho1の機能

まず、サブテロメア型のDSB形成におけるIho1の役割を明らかにするために、CRISPR-Cas9によって作製した*ihol* KOゼブラフィッシュと*ihol* Δ R218ゼブラフィッシュの表現型解析を行った。これらの変異体の精巣抽出液をウエスタンブロッティングにより解析したところ、*ihol* KO精巣ではIho1タンパク質の発現が見られなかったのに対し、*ihol* Δ R218精巣では野生型と同レベルの発現が確認された。これらの変異体の生殖能を野生型ゼブラフィッシュとの交配により解析したところ、*ihol* KOオスは完全な不妊となり、*ihol* Δ R218オスは野生型と比べて低い受精率を示すことがわかった (図A)。この結果は、組織染色において*ihol* KO精巣では全く精子が観察されなかったのに対し、*ihol* Δ R218精巣では野生型に比べて少数の精子が観察されたこととも一致する (図B)。*ihol* KOメスは、野生型メスに比べて低い受精能を持ち、得られた胚は高い割合で発生異常となり、受精後5日 (5-dpf) までに70%以上が致死となった (図C, D)。*ihol* Δ R218メスを用いた交配実験でも同様の結果が得られた。これらの変異体メスでは、減数分裂の異常により異数性の卵が形成されていると推測される。以上の結果から、Iho1はゼブラフィッシュの正常な配偶子形成に必須であることがわかった。また、*ihol* Δ R218変異体では、Iho1タンパク質が発現しているにもかかわらず生殖能の低下が見られたことから、218番目のアルギニ

ンが Iho1 の機能に重要であることが示唆された。

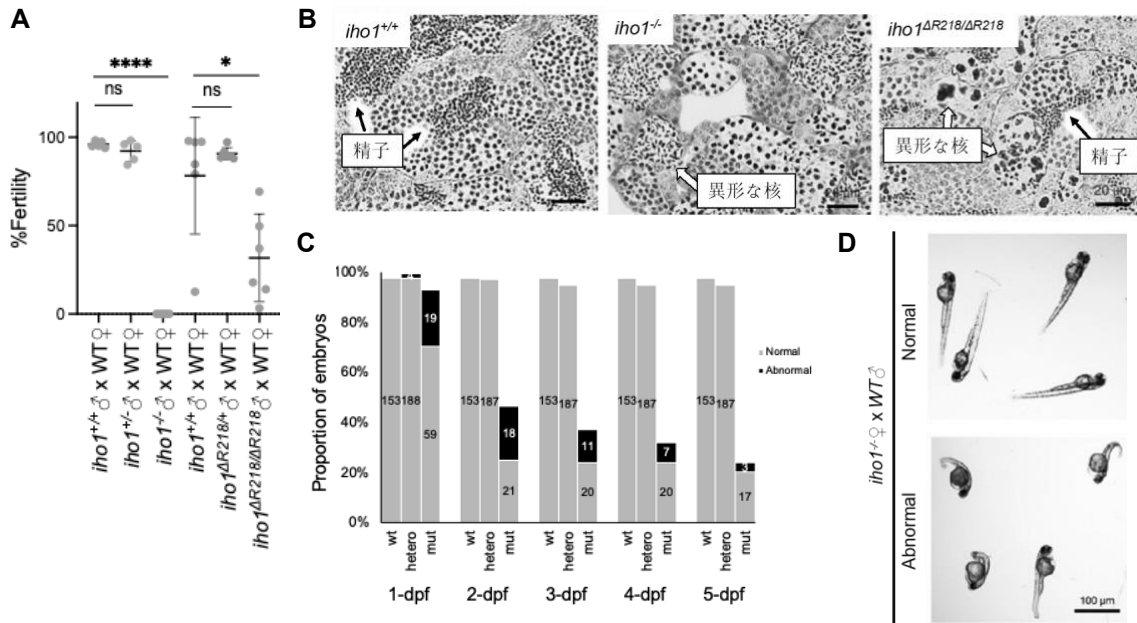


図: *iho1* 変異体ゼブラフィッシュの生殖能

A. 野生型メスと *iho1* KO オス (n=5) または *iho1* Δ*R218* オス (n=6) の交配結果。変異型ホモ接合体のオスでは、野生型に比べて有意に受精率が低かった。**B.** 野生型, *iho1* KO, *iho1* Δ*R218* 精巢切片の HE 染色像。**C.** *iho1* KO メスと野生型オスの交配結果。**D.** *iho1* KO メス由来の 2 日胚。

次に、ゼブラフィッシュ Iho1 が減数分裂期の DSB 形成に重要であるか明らかにするために、*iho1* KO 精巣から染色体スプレッドを作製し、免疫細胞化学により組換え過程を観察した。DSB の修復過程で形成される一本鎖 DNA に結合するリコンビナーゼ Dmc1 の染色を行ったところ、野生型では、DSB 形成の起こるレプトテンからザイゴテン初期に Dmc1 foci が見られたのに対し、*iho1* KO 精巣では Dmc1 foci がほとんど検出されなかった。つまり、Iho1 は DSB 形成または Dmc1 のローディングに必要だと考えられる。そこで、ガンマ線照射により人為的に DSB を誘導した *iho1* KO ゼブラフィッシュを用いて同様の観察を行ったところ、Dmc1 foci が見られたことから、Iho1 は Dmc1 のローディングではなく、DSB 形成そのものに必要であることがわかった。したがって、サブテロメア型の DSB 形成を行うゼブラフィッシュにおいても、出芽酵母やマウスと同様に、Iho1 は DSB 形成に必須の機能を持つことが明らかとなった。

(2) Iho1 の局在と減数分裂期特有の染色体構造の関係

減数分裂期の染色体は、タンパク性の軸構造にループ状のクロマチンが結合した軸-ループ構造をとり、軸構造は DSB 形成の足場になると考えられている。これらの染色体は、減数分裂特異的なテロメア複合体を介して染色体末端が核膜に接着しており (核膜-テロメア接着)、減数分裂初期にはテロメアが集めたブーケ構造をとる。ゼブラフィッシュの DSB 形成と軸形成は、ブーケ構造の形成に伴って起こることから、これらの過程と Iho1 の局在の関係について変異体を用いて解析した。減数分裂期の DSB 形成は、進化的に保存された Spo11-Topo6b スクレーパー複合体によって触媒され、ゼブラフィッシュ Spo11 も DSB 形成に必須である (Blokina et al, Plos Genet 2019; Takemoto et al, Plos Genet 2020)。そこで、*spo11* 変異体ゼブラフィッシュの染色体スプレッドを用いて、Iho1 の局在を観察したところ、Iho1 がテロメア近傍に停留していることがわかった。*spo11* 変異体では、DSB が起こらないことから、Iho1 は DSB 非依存的にテロメア近傍へローディングされることが示唆された。このような局在は、マウスの *Spo11* 変異体では見られないことから、サブテロメア型 DSB 形成の特徴であると考えられる。次に、Iho1 のテロメア近傍へのローディングがテロメアブーケ構造依存的に起こるかどうかが検討するために、減数分

裂期テロメア複合体の構成因子である *Terb2* と *Spo11* の二重変異体における *Iho1* の局在を観察した。その結果、*spo11* 単独の変異体と同様に、*Iho1* がテロメア近傍へ局在したことから、テロメアブーケ構造は *Iho1* のローディングにほとんど影響を与えないことが示唆された。また、染色体軸構造の構成因子である *Sycp2* の変異体において *Iho1* の局在を観察したところ、テロメアブーケ形成期においても *Iho1* シグナルが核全体に見られ、野生型のようなテロメア近傍への局在が見られなかった。以上の結果から、DSB 形成やテロメアブーケ構造ではなく、染色体軸構造もしくは *Sycp2* そのものが *Iho1* のテロメア近傍への局在に重要な役割を果たすことが明らかになった。

(3) *Iho1* の局在における *Hormad1* の役割

マウス *IHO1* は、染色体軸構造に局在する *HORMAD1* と相互作用する因子として同定された (Stanzione et al. Nat Cell Biol 2016)。これまでに、ゼブラフィッシュ *Hormad1* も減数分裂期の染色体軸に局在することを明らかにしている (Imai et al, Front Cell Dev Biol 2021)。そこで、サブテロメア型の DSB 形成における *Iho1* の局在と *Hormad1* の関係を明らかにするために、免疫細胞化学による解析を行った。まず、*Iho1* がテロメア近傍へ停留する *spo11* 変異体において *Hormad1* の局在を観察したところ、*Iho1* とは異なり、*Hormad1* は染色体軸全体に局在することがわかった。したがって、ゼブラフィッシュにおいては、*Hormad1* 依存的に *Iho1* の局在が決まるわけではないことがわかった。他生物種では *Hormad1* オルソログと *Sycp2* オルソログが相互作用することが知られていることから (West et al, 2019 Elife)、*sycp2* 変異体における *Hormad1* の局在を解析したところ、ゼブラフィッシュにおいても *Hormad1* の染色体への局在が完全に失われることがわかった。そこで、(2) で見られた *sycp2* 変異体における *Iho1* の局在変化が *Sycp2* と *Hormad1* のどちらの影響によるか調べるために、*hormad1* 変異体 (Hebrew 大学・Elkouby 研究室から提供) における *Iho1* の局在を解析した。その結果、*hormad1* 変異体では、染色体軸に局在しない *Iho1* のシグナルが、野生型に比べて核全体に多く見られた一方で、染色体軸上にも *Iho1* の局在が見られた。特に、減数分裂初期においては、テロメア近傍への *Iho1* の局在も見られた。以上の結果から、*Hormad1* は *Iho1* の染色体軸への局在に重要である一方で、テロメア近傍への局在における役割は限定的であり、*Sycp2* が重要な役割を果たすことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

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

1. 発表者名 Yukiko Imai
2. 発表標題 Disruption of the nuclear envelope-telomere attachment in zebrafish meiosis
3. 学会等名 1st Annual Symposium on Meiotic Chromosome Dynamics in Zebrafish
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井裕紀子
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの減数分裂組換えにおける核膜-テロメア接着
3. 学会等名 第3回有性生殖研究会「生殖の多様性」（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yukiko Imai
2. 発表標題 Initiation of meiotic recombination in zebrafish
3. 学会等名 RIKEN BDR Women and Future in Science Seminar（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井裕紀子
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ減数分裂における組換え開始
3. 学会等名 第1回 細胞分裂研究会（招待講演）
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		
イスラエル	The Hebrew University of Jerusalem		