

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20635

研究課題名（和文）オス減数分裂における性染色体に特異的なDNA損傷応答を司る分子基盤の解明

研究課題名（英文）Sex chromosome specific-mechanisms to regulate DNA damage response during mammalian male meiosis

研究代表者

阿部 洋典（Abe, Hironori）

熊本大学・発生医学研究所・特任助教

研究者番号：20914964

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：オスの減数分裂において非相同なペアを持つ XY 染色体では遺伝子が一斉に不活化する性染色体不活性化が起きる。性染色体不活性化の失敗は精母細胞の消失を誘導するため、これは減数分裂の成功に極めて重要な現象であるが、その制御機構の詳細は不明である。これまでに DNA 損傷応答（DDR）シグナルが性染色体不活性化の開始と維持に重要な役割を果たすことが分かっていた。本研究では性染色体特異的に DDR シグナルを活性化する分子機構を生化学的アプローチにより解明するための新規マウスツールを開発した。本研究を進めることで、減数分裂に特異的な DDR シグナル制御因子の新規発見が見込まれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DDR シグナルは損傷 DNA によって活性化されるが、性染色体では損傷 DNA が存在しなくても DDR シグナルが継続的に活性化される。このような現象は減数分裂に特異的であり、分子機構を理解することでその生物学的意義に迫ることができるようになる。減数分裂の失敗は不妊に直結することから、その制御機構の詳細な理解は生殖医療への貢献が期待できる。また DDR シグナルは体細胞分裂の制御にも極めて重要であり、その制御機構の破綻は細胞のガン化の引き金となる。そのため、本研究で開発した新規マウスツールはがん発生機序の解明やがん克服に向けた創薬研究における新規標的因子の探索への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In male meiosis, XY chromosomes, which have a non-homologous pair, undergo Meiotic Sex Chromosome Inactivation (MSCI) where genes are simultaneously inactivated. Failure of MSCI induces the loss of spermatocytes, indicating that MSCI is a crucial phenomenon for the success of meiosis. However, the molecular mechanisms of MSCI are poorly understood. We have demonstrated that DNA Damage Response (DDR) signaling plays an important role in the initiation and maintenance of sex chromosome inactivation. In this study, we have developed a new mouse tool to elucidate the molecular mechanisms that specifically activate DDR signaling on sex chromosomes. Advancing this research is expected to lead to the discovery of novel DDR signal regulatory factors specific to male meiosis.

研究分野：減数分裂

キーワード：減数分裂 精子形成 DNA損傷応答

## 1. 研究開始当初の背景

減数分裂ではDNAが倍化した後にプログラムされたDNA二重鎖切断 (DSB) が誘導され、核内全域でDNA損傷応答 (DDR) シグナルが惹起される。DDRシグナルはDNA修復系を活性化するシグナルカスケードである。減数分裂におけるDDRシグナルは相同染色体組換えを活性化し、DSBをゲノム情報に傷をつけることなく修復する。この時、減数分裂に特異的な染色体構造である相同染色体対合が形成され、これは減数第一分裂における相同染色体分配に必須である。さらにオス減数分裂におけるDDRシグナルはDSB修復だけでなく遺伝子発現制御にも関与している。オス減数分裂ではある時期を境に性染色体からの遺伝子発現が一斉に不活化される性染色体不活性化が起きる。その失敗は精母細胞のアポトーシスを誘導することから、性染色体不活性化は精子形成の成功に極めて重要なステップであると考えられるが、その分子機構は未解明の部分が多い。

マウスにおいて性染色体不活性化は7日間ほど継続され、これまでに我々は活性型DDRシグナルが性染色体不活性化の開始と維持に必須であることを報告している。重要なことに性染色体上のDSBは最初の3日ほどで修復されるにもかかわらず、性染色体不活性化の期間を通じて活性型DDRシグナルが性染色体ワイドに観察される。このことはDSBに由来しない未知のDDRシグナル活性化経路の存在を強く示唆している。また、DSBによる局所的な遺伝子不活化は体細胞においても観察されるが、染色体ワイドな遺伝子不活化は減数分裂に特異的な現象であり、その背後には性染色体制御に特化したDDR制御メカニズムの存在が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究ではオス減数分裂における性染色体特異的DDRシグナル活性化機構の分子基盤解明を目指した。

## 3. 研究の方法

DDRシグナルカスケードではATRキナーゼが最上流因子として機能している。性染色体不活性化が起きている精母細胞では性染色体クロマチンにATRの局在が観察される。そこで本研究ではATRキナーゼを性染色体にリクルートする未知の因子が存在すると仮説を立て、生化学的アプローチによる因子同定を計画した。具体的な方法として、減数分裂期にATRキナーゼと相互作用する因子を質量分析により網羅的に明らかにすることを計画した。ATRキナーゼは体細胞分裂の制御に重要であり、*Atr*ノックアウトは胚性致死であることが知られている。本研究においてはATRキナーゼに直接精製タグを導入することでキナーゼ活性が阻害され、細胞周期の乱れによる胚性致死や精子形成が阻害される可能性が考えられた。そこでATRキナーゼの活性化に機能するATRIPに精製タグを導入することにした。本研究ではATRIPのN末端およびC末端に精製タグとしてHA-3xFLAGを導入したマウスを新規作成した。

## 4. 研究成果

当初ATRIPのN末側に精製タグを導入したノックインマウスをCrispr/Cas9システムにより作成した。しかしF0マウスでは精製タグの一部を欠損したマウスが多く、予定の

精製効率が期待できない不完全なマウスとなった。また唯一精製タグが導入されたマウスにおいても腫瘍が発生して早期に死亡したため、マウスコロニー樹立に用いる次世代を得ることができなかった。体細胞分裂において ATR キナーゼが惹起する DDR シグナルは DNA 複製ストレスの解消に機能する。ATRIP の N 末端へのタグの導入により DDR シグナルが正常に機能せず、腫瘍が発生したと考えられる。次に ATRIP の C 末側へ精製タグを導入したマウスを新規に作成した。同マウスでは腫瘍の発生など個体レベルで明らかな異常は観察されず、また精製タグをホモに持つマウスも得ることができた。細胞染色の結果では精母細胞核における ATRIP の局在も正常であり、オスメス共にノックインホモマウスで妊孕性が確認されたことから減数分裂における ATR-ATRIP の相互作用や DDR シグナル制御に致命的な影響はないものと考えられた。現在マウスコロニーの樹立に成功し、精製タグを用いた免疫沈降と質量分析に向けたサンプルの採取を行っており、ATR-ATRIP と相互作用する新規の減数分裂因子の発見が十分に期待できるステージまで計画を進めることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>阿部 洋典, 荒木 喜美, 石黒 啓一郎               |
| 2. 発表標題<br>オス減数分裂において性染色体の不活化を支える分子基盤の解明      |
| 3. 学会等名<br>2022年度先端モデル動物支援プラットフォーム AdAMS成果発表会 |
| 4. 発表年<br>2023年                               |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|