

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590263

研究課題名(和文)哺乳類の減数分裂チェックポイントにおけるリン酸化シグナル

研究課題名(英文)Analysis of phosphorylation signals in mammalian meiotic checkpoints

研究代表者

向後 寛(KOGO, Hiroshi)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20282387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、哺乳類の減数分裂チェックポイントに重要な役割を果たすHORMAD1およびHORMAD2のリン酸化修飾に着目し、そのリン酸化のタイミングや染色体上の局在、チェックポイント機構における機能的意義を明らかにすることを目指した。これまでの解析により、多数の対合不全が生じた際にHORMAD1のSer307が顕著にリン酸化されることや、HORMAD2のSer284のリン酸化が、対合不全を生じた卵母細胞の細胞死を引き起こすメカニズムに関与する可能性を示すことができた。これらの結果は、哺乳類の減数分裂チェックポイントとその活性化の分子機構を解明する端緒となる成果である。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we analyzed the phosphorylation of HORMAD1 and HORMAD2, which are recently identified as key molecules for mammalian meiotic checkpoints. We generated phospho-specific antibodies against multiple phosphorylation sites of HORMAD1 and HORMAD2, and examined their distribution in mouse spermatocytes and oocytes by immunofluorescence staining. As a result, we found that HORMAD1 was phosphorylated at Ser307 along entire unsynapsed axes without any DNA double strand breaks. We also found that HORMAD2 phosphorylation at Ser284 was localized on the particular unsynapsed axes where pseudo sex bodies were formed, while HORMAD2 distributes along entire unsynapsed axes, suggesting that HORMAD2 phosphorylation at Ser284 might be involved in the activation process of synapsis checkpoint. These results provide clues to reveal the molecular mechanism of meiotic checkpoint signaling in mammals.

研究分野：細胞遺伝学

キーワード：減数分裂 チェックポイント リン酸化 対合不全 転写抑制 不妊 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

第一減数分裂前期に起こる相同染色体間の組換えや対合は、正確な染色体の分配に必須の現象であり、その正常な進行を監視・保証するチェックポイント機構が存在すると考えられるが、哺乳類におけるその分子機構は長らく不明であった。最近私たちは酵母の減数分裂チェックポイントに必須な遺伝子 Hop1 の哺乳類ホモログである *Hormad1* および *Hormad2* の遺伝子ノックアウトマウスを作製・解析し、その結果 HORMAD1 および HORMAD2 に依存した対合不全をチェックする機構(対合チェックポイント)が哺乳類の減数分裂において機能することを明らかにした。さらに HORMAD1 が HORMAD2 の機能に必要であり、対合不全を生じた卵母細胞の細胞死には、HORMAD2 に依存した meiotic silencing of unsynapsed chromatin (MSUC) と呼ばれる現象が重要なことも明らかになった。またこれまでに HORMAD2 は、対合不全が多数生じた際に、非対合部分全体に分布する一方、HORMAD2 に依存する MSUC は核内の 1 ヶ所のみで起こることがわかっていた。この興味深い現象をヒントとして、MSUC が起こる場所では HORMAD2 が活性化されるようなメカニズムがある、という仮説を立て、本研究ではこのメカニズムの候補として、リン酸化シグナルによる活性化機構の可能性を検討しようと考えた。具体的には、HORMAD1 および HORMAD2 のリン酸化修飾に着目し、そのリン酸化のタイミングや染色体上の局在、チェックポイント機構における機能的意義を明らかにすることで、哺乳類の減数分裂チェックポイントの活性化機構を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、哺乳類の減数分裂における減数分裂チェックポイントとそのリン酸化シグナル伝達の分子基盤を理解することであり、そのために必要な具体的な研究目標は以下の3つである。

- HORMAD1 および HORMAD2 の複数のリン酸化部位の同定とその修飾のタイミングや局在の解明
- HORMAD1 および HORMAD2 のリン酸化に依存した相互作用因子の同定
- 哺乳類の減数分裂チェックポイントに関するリン酸化・脱リン酸化酵素の同定

3. 研究の方法

(1) HORMAD1、HORMAD2 のリン酸化特異的抗体の作製

マウス各組織のリン酸化タンパク質の網羅的解析で検出されている HORMAD1 および HORMAD2 のリン酸化部位のうち、進化的に保存されているアミノ酸や予想されるキナーゼの情報などを元に、HORMAD1 については、Ser307 と Ser378、HORMAD2 については、Ser284 と Ser288 に着目し、それぞれの部位のリン酸

化特異的なウサギポリクローナル抗体を作製した。これらの抗体の特異性を検証するため、a) 染色体標本の脱リン酸化処理により各抗体の結合がリン酸基依存的であること、b) HORMAD1 または HORMAD2 を欠損した精母細胞を試料として、各抗体の結合が目的のタンパク質に特異的であること、などを確認した。

(2) 減数分裂染色体における HORMAD1/HORMAD2 のリン酸化の局在解析

野生型およびいくつかの減数分裂特異的遺伝子 (*Hormad1*, *Hormad2*, *Spo11*, *Dmc1*) 欠損マウスの成体精巣や出生前後の卵巣から、精母細胞および卵母細胞の染色体標本作製し、上述の HORMAD1 および HORMAD2 のリン酸化特異的抗体を用いた多重蛍光抗体染色法を行い、これらのリン酸化が起こる減数分裂のステージや核内局在などについて、詳細な形態学的解析を行った。

(3) 対合不全を生じた卵母細胞の細胞死の解析

具体的な研究目標の2つめに挙げたリン酸化依存的相互作用因子の同定は、当初正常精巣ライブラリーを用いた酵母ツーハイブリッド法を行う予定であったが、対合チェックポイントに機能する分子を探索するには、実際に対合チェックポイントが活性化される時期の卵母細胞で働く遺伝子をスクリーニング対象にする必要があると考えた。そのためにはまず対合不全を生じた卵母細胞の細胞死がいつ起こるのかを知る必要があった。そこでアポトーシスマーカーを cleaved PARP1、卵母細胞マーカーを SYCP3 として、squash 法を改良した方法で作製した卵巣(胎齢 18 日、生後 0、1、2 日)の全載標本の免疫染色を行い、SPO11 欠損(多数の対合不全を生じる)および HORMAD1 ヘテロ欠損(軽度の対合不全が生じる)の卵母細胞におけるアポトーシスの頻度を経時的に計測した。

4. 研究成果

(1) 対合チェックポイントの活性化と関連する HORMAD2 のリン酸化部位の同定

本研究で着目した HORMAD2 の Ser284 と Ser288 のリン酸化について、まず野生型精母細胞染色体標本の免疫染色により各リン酸化の局在を解析した結果、Ser284 のリン酸化は、ザイゴテン後期に残存する非対合部分の染色体軸上と、パキテン期の XY 染色体軸上、Ser288 のリン酸化はパキテン期の XY 染色体上に検出された。さらに詳細な解析を行い、Ser284 のリン酸化は、ザイゴテン期の対合不全部位に見られる γ H2AX 陽性のクロマチン領域と一致した局在を示す傾向が見られた。さらにこれらのリン酸化が HORMAD2 による対合チェックポイントの活性化機構(すなわち、MSUC による H2AX 陽性クロマチン領域の形成機構)に関与する可能性を検討するため、SPO11 欠損卵母細胞において MSUC の部位と一

致するかどうかを検討した。その結果、HORMAD2 は SP011 欠損で生じた多くの非対合染色体軸上全体に分布するのに対し、Ser284 のリン酸化は、H2AX 陽性クロマチン領域 (pseudo sex body と呼ばれる) の染色体軸上にその形成初期から常に検出されることが明らかになった。この結果は、減数分裂における MSUC の活性化に HORMAD2 の Ser284 のリン酸化が関与する可能性を示唆し、哺乳類の対合チェックポイントの分子機構を解明する端緒として重要な成果である。

(2) DNA 切断に依存せず対合不全に依存する HORMAD1 のリン酸化部位の同定

ウエスタンブロットによる解析で、SP011 を欠損した精母細胞や卵母細胞 (DNA 切断が形成されず対合不全を多数生じる) では HORMAD1 の大部分がリン酸化型で存在することが示されていたが、そのリン酸化部位や機能的意義は不明であった。Ser307 と Ser378 のリン酸化特異的抗体を用いた蛍光免疫染色により、野生型精母細胞では Ser307 と Ser378 のリン酸化はどちらもザイゴテン期の非対合部分やパキテン期の XY 染色体の軸上で検出された。しかし SP011 欠損精母細胞においては、Ser307 のリン酸化が非対合部分全体に見られる一方、Ser378 のリン酸化は pseudo sex body 部位にまれに検出される、という興味深い結果が得られた。この結果から、対合不全に依存する HORMAD1 の主要なリン酸化部位が Ser307 であることが明らかになった。マウス HORMAD1 のこれらのリン酸化は DNA 切断に依存しておらず、対合不全に依存して活性化される未知のキナーゼによって起こる可能性が示唆され、酵母 Hop1 のリン酸化が DNA 損傷に依存するのは対照的な結果であった。またそれぞれのリン酸化が異なる局在を示すことは、HORMAD1 の複数の機能の制御にそれぞれ異なるリン酸化修飾が関与する可能性を示唆しており興味深い。

(3) 対合チェックポイントによる卵母細胞の細胞死のタイミング

対合チェックポイントの活性化に重要と思われる HORMAD2 のリン酸化を同定できたことで、この HORMAD2 のリン酸化部位と相互作用する因子を同定し対合チェックポイントの分子機構について更なる知見を得たいと考えたが、チェックポイントの活性化の時点 (HORMAD2 Ser284 のリン酸化は胎齢 18 日頃) から卵母細胞の細胞死がどのようなタイミングでおこなわれるのか、という基礎的なデータが現状では不足していた。そこでまず対合不全を多数生じる SP011 欠損卵母細胞と比較的軽度の対合不全を生じる HORMAD1 ヘテロ欠損卵母細胞を材料として、対合不全による卵母細胞の細胞死のタイミングを詳細に解析した。その結果、胎齢 18 日の時点では、細胞死はあまり顕著ではなく、生後 0.5 日に、アポトーシスが顕著に増加することを明らか

にした。この結果から、ちょうど出生の時期に対合チェックポイントの活性化とそれに続く卵母細胞のアポトーシスが起ることが明らかとなり、その分子メカニズムを解析する試料としては、出生直後の卵巣が適しており、タンパク質レベルでの網羅的解析や酵母ツーハイブリッドスクリーニング用のライブラリー作製のための組織採取に必要な情報を得ることができた。

(4) リン酸化特異的相互作用因子の同定および関与するキナーゼの同定について

当初目標としていた HORMAD1 および HORMAD2 のリン酸化部位に相互作用する因子の同定は、残念ながら本研究の期間内に達成することはできなかったが、試料とするべき卵母細胞の採取時期を特定できたので、目的の達成に向けて一歩進むことができたと考えている。また HORMAD1 および HORMAD2 のリン酸化を行うキナーゼを同定したいと考え、基質配列の特徴や減数分裂染色体上の局在などの状況証拠から候補となるキナーゼを絞り込もうと考え、約 10 種類程度のキナーゼについて抗体を購入し、その局在解析を行った。その結果、HORMAD1 の Ser307 のリン酸化については CHK1 や MAPKAPKs など、HORMAD2 の Ser284 のリン酸化については CHK2 や MAPKAPKs などが、それぞれ有力な候補と考えられる結果を得たが、どちらも最終的な同定には至らなかった。

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 8 件)

Iizuka-Kogo, A., Senda, T., Akiyama, T., Shimomura, A., Nomura, R., Hasegawa, Y., Yamamura, K., Kogo, H., Sawai, N., Matsuzaki, T. Requirement of DLG1 for Cardiovascular Development and Tissue Elongation during Cochlear, Enteric, and Skeletal Development: Possible Role in Convergent Extension. PLoS One 10: e0123965, 2015. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0123965

Kagawa, Y., Yasumoto, Y., Sharifi, K., Ebrahimi, Majid., Islam, Ariful., Miyazaki, H., Yamamoto, Y., Sawada, T., Kishi, H., Kobayashi, S., Maekawa, M., Yoshikawa, T., Takaki, E., Nakai, Akira., Kogo, H., Fujimoto T., Owada Y. Fatty acid-binding protein 7 regulates function of caveolae in astrocytes through expression of caveolin-1. Glia 63: 780-794, 2015. 査読有
DOI: 10.1002/glia.22784

Tsutsumi, M., Fujiwara, R., Nishizawa, H., Ito, M., Kogo, H., Inagaki, H., Ohye, T., Kato, T., Fujii, T., Kurahashi, H. (2014) Age-related decrease of meiotic cohesins in human oocytes. PLoS ONE 9: e96710, 2014. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0096710

Susa, T., Sawai, N., Aoki, T., Iizuka-Kogo, A., Kogo, H., Negishi, A., Yokoo, S., Takata K., Matsuzaki, T. Effects of repeated administration of pilocarpine and isoproterenol on aquaporin-5 expression in rat salivary glands. Acta Histochem. Cytochem. 46: 187-197, 2013. 査読有
DOI: 10.1267/ahc.13037

Inagaki, H., Ohye, T., Kogo, H., Tsutsumi, M., Kato, T., Tong, M., Emanuel, B.S., Kurahashi, H. Two sequential cleavage reactions on cruciform DNA structures cause palindrome-mediated chromosomal translocations. Nat. Commun. 4: 1592 (10 pages), 2013. 査読有
DOI: 10.1038/ncomms2595

Kogo, H., Tsutsumi, M., Inagaki, H., Ohye, T., Kiyonari, H., Kurahashi, H. HORMAD2 is essential for synapsis surveillance during meiotic prophase via the recruitment of ATR activity. Genes Cells 17: 897-912, 2012. 査読有
DOI: 10.1111/gtc.12005

Kurahashi, H., Kogo, H., Tsutsumi, M., Inagaki, H., Ohye, T. Failure of homologous synapsis and sex-specific reproduction problems. Front. Genet. 3: 112 (11 pages), 2012. 査読有
DOI: 10.3389/fgene.2012.00112

Kogo, H., Tsutsumi, M., Ohye, T., Inagaki, H., Abe, T., Kurahashi, H. HORMAD1-dependent checkpoint/surveillance mechanism eliminates asynaptic oocytes. Genes Cells, 17: 439-454, 2012. 査読有
DOI:10.1111/j.1365-2443.2012.01600.x

[学会発表](計 9 件)

向後寛、青木友紀、向後晶子、澤井信彦、松崎利行 対合チェックポイントによるマウス卵母細胞の細胞死のタイミング

第 1 2 0 回日本解剖学会全国学術集会・第 9 2 回日本生理学会大会 合同大会、神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)(2015年3月22日)

菊池悠佳、向後寛、向後晶子、澤井信彦、松崎利行 対合不全により誘導されるマウスHORMAD1の主要なリン酸化部位の同定 第 1 2 0 回日本解剖学会全国学術集会・第 9 2 回日本生理学会大会 合同大会、神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)(2015年3月21日)

向後寛、菊池悠佳、向後晶子、澤井信彦、倉橋浩樹、松崎利行 DNA損傷に依存しないマウスHORMAD1のリン酸化部位の同定 第 3 7 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)(2014年11月26日)

向後寛、菊池悠佳、山口亮、向後晶子、澤井信彦、松崎利行 リン酸化特異的HORMAD1抗体の作製と対合不全により誘導されるリン酸化の同定 第 6 1 回北関東医学会総会、群馬大学医学部刀城会館(群馬県前橋市)(2014年9月25日)

向後寛、向後晶子、倉橋浩樹、松崎利行 HORMAD1 のハプロ不全による卵母細胞の減少とそのメカニズムの解析 第 1 1 9 回日本解剖学会全国学術集会、自治医科大学(栃木県下野市)(2014年3月29日)

向後寛、堤真紀子、向後晶子、倉橋浩樹、松崎利行 卵母細胞の meiotic silencing of unsynapsed chromatin に必要なマウス HORMAD2 のリン酸化 第 3 6 回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場・国際展示場・ポートピアホテル(兵庫県神戸市)(2013年12月3日)

Kogo, H., Tsutsumi, M., Iizuka-Kogo, A., Kurahashi, H., Matsuzaki, T. HORMAD2 phosphorylation may be involved in the initiation of meiotic silencing of unsynapsed chromatin. EMBO conference on meiosis 2013、ドレスデン(ドイツ)(2013年9月17日)

向後寛、倉橋浩樹、松崎利行 哺乳類の減数分裂における対合不全チェック機構と HORMAD2 のリン酸化 第 1 1 8 回日本解剖学会全国学術集会、サンポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県高松市)(2013年3月29日)

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対
合チェックポイントと HORMAD2 のリン酸
化 第35回日本分子生物学会年会、福岡
国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県福
岡市)(2012年12月13日)

〔その他〕

ホームページ等

<http://anatcb.dept.med.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向後 寛 (KOGO, Hiroshi)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20282387