

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08461

研究課題名(和文) 減数分裂染色体タンパク質のステージ特異的リン酸化とその機能的意義

研究課題名(英文) Substage-specific protein phosphorylations on chromosome axes during mammalian meiotic prophase I.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の第一減数分裂において多様な機能を持つHORMAD1には、複数のリン酸化状態が存在する。これらのリン酸化状態の機能的意義を明らかにする目的で、各リン酸化状態を特異的に検出する抗体を作製した。これらの抗体を使用した形態学的解析により、HORMAD1は第一減数分裂前期の各サブステージで異なるリン酸化状態を示すことが明らかになった。本研究の成果は、HORMAD1の多様な分子機能の解明や、減数分裂の細胞周期制御の分子機構の解明に役立つ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、哺乳類の減数分裂において重要な役割を果たすHORMAD1の多様なリン酸化状態を識別することができ、抗体を樹立することに成功した。これらの抗体は、第一減数分裂の複数のサブステージを見分けるマーカーとしても有用である。HORMAD1の分子機能の解明により哺乳類の減数分裂の新たな分子メカニズムを理解することは、不妊や不育といった生殖関連疾患の原因解明に必要な基礎的知見として重要である。また本研究は将来的に減数分裂における細胞周期制御機構の解明につながる研究課題である。

研究成果の概要(英文)：HORMAD1 plays multiple roles in mammalian meiosis, and shows multiple phosphorylation states. The relationship between the phosphorylation status and its molecular function is unknown. In this study, I established specific monoclonal and polyclonal antibodies recognizing each phosphorylation status of mouse HORMAD1. Using these antibodies, I found that HORMAD1 shows different phosphorylation status in a substage-dependent manner during meiotic prophase I. The results obtained from this project provide important knowledge for molecular basis of the multiple roles of HORMAD1, and for unsolved molecular mechanism of meiotic cell cycle regulation.

研究分野：細胞遺伝学

キーワード：減数分裂 リン酸化 チェックポイント 細胞周期 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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染色体数を半減させる減数分裂は本質的な現象である。この特殊な細胞分裂を可能にする染色体動態として、相同染色体間の組換えや対合が正しく行われることが重要である。減数分裂時の染色体動態の概要としては、レプトテン期に DNA 切断酵素である SPO11 による DNA 切断と DMC 1 による相同組換え修復が機能することで相同染色体同士が互いを認識し、ザイゴテン期に対合構造(シナプトネマ複合体)が形成される。パキテン期に交叉が形成されたのちディプロテン期に対合が解消され、第一減数分裂の準備が整う。本研究課題で着目する HORMAD1 の酵母ホモログである Hop1 は、酵母の減数分裂に必須の分子で、その機能にリン酸化が必須である。さらにリン酸化特異的抗体による解析で、リン酸化 Hop1 は染色体軸上で特徴的な局在様式を示しており、リン酸化が生じる場所とタイミングはその機能を反映すると考えられる。

HORMAD1 欠損マウスを作製し表現型解析を行うことにより、マウス HORMAD1 が 1) レプトテン期に DNA 切断と組換えを促進する作用、2) ザイゴテン期に DNA 切断に依存せずに対合を促進する作用、3) ザイゴテン期後期に対合不全が生じた際に細胞周期を停止する作用、4) 多数の対合不全を生じたパキテン期卵母細胞に細胞死を引き起こす、などの多様な機能に必要なことをこれまで明らかにした。また他のグループによるマウス各組織のリン酸化タンパク質のプロテオーム解析により、HORMAD1 には 7ヶ所のリン酸化部位があり、様々なリン酸化状態があることが示されている。私は HORMAD1 の多様な機能とリン酸化状態が関連する可能性を検討したいと考え、特に HORMAD1 の Ser307 周辺の 4 種類のリン酸化状態 (0P、1P、2Pa、2Pb : 詳細は後述) を見分けることが可能な特異的モノクローナル抗体の作製を試みた (ラットリンパ節法による。重井医学研究所との共同研究。)。その結果、Ser307 単独リン酸化(1P)、Ser305+Ser307 の 2ヶ所リン酸化(2Pa)については、免疫染色による形態学的解析に利用できる特異的モノクローナル抗体の樹立に成功したが、非リン酸化型(0P)や Ser307+Ser309 の 2ヶ所リン酸化(2Pb)については、免疫染色に利用可能なモノクローナル抗体は樹立できなかった。

これらの抗体を使用した予備的な結果として、レプトテン期からザイゴテン期前期の非対合部分全体には Ser307 単独リン酸化(1P)が見られ、ザイゴテン期からパキテン期に存在する非対合部分では Ser305 のリン酸化が追加され 2Pa のリン酸化状態になる、という結果を得た。一方で、ディプロテン期の対合解消部位にも HORMAD1 が局在するが、1P および 2Pa はほとんど検出されなかった。この結果は、ディプロテン期の対合解消部位において HORMAD1 はパキテン期以前とは異なるリン酸化状態である可能性を示しており、これまでほとんど研究がなされていない対合解消のメカニズムに HORMAD1 の特定のリン酸化状態が関与する可能性は非常に興味深い。HORMAD1 欠損マウスの精母細胞はパキテン期に細胞死を起こすため、ディプロテン期における HORMAD1 の機能はこれまで解析できていなかったが、特異的なリン酸化状態が機能的に重要であれば、将来的にゲノム編集の手法により点変異導入マウスを作製することでその機能解析を行うことが可能となる。またシナプトネマ複合体に局在するタンパク質の多くが HORMAD1 を含めてリン酸化修飾を受けることが報告されているが、現在のところ、その機能的意義は未解明であり、リン酸化を行うキナーゼもほとんど未同定である。過去の報告としては、いくつかのサイクリン依存性キナーゼファミリー分子のシナプトネマ複合体上への局在が報告されているが、その理解もまだ不十分である。本研究は HORMAD1 の各ステージ特異的なリン酸化を主な解析対象とするが、その結果同定されるキナーゼはシナプトネマ複合体上で HORMAD1 だけではなく他のタンパク質のリン酸化も行う可能性が高いと思われる。各ステージのシナプトネマ複合体で機能するキナーゼを同定することができれば、減数分裂の進行過程に必要なイベントが正確に順序よく進行するための制御機構の解明へとつながる重要な知見になる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HORMAD1 の多様なリン酸化状態の機能的意義を明らかにすると共に、減数分裂の各ステージにおいてシナプトネマ複合体上で機能するリン酸化シグナルの分子基盤を解明することであり、具体的な研究目標は以下の 3 つであった。

1. 特異的モノクローナル抗体による HORMAD1 の各リン酸化状態のタイミングや染色体上の位置の形態学的解明
2. HORMAD1 の各リン酸化状態特異的に相互作用するタンパク質の同定
3. 減数分裂の各ステージ特異的にシナプトネマ複合体上で機能するキナーゼの同定

3. 研究の方法

(1) 多重蛍光免疫染色による HORMAD1 の各リン酸化状態の形態学的解析

HORMAD1 のリン酸化状態と減数分裂機能の関連を検討するため、野性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 のリン酸化状態特異的抗体を用いた多重蛍光免疫染色法を行い、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、他の減数分裂関連タンパク質 (特に DNA 切断や修復関連分子: MEI4, RAD51 など) との共局在などについて、形態学的解析を行った。

(2) モノクローナル抗体を樹立できなかったリン酸化状態に特異的なポリクローナル抗体の作製

HORMAD1 Ser307 周辺のリン酸化状態について、前述の 0P および 2Pb 特異的なモノクローナル抗体が作製出来なかったため、0P および 2Pb (実際にはリン酸化 Ser309) に対するウサギポリクローナル抗体の作製を行った。特異的抗体を精製するため複数のペプチドに対するアフィニティ精製を行い、精製した抗体の特異性について様々なリン酸化ペプチドに対する結合をドットプロットにより検証した。また、これらの抗体の免疫染色における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脱リン酸化やリン酸化に依存すること、b) HORMAD1 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。

(3) ゲノム編集によるリン酸化部位変異マウスの作製と表現型解析

ゲノム編集によるリン酸化部位変異マウスの作製は、リン酸化依存的に結合する因子を生化学的に分離し質量分析法により同定するために重要なツールとして、当初の計画では可能であれば最終年度に着手する予定であった。しかし、まずはゲノム編集マウスの作製経験を積むため、より手技的な問題が少ないターゲットとして近縁分子である HORMAD2 の Ser284 について、アラニン (非リン酸化型) やアスパラギン酸 (リン酸化模倣型) に置換した変異マウスの作製を行うこととした。具体的な理由としては、マウス HORMAD2 は両アリルが欠損した場合でも雌の妊性は保たれるので、ゲノム編集によって効率よく両アリルに変異が導入されてもおそらく子孫を得られることや、遺伝子配列的に標的の Ser284 のゲノム編集を効率よく行えそうだったこと等が挙げられる。これらの変異マウスの表現型については、主に卵巣重量や卵母細胞数の解析を行った。

(4) キナーゼ候補遺伝子欠損マウスの解析とその他の関与するキナーゼの探索

HORMAD1 2Pa の細胞内局在解析の結果から、HORMAD1 Ser305 のリン酸化には DNA 切断の存在が関与しており、そのモチーフ配列から DNA 切断により活性化される ATM によるリン酸化が想定されたため、Atm 遺伝子欠損マウスを入手し、Ser305 のリン酸化への関与について検証した。また Ser307 のリン酸化について、関与するキナーゼを探索する目的で各種細胞周期関連キナーゼの抗体を入手し、多重蛍光免疫染色による共同解析を行った。

4. 研究成果

(1) マウス HORMAD1 Ser307 周辺のリン酸化状態と機能の関係

以前の野性型精母細胞での予備的解析では、Ser307 の単独リン酸化 (1P) は減数分裂の初期から非対合部分に普遍的に存在するのに対し、Ser305 への追加的なリン酸化により見られるリン酸化状態 (2Pa) は、ザイゴテン期以降の非対合部分に見られ、対合チェックポイントの活性化によるヒストン H2AX のリン酸化 (ATR が関与) と関連すると考えられた。しかし、その後の各種遺伝子欠損マウス精母細胞での解析により、Ser305 のリン酸化 (2Pa) は SP011 を欠損した精母細胞ではほとんど見られず、DMC1 を欠損した精母細胞では、レプトテン期後期からザイゴテン期前期にかけて一過性に増加した。この結果は、Ser305 のリン酸化が未修復の DNA 切断の存在量と相関して変化することを示す。さらにリン酸化部分の配列 (SQ モチーフ) から、この HORMAD1 のリン酸化が、「ATM キナーゼによる DNA 切断に対する負のフィードバック機構」において機能する、という仮説が想定されたため、後述する ATM 欠損マウスを用いた解析を行った。

また、SP011 による DNA 切断に必要な因子である MEI4 と Ser305 のリン酸化の減数分裂染色体軸上の局在を比較したところ、MEI4 の染色体軸上への分布は Ser305 のリン酸化よりも明らかに早期に見られた。この結果から、Ser305 のリン酸化は SP011 による DNA 切断よりも後のステップで起こる現象、例えば相同染色体間の組換えなどに関与する可能性が考えられた。予備的な結果ながら、組換え関連分子である RAD51 foci と Ser305 のリン酸化 (2Pa) には部分的な共同が見られた。今後さらに 2Pa のリン酸化状態と DNA 相同組換え複合体との関係についての解析を進める予定である。これらの結果の一部は、日本分子生物学会および日本解剖学会で既に発表を行っており、現在論文として発表する準備を進めている。

(2) ポリクローナル抗体による他のリン酸化状態の局在解析

HORMAD1 の非リン酸化型ペプチド (0P) および Ser309 リン酸化ペプチドに対するポリクローナル抗体を作製し、数段階のアフィニティ精製を行いドットプロットによる結合性の評価を行った結果、0P 特異的抗体 (1P、2Pa、2Pb の全てと交差しない) および 2Pb 特異的抗体 (0P、1P、2Pa に交差せず、内在的に存在しない Ser309 単独リン酸化には結合する) の作製に成功し、これらの抗体を用い多重蛍光免疫染色を行った。その結果、非リン酸化型 HORMAD1 (0P) は、レプトテン期からパキテン期の染色体軸上には検出されず、ディプロテン期の脱対合部分の染色体軸上で強く検出された。一方、リン酸化 Ser309 (2Pb) は、第一減数分裂の全てのサブステージにおいて HORMAD1 の他のリン酸化が見られる部位にごく弱く検出されるのにとどまり、ほとんど検出されなかった。これまでの結果を統合すると、第一減数分裂前期の染色体軸上において、野性型マウス精母細胞では、レプトテン期の早期から普遍的に見られる Ser307 単独リン酸化状態 (1P)、それに加えて DNA 切断の存在に依存する Ser305 の追加的なリン酸化 (2Pa) がパキテン期まで見られるのに対し、対合が解消されるディプロテン期においては、ほぼ非リン酸化型 (0P) であることが明らかになった。このようにマウス HORMAD1 が各サブステー

ジに特異的なリン酸化状態を示すという結果は、減数分裂時の細胞周期の進行とともに、様々なリン酸化によってHORMAD1の機能が調節される可能性を示唆しており、非常に興味深い現象である。今後これらのリン酸化状態とHORMAD1の多様な機能の関係を明らかにすることが重要であり、そのためにはゲノム編集による点変異マウスの作製とその表現型解析が有用である。これらの成果は、補助事業期間の延長を行うことで達成され、結果の一部を日本分子生物学会および日本解剖学会で既に発表を行い、現在論文として発表する準備を進めている。

(3) ゲノム編集によるHORMAD2のリン酸化部位特異的変異体の作製

HORMAD1の近縁分子であるHORMAD2について、以前にリン酸化特異的抗体を用いた形態学的解析によりSer284のリン酸化が対合チェックポイント機構に關与する可能性を示唆する結果を得ている。このリン酸化の機能を直接的に検討するため、Ser284をアラニン(Ala284:非リン酸化型)やアスパラギン酸(Asp284:リン酸化模倣型)に置換したゲノム編集マウスの作製を行い、実際にこれらの点変異を導入することに成功した。遺伝的背景の均一化を進めながら行った予備的な結果として、非リン酸化型およびリン酸化模倣型の雌雄共に妊性は正常であったが、非リン酸化型雌では野性型雌より小さい卵巣をもつ個体が多く見られ、卵母細胞の細胞死が亢進する可能性が示唆された。また対合不全を多数生じるSP011欠損との二重変異体を作製した結果、SP011単独欠損雌に比べてリン酸化模倣型雌の卵巣は有意に大きく、リン酸化模倣型雌では対合不全による卵母細胞の細胞死が抑制される可能性が示された。以上の結果は、HORMAD2 Ser284のリン酸化によって対合不全による卵母細胞の細胞死(対合チェックポイント)が抑制的に制御されることを示唆しており非常に興味深い。これらの結果について、日本分子生物学会および日本解剖学会で発表を行った。この変異体作製は、当初の計画であるHORMAD1のリン酸化と相互作用する分子の同定には結びついていないが、この結果を基にした研究課題「減数分裂チェックポイントによる細胞死誘導とその制御機構」が基盤研究(C)に新たに採択された。

(4) ATM欠損マウス精母細胞におけるHORMAD1 Ser305のリン酸化の解析と他の細胞周期関連キナーゼの減数分裂染色体上の局在解析

HORMAD1 Ser305のリン酸化(2Pa)について、そのリン酸化酵素がATMキナーゼである可能性を示唆する結果を得ている。ATM欠損マウス精母細胞の染色体標本を用いて検証した。その結果、予想に反しATM欠損マウスの精母細胞においてもSer305のリン酸化は観察され、先の仮説は否定された。HORMAD1 Ser305のリン酸化は、ATMキナーゼに依存するDNA切断の負のフィードバック機構ではなく、前述のようにDNA切断より後のDNA相同組換え修復のステップに關与する可能性が高いと考えている。今後このリン酸化の機能を直接的に検討するためには、ゲノム編集によりSer305の非リン酸化型およびリン酸化模倣型変異マウスを作製することが有用であると考えている。

またHORMAD1 Ser307のリン酸化について、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む目的で、精巣での発現が確認されている細胞周期関連キナーゼ(SPモチーフを基質とすることが知られるCDK3、CDK4、CDK7、CDK9など)について抗体を購入し、その局在解析を行ったが、各リン酸化HORMAD1と共局在を示すキナーゼは見られなかった(未発表)。実際には未知のキナーゼが關与する可能性が考えられるので、HORMAD1との相互作用因子からのアプローチ等によりSer307のリン酸化を行うキナーゼの同定が重要であると考えている。第一減数分裂前期の細胞周期制御の分子メカニズムやリン酸化シグナルは未解析の分野であり、今後解明すべき重要なテーマであると考えている。

全体のまとめとして、本研究の目標のうち、HORMAD1の各リン酸化状態のタイミングや染色体上の位置の形態学的解明はほぼ達成できたが、HORMAD1の各リン酸化状態特異的に結合する因子の同定は行うことができなかった。この目標を達成するには、HORMAD1 Ser307周辺のリン酸化部位の変異マウスを作製し、各変異HORMAD1への結合分子の比較解析を行うことが必要と考えている。また關与するキナーゼの同定も重要な課題であったが残念ながら達成できなかった。実際の同定に至るためには、今後より多面的なアプローチが必要と感じている。これらの解析により減数分裂の進行に關わる調節機構を解明することは、ヒトの不妊や不育の少なくとも一部の原因となる分子基盤の理解に繋がり、更には将来的に行われる可能性があるin vitroでの配偶子形成の品質管理を行うために必須の課題になると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akie Taniguchi, Taketo Susa, Hiroshi Kogo, Akiko Iizuka-Kogo, Satoshi Yokoo and Toshiyuki Matsuzaki	4. 巻 52
2. 論文標題 Long-term Pilocarpine Treatment Improves Salivary Flow in Irradiated Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Histochemica et Cytochemica	6. 最初と最後の頁 45-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.19006	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 Vera Rinaldi, Ewelina Bolcun-Filas, Hiroshi Kogo, Hiroki Kurahashi, John C.Schimenti	4. 巻 67
2. 論文標題 The DNA Damage Checkpoint Eliminates Mouse Oocytes with Chromosome Synapsis Failure	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 1026-1036
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molcel.2017.07.027	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 Kinue Shimizu, Megumi Sano, Aoi Kita, Nobuhiko Sawai, Akiko Iizuka-Kogo, Hiroshi Kogo, Takeo Aoki, Kuniaki Takata, Toshiyuki Matsuzaki	4. 巻 77
2. 論文標題 Phosphorylation and dephosphorylation of aquaporin-2 at serine 269 and its subcellular distribution during vasopressin-induced exocytosis and subsequent endocytosis in the rat kidney.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Archives of Histology and Cytology	6. 最初と最後の頁 25-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1679/aohc.77.25	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 向後 寛、新井 瑞生、菅原 佳希、菊池 悠佳、向後 晶子、松崎 利行
2. 発表標題 第一減数分裂前期におけるマウスHORMAD1のリン酸化状態の同定と局在解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向後 寛、菅原 佳希、新井 瑞生、菊池 悠佳、向後 晶子、松崎 利行
2. 発表標題 第一減数分裂前期の各サブステージにおけるHORMAD1のリン酸化状態
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向後寛、佐復千春、岩崎日菜子、向後晶子、堀居拓郎、畑田出穂、松崎利行
2. 発表標題 マウスHORMAD2のリン酸化による対合不全チェック機構の抑制的制御
3. 学会等名 第124回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向後晶子、中塩莞人、前田皓、向後寛、松崎利行
2. 発表標題 マウス内耳コルチ器の収斂伸長過程でPAR3は伸長ジャンクションに局在する
3. 学会等名 第124回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向後寛、岩崎日菜子、佐復千春、向後晶子、堀居拓郎、畑田出穂、松崎利行
2. 発表標題 マウスHORMAD2のリン酸化による対合チェックポイント活性の調節
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 向後寛、向後晶子、松崎利行
2. 発表標題 ゲノム編集によるマウスHORMAD2リン酸化の機能解析
3. 学会等名 第123回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 向後晶子、今井愛理、根本奏子、向後寛、松崎利行
2. 発表標題 Dlg1はコルチ器の収斂伸長における新たな細胞間ジャンクションの形成に関与する
3. 学会等名 第123回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷口明慧、向後晶子、向後寛、横尾聡、松崎利行
2. 発表標題 ピロカルピン長期投与が放射線照射による唾液腺機能低下に及ぼす影響
3. 学会等名 第123回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 向後寛、大森愛、櫻井美久、向後晶子、松崎利行
2. 発表標題 マウス精巣におけるアクアポリン11の局在と機能
3. 学会等名 第122回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 向後寛、櫻井美久、大森愛、向後晶子、松崎利行
2. 発表標題 アクアポリン11欠損マウス精巢の表現型解析
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室HP http://anatchb.dept.med.gunma-u.ac.jp/ 個人HP https://sites.google.com/gunma-u.ac.jp/hkogo

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
研究協力者	松山 誠 (Matsuyama Makoto)	重井医学研究所・分子遺伝部門・部長	モノクローナル抗体の作製
研究協力者	堀居 拓郎 (Horie Takuro)	群馬大学・生体情報ゲノムリソースセンター・准教授	ゲノム編集マウスの作製