

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 9 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06642

研究課題名（和文）哺乳類生殖細胞における減数分裂開始時のクロマチン高次構造変換メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of chromatin higher-order structural conversion during meiosis initiation in mammalian germ cells

研究代表者

高田 幸（Takada, Yuki）

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：40392013

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、哺乳類における体細胞系列から生殖細胞系列への核内クロマチン高次構造変換機構の解明を目的とする。減数第一分裂期では、体細胞分裂期にある細胞とは異なった、特有の染色体動態及び構造変換が認められる。しかし、体細胞分裂を行う生殖幹細胞から、減数分裂期にある生殖細胞への遷移期の複雑な染色体の挙動と、それに伴った核内クロマチン高次構造の変換機構には不明な点が多い。そこで、本研究では減数分裂型インスレーターおよびコヒーシタンパク質に焦点を当て、それぞれの相互作用因子の探索、生殖細胞核内における結合領域のゲノムワイドな同定により、この機構を明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体細胞分裂により増殖した生殖幹細胞が減数分裂期へエントリーする遷移期の複雑な染色体の挙動と、それに伴う核内クロマチン高次構造のスイッチング機構には不明な点が多い。解析対象となる細胞集団が生体内においてごく少数であることから、我々は高い純度で効率よくサンプルを確保する手法を確立し、さまざまなアプリケーションに対応できるようにできたことは非常に大きい進歩である。本研究課題による成果をもとにした基礎医学的な理解が、社会問題となっているヒトの不妊疾患の原因究明や創薬・治療法確立の基盤になると考えている。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to elucidate the mechanism of nuclear chromatin higher-order structural conversion from somatic to meiotic lineages in mammals. In meiosis I, specific chromosomal dynamics and structural transformations are observed, which are different from those of cells in somatic cell division. However, the complex behavior of chromosomes during the transition from somatic to meiotic germ cells and the associated conversion mechanisms of nuclear chromatin higher-order structures are still unknown. In this study, we focus on meiotic insulator and cohesin proteins to elucidate this mechanism by identifying for their interaction factors and genome-wide analysis of their binding regions to the genome in the germ cell nucleus.

研究分野：発生生物学

キーワード：哺乳類 減数分裂 コヒーシタンパク質 インスレータータンパク質 クロマチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

減数第一分裂期では、組換えによる多様性の創出と次世代への遺伝情報の正確な分配に先駆けて、特有の染色体動態及び構造変換が認められる。しかし、体細胞分裂により増殖した生殖幹細胞が減数分裂期へエントリーする遷移期(pre-meiotic S 期)の複雑な染色体の挙動と、それに伴う核内クロマチン高次構造のスイッチング機構には不明な点が多い。近年、体細胞系列ではインスレーター結合タンパク質 CTCF とコヒーシオン Scc1/Rad21 の協調的な作用によりループ形成を行い、ゲノムを Topologically Associated Domain(TAD)と呼ばれる機能ドメインに区画化している可能性が報告されている。一方生殖細胞では、CTCF の減数分裂型パラログ Boris/CTCF-Like(CTCFL)の存在が明らかにされてはいるが、標的領域については生体内での機能についてはほとんど明らかになっていない。さらに、生殖細胞では減数分裂期直前に減数分裂型コヒーシオン Rad21L 及び Rec8 が体細胞型コヒーシオン Scc1 に置き換わってクロマチンに結合する。申請者所属研究室において、Rad21L 及び Rec8 遺伝子欠損マウスの解析からそれぞれの機能は明らかになりつつあるが、どのように染色体構造変換やその動態に関与しているか作用機序は未だ不明である。減数分裂型コヒーシオン Rad21L 及び Rec8 もクロマチンをループ状に束ねて一時的に Axis-loop と提唱される特有の染色体折り畳み構造を示し減数分裂組換えの場を与えるが、体細胞系列で見られる TAD のような機能ドメインを Boris/CTCFL と共に協調的に形成しているかどうか、形成機構および概念がそのまま生殖細胞系列に当てはまるかは未知である。

2. 研究の目的

本研究では、減数分裂型インスレーター結合タンパク質 Boris/CTCFL、減数分裂型コヒーシオン Rad21L 及び Rec8 に焦点を当て、それぞれの相互作用因子の探索を行うとともに、生殖細胞核内における結合領域をゲノムワイドに同定することにより、生殖細胞系列における各因子の挙動を明らかにし、pre-meiotic S 期におけるクロマチン高次構造のスイッチング機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、染色体構造が減数分裂仕様に劇的に変化するタイミングでの基盤となるクロマチン高次構造の再編機構に迫るため、以下の(I)(II)に焦点を絞り、解析を進める。

(I) 減数分裂型インスレーター及びコヒーシオンタンパク質の相互作用因子のスクリーニング (i) ノックイン(KI)マウスの作製と高効率な細胞回収方法の確立

Boris/CTCFL、Rad21L 及び Rec8 遺伝子座へ GFP レポーターと 3XFLAG-HA タグを導入したマウスを作製し、GFP 及び HA 抗体による免疫染色でタグの導入を確認していた。さらに、これらの KI マウスへのレチノイン酸合成阻害剤及びレチノイン酸の投与により pre-meiotic S 期の細胞を同調させた上で FACS で GFP 陽性細胞集団を濃縮する手法を試みる。

(ii) タンパク質複合体の精製及び質量分析解析

上記(I)-(i)で回収した細胞からタグを利用したタンパク質複合体の精製・質量分析を行い、この三者をリンクさせるような因子、それぞれに特異的な機能を与える因子、もしくはクロマチンドメイン形成に寄与する可能性のある因子を網羅的に同定する。

(iii) ノックアウト(KO)マウスの作製 上記(I)-(ii)で選定した候補因子については、特に減数分裂期に特異的発現を示す因子に絞って、受精卵ゲノム編集を用いてノックアウトマウスを作製する。

(II) 減数分裂期における生殖細胞核内のクロマチン高次構造の解析

(i) Boris/CTCF、Rad21L 及び Rec8 の結合領域の同定

ChIP-seq 法を行う。上記(I)-(i)で作製した KI マウスから GFP レポーターを用いて Boris/CTCF、Rad21L 及び Rec8 陽性細胞を回収し、次世代シーケンサー(NGS)を用いて Boris/CTCF、Rad21L 及び Rec8 の結合領域の同定を目指す。

(ii) 核内におけるクロマチンドメインの解析

Hi-C 法を用いて、まずは野生型の精巣内の体細胞系列 (CTCF 陽性細胞)と減数分裂遷移期にある細胞 (Boris/CTCF 陽性細胞)を回収し、クロマチン高次構造に違いがあるかどうかの比較検討を行う。

(iii) Hi-C 法を用いた KO マウスの表現型解析

上記(I)-(iii)で作製した KO マウスの精巣から調整したクロマチンを用いて、同様に Hi-C 法を行う。Boris/CTCF、Rad21L 及び Rec8 の相互作用因子を欠失させた場合のクロマチンドメインの形成に及ぼす影響を調べる。

4 . 研究成果

インスレーター結合タンパク質 Boris/CTCF、コヒーシタンパク質 Rec8 及び Rad21L の遺伝子座へ GFP レポーターと 3XFLAG-HA タグを導入した KI マウスへのレチノイン酸合成阻害剤及びレチノイン酸の投与により pre-meiotic S 期の細胞を同調させて濃縮する手法を確立し、量的に少ない細胞の回収に成功した。このサンプルを利用した ChIP-seq を複数回行い解析したところ、特徴のない結合パターンが得られた。これは、以前当研究室で行った、野生型のマウスと内在性の REC8 及び RAD21L に対する抗体を用いて行った ChIP-seq の結果とも一致する。また、海外の他研究室においても同様の結果が得られていると報告を受けている。そこで、更なる検討を行うため、代替手段として CUT&Tag 法を用いて条件検討を行なった。CUT&Tag 法には、pre-meiotic S 期で一過性に高発現する Stra8 遺伝子座へ GFP レポーターを導入した KI マウスを用いて、FACS ソーティングで GFP 陽性細胞集団を精製し、純度の高い細胞集団を回収しサンプルとした。内在性の抗体を使用するための条件検討が終了し、現在作製したライブラリを次世代シーケンサーにかけているところである。また、最終年度にはより高解像度の解析を行うために、生殖細胞における Hi-C 法を行う準備を進めてきた。現在は予備実験として行った野生型のサンプルを次世代シーケンスにかけているところである。今後は、コヒーシタンパク質である Rec8 もしくは Rad21L ノックアウトマウスから pre-meiotic S 期の細胞を調整し Hi-C を行う。これらノックアウトマウス及び野生型における Hi-C データの結果を比較することにより、コヒーシタンパク質の核内クロマチン高次構造への影響について検討する。また、タンパク質複合体の精製及び質量分析解析に関しては、条件検討を行った結果、導入した FLAG 及び HA タグに対する抗体を使った KI マウスからのタンパク質複合体の精製がうま

くいかないことが分かった。そこで、Stra8 遺伝子座へ GFP レポーターを導入した KI マウスを用いて FACS ソーティングで GFP 陽性細胞集団を精製し、Boris/CTCF、Rec8 及び Rad21L に対する特異抗体を用いてタンパク質複合体を精製して質量分析を行い、この三者の相互作用因子を網羅的に同定する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Horisawa-Takada Yuki et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Meiosis-specific ZFP541 repressor complex promotes developmental progression of meiotic prophase towards completion during mouse spermatogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-23378-4	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Takada Yuki, Yaman-Deveci Ruken, Shirakawa Takayuki, Sharif Jafar, Tomizawa Shin-ichi, Miura Fumihito, Ito Takashi, Ono Michio, Nakajima Kuniko, Koseki Yoko, Shiotani Fuyuko, Ishiguro Kei-ichiro, Ohbo Kazuyuki, Koseki Haruhiko	4. 巻 148
2. 論文標題 Maintenance DNA methylation in pre-meiotic germ cells regulates meiotic prophase by facilitating homologous chromosome pairing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.194605	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------