

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07262

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Mechanism and regulation of meicyte cell death by meiotic checkpoints in mammals

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類の減数分裂チェックポイントにおいて重要な機能を果たすHORMAD2のリン酸化修飾の機能的意義を明らかにするため、ゲノム編集により非リン酸化型およびリン酸化模倣型点変異マウスを作製して、その表現型を解析した。その結果、マウスHORMAD2のC末端付近のリン酸化には、対合チェックポイントの活性を適度に抑制する機能があることが示唆された。この結果から、数的に貴重な卵母細胞では、軽度の対合不全を見逃して細胞数を確保するメカニズムが存在する、という興味深い仮説が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、哺乳類の生殖細胞における減数分裂の正常な進行を監視する分子機構のひとつである対合チェックポイントの新たな側面を、HORMAD2の点変異マウス作製により明らかにしたものである。その分子機構を明らかにすることはまだ出来ていないが、今後の解析によりHORMAD2の分子機能とそのリン酸化による制御機構を解明することにより、ヒトの不妊・習慣流産の発生機序を理解するために重要な基礎的知見が得られる。

研究成果の概要（英文）：HORMAD2 is a key protein in mammalian meiotic checkpoint. Functional significance of mouse HORMAD2 phosphorylation was examined by generating phospho-deficient and phospho-mimetic mutants by genome editing using CRISPR/Cas9. Present results suggest that the phosphorylation at the C-terminal region of mouse HORMAD2 plays a role in the inhibitory regulation of the synapsis checkpoint. This result leads to an interesting hypothesis that there is a mechanism ignoring a slight synapsis failure to avoid excessive oocyte loss.

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 細胞死 ゲノム編集

## 1. 研究開始当初の背景

不妊や不育といった生殖機能関連の疾患の原因解明はあまり進んでいない。一方で少子化が急速に進む現状において、この問題に対する社会的な関心は非常に高まっており、特に女性に見られる流産は、全妊娠の約15%と高頻度で起こることから多くの出産を望む女性が経験するものである。流産が3回以上連続する状態は「習慣流産」と呼ばれ、流産頻度は加齢とともに上昇するため、近年の晩婚化や出産年齢の高齢化などの社会的背景によりこの疾患が生じる頻度も高まっている。習慣流産の半数以上は胎児の染色体数異常によるもので、主に卵子の減数分裂時の染色体不分離によって生じるが、これまでは確率的な事象とみなされており、染色体数異常が生じやすい生物学的・生理的メカニズムについてはあまり検討されていない。私はこれまでに哺乳類の減数分裂に関与する新規遺伝子の探索と機能解析を行ってきた中で、HORMAD1欠損マウスの雌が、正常に排卵し妊娠するが産出に至らない、という習慣流産の表現型を示すことを見いだした。HORMAD1欠損では相同染色体間の組換えに異常を生じると同時に「対合不全をチェックして細胞死を起こすメカニズム(対合チェックポイント)」が機能しないために、全ての卵子で染色体数異常を生じた。この結果は、対合チェックポイントの機能が不十分であれば卵子の染色体数異常が増加して習慣流産を引き起こしてしまう可能性を示唆している。さらにその後の解析により、HORMAD1によって対合不全部位にリクルートされるHORMAD2が対合チェックポイントに中心的な役割を果たす分子であることを明らかにしたが、HORMAD2の具体的な分子機能は未解明であった。HORMAD2のC末端付近のリン酸化修飾に着目した予備的な解析では、HORMAD2のSer284を非リン酸化型のAla284に変異させたマウスの卵巣では卵母細胞の細胞死が亢進し、逆にリン酸化模倣型のAsp284に変異させたマウスの卵巣では対合不全による細胞死が部分的に抑制されることを示唆する結果を得た。これらの予備的知見を基に、対合不全を生じた卵母細胞の細胞死誘導の分子機構とその調節機構を解明することにより、染色体不分離が生じる生物学的・生理的メカニズムに迫りたいと考え、本研究課題を提案した。また本研究の成果は、ヒトの不妊・習慣流産の発生機序を理解するために重要な基礎的知見となることが期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、哺乳類の対合チェックポイントにおいて重要な機能を果たすHORMAD2タンパク質の分子機能を解明し、そのリン酸化による制御機構を明らかにすることを目指した。具体的な目標は、以下の3点である。

1. ゲノム編集マウスの作製と表現型解析によるHORMAD2のリン酸化の機能解析
2. HORMAD2のリン酸化状態と細胞死誘導との関連についての形態学的・生化学的解明
3. HORMAD2依存的に誘導される細胞死とリン酸化による抑制的制御の分子機構の解明

これらの研究成果により、対合チェックポイントを抑制的に制御するメカニズムの存在とその生理的意義が明らかになることで、なぜヒトでは流産(卵母細胞染色体の数的異常)が高頻度で起こってしまうのか、という疑問に対するひとつの答えの可能性が示せることを期待して研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) HORMAD2 C末端付近のリン酸化部位のゲノム編集マウス作製

マウスHORMAD2のC末端近く、284~288番目のアミノ酸のリン酸化状態として、a) pSer-Phe-Glu-pSer-Ser (pS284+pS287)とb) pSer-Phe-Glu-Ser-pSer (pS284+pS288)の2種類が検出されていた。これまでにSer284をアラニンに置換したAla284(非リン酸化型)とアスパラギン酸に置換したAsp284(リン酸化模倣型)変異マウスを既に作製していたが、その表現型の違いがあまり顕著ではなかったため、本研究では全てのリン酸化部位のSerを置換したAla284+Ala287+Ala288非リン酸化型およびAsp284+Asp287+Asp288リン酸化模倣型の各変異マウスを作製し、その表現型解析を行った。これらのゲノム編集マウスの作製においては、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)の課題番号JP18am0101120の支援を受けた。

### (2) HORMAD2リン酸化部位ゲノム編集マウスの表現型解析

各変異体の1~2ヶ月齢の卵巣重量を計測した上で、卵巣全体の組織切片を作製し、卵母細胞特異的抗体(c-kit、MVH)を用いた免疫染色による全卵母細胞数の解析を行った。細胞死の解析は、生後0日の卵巣を採取して全載凍結標本を作製し、アポトーシス特異的抗体(cleaved PARP1)を用いた免疫染色による解析を行った。

### (3) 多重蛍光免疫染色およびウエスタンブロットによるHORMAD2各変異体の挙動解析

免疫染色およびウエスタンブロットにより全ての変異体を検出するため、C末端以外を認識す

る抗体が必要であったが、マウス HORMAD2 の N 末端付近および分子の中間部分に結合する有用な精製抗体を得ることが出来、それらを解析に使用した。標本としては、各変異体の成体精巣の精母細胞や、出生直後の卵巣の卵母細胞の染色体標本を作製して多重蛍光免疫染色を行った。ウエスタンブロットは、各変異体の精巣タンパク質を細胞質画分と核画分に分離した試料を使用した。また当初予定していたマウス HORMAD2 のリン酸化状態特異的モノクローナル抗体の作製と、それを用いた野性型精母細胞および卵母細胞における詳細なリン酸化状態の形態学的解析には着手することが出来なかった。

#### 4. 研究成果

##### (1) HORMAD2 のリン酸化部位の新たな点変異ゲノム編集マウスの作製

以前の研究で、HORMAD2 の 1ヶ所のリン酸化部位(Ser284)について、ゲノム編集により非リン酸化型(Ala284)とリン酸化模倣型(Asp284)に改変したマウスを作製して表現型解析を行い、非リン酸化型 HORMAD2 マウスの卵巣では卵母細胞の細胞死がやや亢進し、逆にリン酸化模倣型 HORMAD2 マウスの卵巣では対合不全による細胞死が部分的に抑制される、という予備的な結果を得ていた。本研究では、リン酸化部位変異体の表現型がより明確になることを期待して、マウス HORMAD2 の C 末端付近の 3ヶ所のリン酸化部位(Ser284/287/288)全てをゲノム編集により非リン酸化型(Ala284/287/288)とリン酸化模倣型(Asp284/287/288)に改変したマウスの作製を行い、その確立に成功した。さらに、これらのゲノム編集マウス作製の際の副産物として、リン酸化部位を含む C 末端配列を欠失した複数の変異体を得た。これらの変異体マウスは、後述のように HORMAD2 タンパク質の機能解析に有用な変異体として活用可能である。

##### (2) HORMAD2 のリン酸化部位ゲノム編集マウスの表現型

3ヶ所のリン酸化部位(Ser284/287/288)について、非リン酸化型(Ala284/287/288)とリン酸化模倣型(Asp284/287/288)に改変した各変異体および SP011 欠損との二重変異体マウスの卵巣重量の解析を行い、非リン酸化型 HORMAD2 マウスでは、SP011 欠損などにより対合不全を多数生じた際に、野性型 HORMAD2 の卵巣よりも卵母細胞が減少する可能性が示された。一方で、リン酸化模倣型 HORMAD2 マウスの卵巣重量は野性型と同等であった。但し、実際の卵母細胞数や細胞死の定量的解析はまだ途中段階であり、更に緻密な解析が必要である。さらに意外な結果として、ゲノム編集の際に偶然作出された複数の C 末端欠損変異体では、対合不全による卵母細胞の細胞死が野性型 HORMAD2 に比べて高度に亢進し、対合不全を生じた卵母細胞がほぼ完全に失われることが示された。これらの結果は、マウス HORMAD2 の C 末端のリン酸化が、対合チェックポイント活性を適度に抑制するために必要であることを示唆しており、対合不全を生じた卵母細胞をほぼ完全に排除可能なシステムが存在する一方で、実際にはこの活性を適度に抑制するメカニズムが機能していることは、その進化的意義の観点から非常に興味深い。

##### (3) 多重蛍光免疫染色およびウエスタンブロットによる HORMAD2 各変異体の挙動解析

本研究で作出した HORMAD2 の各変異体について、細胞死誘導活性が異なることと相関して各変異体の分子挙動が異なる可能性を検討するため、精母細胞および卵母細胞における染色体軸や核内ドメインへの局在を、多重蛍光免疫染色により形態学的に解析した。その結果、各変異体間で局在の違いは見られなかった。また HORMAD2 は核と細胞質の両方に分布する分子であり、細胞質への分布増加が細胞死誘導に関わる可能性も想定されたため、各変異体の核:細胞質存在比をウエスタンブロットにより解析したが、これについても各変異体間で明瞭な違いは見られなかった。以上の結果は、各変異による表現型の違いが、分子の局在の違いではなく、分子機能の違いによってもたらされる可能性を示す。

##### (4) HORMAD2 のリン酸化状態依存的に結合するタンパク質(複合体)の同定

当初予定していたリン酸化状態特異的結合タンパク質の解析は、各変異体の表現型が当初不安定であり、詳細な解析が十分に行えなかったことや、卵巣が非常に小さい組織であり質量分析に必要な組織試料を十分に得ることができなかったため、残念ながら実行に至らなかった。しかし、本研究で得られた HORMAD2 の C 末端欠損変異体は、細胞死誘導活性が非常に強い変異体であることから、今後の解析において、この C 末端変異体と強く結合するタンパク質を同定することで、減数分裂チェックポイントによる卵母細胞の細胞死に関与するタンパク質群を網羅的に同定することが容易になることが期待出来る。

全体のまとめとして、本研究の目標のうち、HORMAD2 の C 末端付近のリン酸化部位について、1ヶ所および3ヶ所のリン酸化部位を非リン酸化型やリン酸化模倣型にした変異体を作成し、その表現型を解析することで、これらのリン酸化が分子機能の調節に関与する可能性を示すことができた。さらに偶然作製された C 末端欠損変異体で対合不全による細胞死が高度に亢進することも明らかになったことから、マウス HORMAD2 の C 末端のリン酸化は、対合チェックポイントの活性を適度に抑制するはたらきがあり、軽度の対合不全を見逃すことで、数的に貴重な卵母細胞の細胞数を確保するメカニズムが存在する、という興味深い仮説を得ることが出来たと考えている。一方で表現型のより緻密な解析や、実際にこれらのリン酸化が HORMAD2 分子の挙動や機能に及ぼす影響、HORMAD2 の各リン酸化状態特異的に結合する因子の同定などは予定通りに行

うことができなかつた。これらの目標を達成するには、C末端欠損変異体を含めた各変異体の卵巣試料を用いた HORMAD2 結合因子の質量分析による同定や、非リン酸化型とリン酸化模倣型のペイトを用いた酵母ツーハイブリッド法による比較解析が有用であり、今後の課題である。減数分裂チェックポイントの分子機構とその制御機構を解明することは、ヒトの不妊や不育の原因となりうるメカニズムの理解に繋がり、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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takuro Horii, Sumiyo Morita, Shinjiro Hino, Mika Kimura, Yuko Hino, Hiroshi Kogo, Mitsuyoshi Nakao and Izuho Hatada	4. 巻 21
2. 論文標題 Successful generation of epigenetic disease model mice by targeted demethylation of the epigenome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genome Biology	6. 最初と最後の頁 77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13059-020-01991-8	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 Yoshiteru Kagawa, Banlanjo Abdulaziz Umaru, Hiroki Shima, Ryo Ito, Ryo Zama, Ariful Islam, Shin-ichiro Kanno, Akira Yasui, Shun Sato, Kosuke Jozaki, Subrata Kumar Shil, Hirofumi Miyazaki, Shuhei Kobayashi, Yui Yamamoto, Hiroshi Kogo et al.	4. 巻 57
2. 論文標題 FABP7 regulates acetyl-CoA metabolism through the interaction with ACLY in the nucleus of astrocytes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 4891-4910
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12035-020-02057-3	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 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 Histochem Cytochem	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 -

〔学会発表〕 計8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、櫻井 優花、酒井 晴比古、堀居 拓郎、畑田 出穂、向後 晶子、山本 華子、池澤 麻衣子、松崎 利行
2. 発表標題 卵母細胞の対合不全チェック機構はマウスHORMAD2のC末端欠損によって亢進する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 向後寛、阿部仁、荒木健、向後晶子、山本華子、松崎利行
2. 発表標題 特異的抗体を用いたマウスHORMAD1のC末端アイソフォームの発現解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 向後寛、酒井 晴比古、櫻井 優花、堀居 拓郎、畑田 出穂、向後 晶子、池澤 麻衣子、山本 華子、松崎 利行
2. 発表標題 マウスHORMAD2のC末端欠損変異体では対合不全チェック機構が亢進する
3. 学会等名 第127回 日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 向後寛、向後晶子、池澤麻衣子、松崎利行
2. 発表標題 対合不全精母細胞におけるマウスHORMAD1 Ser378の局所的なリン酸化はpseudo sex body形成よりも早期に起こる
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向後寛、向後晶子、池澤麻衣子、松崎利行
2. 発表標題 対合不全精母細胞におけるHORMAD1 Ser378の局所的なリン酸化は未知のドメインで生じた後にpseudo sex bodyと共局在する
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021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、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 晶子、計良 佳彦、佐藤 聖、浜田 真理子、向後 寛、松崎 利行
2. 発表標題 マウスコルチ器発生過程有毛細胞におけるPar3、LGN/Pins、F-actinの極性分布
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室HP <a href="http://anatch.dept.med.gunma-u.ac.jp/">http://anatch.dept.med.gunma-u.ac.jp/</a> 個人HP <a href="https://sites.google.com/gunma-u.ac.jp/hkogo">https://sites.google.com/gunma-u.ac.jp/hkogo</a>
---

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
---------	---------