

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790169  
 研究課題名 (和文) 哺乳類の減数分裂における相同染色体の対合とそのチェック  
 ポイントの分子機構  
 研究課題名 (英文) Molecular mechanism of synapsis checkpoint in mammalian meiosis

研究代表者  
 向後 寛 (KOGO HIROSHI)  
 藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教  
 研究者番号：20282387

研究成果の概要 (和文)：減数分裂は卵子や精子を産生するための特殊な細胞分裂であり、その過程で生じる異常は、不妊症や不育症の原因となる。そのような異常を回避する手段として、減数分裂チェックポイントと呼ばれるメカニズムが存在すると考えられているが、その分子機構はこれまで全く不明であった。本研究では、生殖細胞に発現する機能未知遺伝子 *HORMAD1* の遺伝子改変マウスを作製し、*HORMAD1* が減数分裂チェックポイントに必要な遺伝子であることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：Meiosis is a special type of cell division producing oocytes and sperms. The failure in the process of meiosis causes infertility and miscarriage in human reproduction. To avoid such problems, there is a surveillance mechanism called meiotic checkpoint, although its molecular mechanism has been totally unknown, especially in mammals. In this study, the function of a meiosis-specific gene *HORMAD1* was analyzed by generating gene-targeted mice. As a result, *HORMAD1* was identified as the first gene required for the meiotic checkpoint in mammals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：減数分裂、不妊症、不育症

#### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの不妊症や不育症について、減数分裂に重要な何らかの遺伝子の機能不全がその原因となる可能性が推測されているが、実際には、不妊症や不育症の原因遺伝子はほとん

ど見つかっていない。その理由の一つは、未だに哺乳類の減数分裂に関与する多くの遺伝子が同定されていないためと考えられる。これまで減数分裂の分子メカニズムは主に出芽酵母を材料として研究が行われてきた

が、進化の過程においてそれぞれの生物種に独自のメカニズムが確立されており、酵母で得られた知見をそのままヒトに当てはめることは困難であることが多い。従って、ヒトの減数分裂のメカニズムやその異常についての知見を得るためには、マウスをモデル動物とした哺乳類における減数分裂の分子機構を解明していく必要がある。特に減数分裂の異常を監視する機構（チェックポイント）は、異常の生じた生殖細胞を取り除くことで、染色体異常による流産を防ぐために重要なメカニズムであるが、この機構に必要な遺伝子は哺乳類ではこれまで一つも同定されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の長期的目標は、ヒトの不妊症、不育症の原因遺伝子の探索であり、そのために必要な基礎的知識となる、哺乳類の減数分裂時の染色体動態（特に相同染色体の対合）やそのチェック機構に関与する新規遺伝子の同定を短期的目標とした。その候補遺伝子のひとつとして、以前に行った哺乳類の精母細胞特異的に発現する遺伝子群の網羅的解析により同定した機能未知遺伝子 *HORMAD1* に着目し、その機能解析を行うことにより、減数分裂に重要な相同染色体の対合や、その異常を感知するメカニズム（対合チェックポイント）に関する分子機構について新たな知見を得ることを目的として研究をおこなった。

## 3. 研究の方法

(1) *HORMAD1* 遺伝子ノックアウトマウスを作製し、*HORMAD1* を欠損した雌雄マウスの生殖能力の解析や、卵巣や精巣の通常組織学および免疫組織化学的解析を行うことにより、*HORMAD1* 欠損によって生じる表現型を観察した。

(2) *HORMAD1* を欠損した卵母細胞や精母細胞の減数分裂期の染色体標本作製し、染色体の軸構造を形成する様々な分子に対する免疫染色を行うことにより、相同染色体の対合の状態などを詳細に解析した。

(3) 対合不全によって卵母細胞の細胞死が起こることが知られている *Spo11* 遺伝子ノックアウトマウスに対し *HORMAD1* とのダブルノックアウトマウスを作製することにより、*HORMAD1* が哺乳類の対合チェックポイントに必須の分子である可能性を検討した。

(4) 哺乳類の対合チェックポイントの活性化と *HORMAD1* のリン酸化修飾との関連を調べるため、*Spo11* 遺伝子ノックアウトマウスの卵巣および精巣を材料としてウェスタンブロット法による解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) *HORMAD1* 遺伝子ノックアウトマウスの妊性を解析した結果、雌雄とも不妊であり、*HORMAD1* が生殖機能に必須の遺伝子であることが明らかになった。

(2) *HORMAD1* を欠損した精母細胞や卵母細胞の染色体を観察すると、相同染色体の対合不全や、非相同染色体間の対合などの異常が見られ、*HORMAD1* が相同染色体の対合に必須であることが明らかになった。

(3) 対合不全を生じた生殖細胞のその後の運命には雌雄で大きな違いが見られ、雄ではすべての精母細胞が細胞死を起こして無精子になるのに対し、雌では卵母細胞の減少は見られなかった。そして *HORMAD1* を欠損した卵は細胞分裂時に染色体の不分離を生じ、受精しても正常に発生できないため不妊となっていた。この結果は *HORMAD1* の機能欠損により雄では無精子症、雌では習慣流産が引き起こされる可能性を世界で初めて示したもので、ヒトの不妊症や不育症に *HORMAD1* の異常が関与する可能性を示唆しており非常に興味深い。

(4) *HORMAD1* を欠損した卵母細胞が、対合不全にもかかわらず細胞死を起こさないことから、*HORMAD1* は哺乳類雌において減数分裂の異常、特に相同染色体の対合不全を監視するメカニズム（対合チェックポイント）に必須の分子である可能性が示唆された。対合不全にもかかわらず、その卵母細胞で細胞死が起こらないという表現型はこれまでに全く見つかっておらず、今後の減数分裂機構の解析において、特徴的な表現型を示すモデルマウスとして有用と考えられる。

(5) *HORMAD1* が対合チェックポイントに必須であることを証明するためには、他の原因による対合不全と、それによって引き起こされる細胞死に *HORMAD1* が必要なことを示す必要がある。*Spo11* 遺伝子ノックアウトマウスでは対合不全が生じ卵母細胞は細胞死を起こすが、*HORMAD1* 遺伝子とのダブルノックアウトマウスでは、対合不全にもかかわらず細胞死が起こらなくなった。また雄においても同様に *HORMAD1* が対合チェックポイントに必須である可能性が示唆された。この結果により、*HORMAD1* が対合チェックポイントに必須の機能を持つことが明らかになった。これまで哺乳類の減数分裂チェックポイントの分子機構は全く不明であり、これに必須の遺伝子を世界で初めて同定できたことは、哺乳類の減数分裂機構の解明に非常に重要な知見をもたらす成果となった。

(6) 本研究により新たに同定された対合チェックポイントの細胞内シグナル伝達系についての知見を得るため、対合チェックポイントの活性化と HORMAD1 のリン酸化の関連を調べてみた。その結果、Spo11 を欠損した精母細胞や卵母細胞では、HORMAD1 のリン酸化が顕著に亢進することを発見した。また、リン酸化された HORMAD1 は非対合部分の染色体軸上に強く局在しており、非対合の状態が引き金となって活性化されるタンパク質リン酸化酵素が、染色体軸上で HORMAD1 を直接、または間接的にリン酸化することが対合チェックポイントの活性化に重要である可能性が示唆された。これらの結果は、これまで全く不明であった哺乳類の対合チェックポイントのシグナル伝達機構の分子基盤、特にこのシグナル伝達系に関与するタンパク質リン酸化酵素の同定につながる重要な知見となることが期待でき、そのためには HORMAD1 のリン酸化部位を同定することが必要である。

#### 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 7 件)

- ① Kogo, H., Kowa-Sugiyama, H., Yamada, K., Bolor, H., Tsutsumi, M., Ohye, T., Inagaki, H., Taniguchi, M., Toda, T., Kurahashi, H. (2010) Screening of genes involved in chromosome segregation during meiosis I: towards the identification of genes responsible for infertility in humans. *J. Hum. Genet.*, 55(5):293-299. 査読有。
- ② Ohye, T., Inagaki, H., Kogo, H., Tsutsumi, M., Kato, T., Tong, M., Macville, M. V., Medne, L., Zackai, E. H., Emanuel, B. S. Kurahashi, H. (2010) Paternal origin of the de novo constitutional t(11;22)(q23;q11). *Eur. J. Hum. Genet.*, in press. 査読有。
- ③ Bolor, H., Mori, T., Nishiyama, S., Ito, Y., Hosoba, E., Inagaki, H., Kogo, H., 他 11 名 (2009) Mutations of the SYCP3 gene in women with recurrent pregnancy loss. *Am. J. Hum. Genet.*, 84: 14-20. 査読有。
- ④ Inagaki, H., Ohye, T., Kogo, H., Kato, T., Bolor, H., Taniguchi, M., Shaikh, T. H., Emanuel, B. S., Kurahashi, H. (2009) Chromosomal instability

mediated by non-B DNA: Cruciform conformation and not DNA sequence is responsible for recurrent translocation in humans. *Genome Res.*, 19: 191-198. 査読有。

- ⑤ Kurahashi, H., Inagaki, H., Kato, T., Hosoba, E., Kogo, H., Ohye, T., Tsutsumi, M., Bolor, H., Tong, M., Emanuel, B. S. (2009) Impaired DNA replication prompts deletions within palindromic sequences, but does not induce translocations in human cells. *Hum. Mol. Genet.*, 18: 3397-3406. 査読有。
- ⑥ Kurahashi, H., Bolor, H., Kato, T., Kogo, H., Tsutsumi, M., Inagaki, H., Ohye, T. (2009) Recent advance in our understanding of the molecular nature of chromosomal abnormalities. *J Hum Genet.*, 54, 253-260. 査読無。
- ⑦ Nishizawa, H., Pryor-Koishi, K., Suzuki, M., Kato, T., Kogo, H., Sekiya, T., Kurahashi, H., Udagawa, Y. (2008) Increased levels of pregnancy-associated plasma protein-A2 in the serum of pre-eclamptic patients. *Mol. Hum. Reprod.*, 14: 595-602. 査読有。

[学会発表] (計 4 件)

- ① 向後寛、堤真紀子、大江瑞恵、稲垣秀人、倉橋浩樹。HORMAD1 は哺乳類の減数分裂における対合チェックポイントに必須である。第 115 回日本解剖学会全国学術集会、盛岡 (2010年3月30日)
- ② 向後寛、堤真紀子、大江瑞恵、稲垣秀人、倉橋浩樹。HORMAD1 は哺乳類雌の対合チェックポイントに必須である。第32回日本分子生物学会年会、横浜 (2009年12月12日)
- ③ 向後寛、ボロルハスバイラ、堤真紀子、大江瑞恵、稲垣秀人、倉橋浩樹。哺乳類の減数分裂における HORMAD1 の機能と減数分裂チェックポイントの性差。第 114 回日本解剖学会全国学術集会、岡山 (2009年3月30日)
- ④ 向後寛、ボロルハスバイラ、堤真紀子、大江瑞恵、稲垣秀人、倉橋浩樹。哺乳類の減数分裂における HORMAD1 の機能とチェックポイントの性的二型性。第31回日本分子生物学会年会・第8回日本生化学会大会合同大会、神戸 (2008年1

2月11日)

[その他]

ホームページ等

<http://info.fujita-hu.ac.jp/~genome/mg/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

向後 寛 (KOGO HIROSHI)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：20282387