

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06159

研究課題名(和文) 減数分裂期のDNA修復機構におけるMcmdc2の機能の解明

研究課題名(英文) Analyses of the function of Mcmdc2 in DNA repair during meiosis

研究代表者

酒井 則良 (Sakai, Noriyoshi)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・准教授

研究者番号：50202081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：減数分裂期の染色体分配には、二本鎖DNA切断(DSB)の修復が生む相同染色体の交叉が必須である。その制御機構の解明を目的に、減数分裂異常のゼブラフィッシュENU変異体imoを調べた。mcmdc2ノックアウトとの相補テストによって原因遺伝子を同定し、シナプトネマ複合体のSycp1とSycp3、およびDNA recombinaseのDmc1、DSBマーカーのリン酸化ヒストンH2AX、DNA修復タンパク質Msh5、テロメアの動態を解析した。その結果、この変異体ではDSB修復中間体の形成・安定化が異常となることが示唆された。また、卵母細胞では染色体の異数性は起こるものの卵形成は進むことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Mcmdc2は、ショウジョウバエとマウスにおいてDSB修復に機能する新規因子であることが示唆されているが、その分子機構は未知である。本研究から、ゼブラフィッシュではMcmdc2はDSB修復中間体の形成・安定化に働き、精子形成過程は減数分裂期で停止する一方で、卵母細胞が減数分裂を超えて発達することが示された。この因子が染色体の正常な分配に一義的に働くことが予想される。本研究では、3xFLAG-Stag-mcmdc2系統やMcmdc2の協働制御因子Mcm8の変異体を作成できているため、今後、これらを用いて解析を進めることで、この複合体が染色体分配に果たす役割を解明できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Generation and repair of DNA double strand breaks (DSB) during homologous recombination (HR) is a key step in meiosis that promotes proper alignment and segregation of homologous chromosomes; however, the mechanisms underlying this process remain largely unknown. In this study, we identified the causative gene in the zebrafish ENU mutant imo, which exhibits abnormal meiosis, by complementation testing with mcmdc2 knockout. We then analyzed the dynamics of the synaptonemal complex Sycp1 and Sycp3, the DNA recombinase Dmc1, the DSB marker phosphorylated histone H2AX, the DNA repair protein Msh5, and telomere pairing in the mutants. Our results suggest that the formation and stabilization of DSB repair intermediates during HR are not normal in this mutant. We also found that although chromosomal aneuploidy occurred in oocytes, oogenesis progressed.

研究分野：発生生物学

キーワード：減数分裂 Mcmdc2 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

減数分裂期の相同組換えは、プログラムされた DNA の二重鎖切断 (double strand break: DSB) とその修復により起こる。この過程では、細胞に重篤な損傷をもたらす恐れがある DSB を確実に修復すると同時に、染色体分配において相同染色体間の物理的結合を担う交叉を一对の相同染色体あたり少なくとも一ヶ所形成する必要がある。DSB は染色体あたり数十ヶ所起こるため、交叉を伴う DSB 修復とそれ以外の DSB 修復の過程は、減数分裂特異的な多くの因子による厳密な制御を受けると考えられるが、そのメカニズムは未知の部分が多い。また、体細胞にも存在するユビキタな DNA 修復のマシナリーと減数分裂特異的な因子がどのように協働して減数分裂期の DSB 修復を行うのか、さらにその修復機構の破綻がどのように染色体の分配異常をもたらすのかについてはほとんど明らかになっていない。

研究代表者は、エチルニトロソウレアによるゼブラフィッシュ変異体から減数分裂異常変異体 *imo* を単離し (Saito et al. 2011 Dev Dyn)、次世代シーケンシングによる解析の結果、*imo* の原因変異と思われるナンセンス変異を *mcmdc2* (*minichromosome maintenance domain containing 2*) 遺伝子内に見つけた (未発表)。このタンパク質のショウジョウバエホモログ、DNA 修復タンパク質 MEI-217/218 は体細胞の DNA 修復に関わる Mcm8 と複合体を形成し、減数分裂期の DSB 修復に関わる可能性が示されている (Kohl et al, 2012 Science)。また、*Mcmdc2* は脊椎動物で保存されており、減数分裂期の DSB 修復に関わる新規因子であることがマウスにおいて示唆されている (Finsterbusch et al, 2016 Plos Genet; McNairn et al, 2017 Genetics)。しかし、MCMDC2 の修復過程や染色体分配における役割は未知のままである。

2. 研究の目的

本研究では、ゼブラフィッシュで見つかった *imo* 変異体に対して、*mcmdc2* 変異体であることの確認と、DSB から DNA 修復までの種々の減数分裂期相同組換え制御因子の動態変化の解析を進め、*Mcmdc2* が関わる減数分裂期 DSB 修復の段階と染色体分配への影響を明らかにすることを目的とした。マウス *Mcmdc2* 変異体と異なり、*imo* 変異体のメスは卵子を産生するため、卵母細胞の解析から新規の機能が見つかることが期待される。そして、複合体を形成することが予想される *mcm8* を併せて解析することで、交叉を伴う DSB 修復過程における *mcmdc2* の新規機能を解明できる。

3. 研究の方法

(1) *imo* 変異体との相補テストを目的に、ゲノム編集により *mcmdc2* ノックアウトを作製し、*imo* 変異体と交配して、表現型解析を行った。(2) 相同組換えのプロセスはシナプトネマ構造の形成過程とリンクするため、その構成因子の Sycp1 と Sycp3 を用いた免疫組織化学解析を行った。野生型と比較することで異常となる表現型を調べた。また、減数分裂期における特徴的なテロメアの挙動を把握するために、テロメアを蛍光テロメアポリアミド (TPA) で標識して解析した。(3) DSB 形成から修復の過程における異常を把握するために、DSB マーカーのヒストン H2AX、DNA recombinase の Dmc1、DNA ミスマッチ修復タンパク質の Msh5 (*mutS homolog 5*) に対して免疫細胞化学解析を行った。Msh5 タンパク質に対する抗体は新たに作製して用いた。(4) *imo* 変異体の卵子の異常を解析する目的で、発生した胚の染色体数をフローサイトメーターで解析した。(5) *Mcmdc2* と *Mcm8* との相互作用を解析するために、タグ標識した *mcmdc2* 遺伝子を導入したトランスジェニック系統を作出するとともに、ゲノム編集により *mcm8* 変異体を作出した。

4. 研究成果

はじめに、CRISPR-Cas9 法により、*mcmdc2* 遺伝子のエキソン 8 に対して変異導入を行い、2-bp 欠失の変異体を作出した。この *mcmdc2* ノックアウトと *imo* 変異体とで相補性テストを行い、*imo* 変異体の減数分裂異常表現型が *mcmdc2* の変異に起因することを確認した。そこで、この変異体に対して、シナプトネマ複合体の染色体軸構造の形成過程を、Sycp3 を用いて解析したところ、軸形成には異常は認められなかったが、続いて起こる相同染色体間での対合に異常があることがわかった。そこで、シナプトネマ複合体の染色体架橋要素の Sycp1 を調べたところ、ザイゴテン初期から Sycp1 の架橋が正常に形成されていないことが認められた。Sycp1 の長さを定量化した結果、ザイゴテン期の Sycp1 の伸長が有意に減少していることがわかった (図 1)。さらに、ゼブラフィッシュの Sycp1 による架橋形成はテロメアから始まるため、TPA を用いてテロメアのペアリングを解析した。その結果、*mcmdc2* 変異体では、テロメアのペアリングが正常に進んでいないことが明らかとなった (図 2)。

続いて、DSB とその修復過程への影響を調べるために、リン酸化ヒストン H2AX、および Dmc1、

Msh5 を解析した。DSB によって起こるヒストン H2AX のリン酸化は変異体でも確認された。同様に、DSB の修復過程で生じる一本鎖 DNA に結合する Dmc1 の局在が変異体においてもみられたことから、Mcmcdc2 は DSB 形成には必須でないことが示唆された。しかしながら、野生型に比べて変異体では非常に強い Dmc1 の集積が見られ、野生型ではそのシグナルが減少するザイゴテン末期まで維持されていることがわかった (図3)。さらに、組換え中間体を安定化する機構を持つ Msh5 は変異体では減少していることがわかった。以上の結果から、*mcmcdc2* 変異体は、DSB および一本鎖 DNA へのプロセシングは正常に進むものの、その後の DSB 修復中間体の形成もしくは安定化が正常に起こらないことが示唆された。

一方、マウスと異なり、ゼブラフィッシュの *mcmcdc2* 変異体のメスは卵子を産生する。そこで、変異体の卵子を野生型精子と受精させて、胚を発生させたのち、その細胞の染色体数をフローサイトメーターで解析した。その結果、染色体の異数性が認められ、減数分裂過程を超えて卵母細胞は発達するものの、組換え異常が起こっていることがわかった。おそらく、マウスとゼブラフィッシュの卵母細胞では、染色体異数性のチェックポイントに違いがあるものと推測される。

また、Mcmcdc2 タンパク質の局在や相互作用因子の解析を目的にリコンビナントタンパク質の免疫を進めたが、良い抗体を得ることができなかった。そこで、3xFLAG-S-tag 標識した *mcmcdc2* コンストラクトを導入したトランスジェニック系統を作出した。さらに、Mcmcdc2 と協働して組換えに関わると考えられる *mcm8* の変異体を作製した。この変異体のオスは不妊となることを検証済みである。現在、メスの表現型と詳細な解析を進めているところである。

以上の結果から、ゼブラフィッシュ *Mcmcdc2* は DSB 修復中間体の形成・安定化に働き、この異常は精子形成過程に強く影響がでることが示唆された。また、ショウジョウバエと同様に、Mcm8 と複合体を形成して働く可能性が見えてきた。本研究で作出した、

3xFLAG-Stag-*mcmcdc2* 系統や *mcm8* 変異体を用いることで、その相互作用を検証できるとともに、卵母細胞の解析により、これらの因子が染色体の正常な分配に必要であることを示すことができると期待される。本研究課題の成果をもとに、脊椎動物における *Mcmcdc2*-*Mcm8* 複合体の正確な機能を明らかにできると考えている。

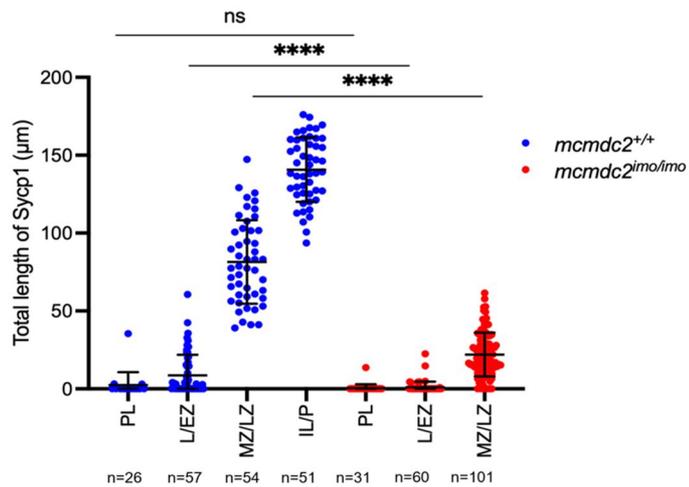


図 1. *mcmcdc2* 変異体における Sycp1 形成異常。野生型に比べ、伸長していない。PL; プレレプトテン期, L; レプトテン期, EZ; ザイゴテン初期, MZ; ザイゴテン中期, LZ; ザイゴテン末期, IL; インターロック期, P; パキテン期

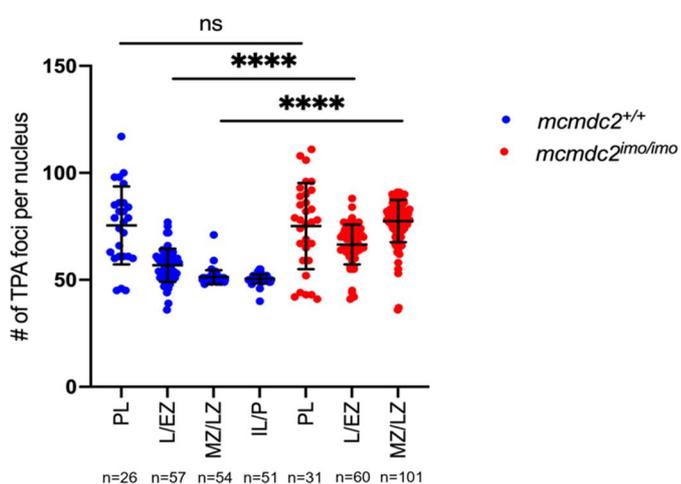


図 2. *mcmcdc2* 変異体におけるテロメアペアリング異常。野生型に比べ、TPA foci が減少せず、ペアリングが起こっていない。

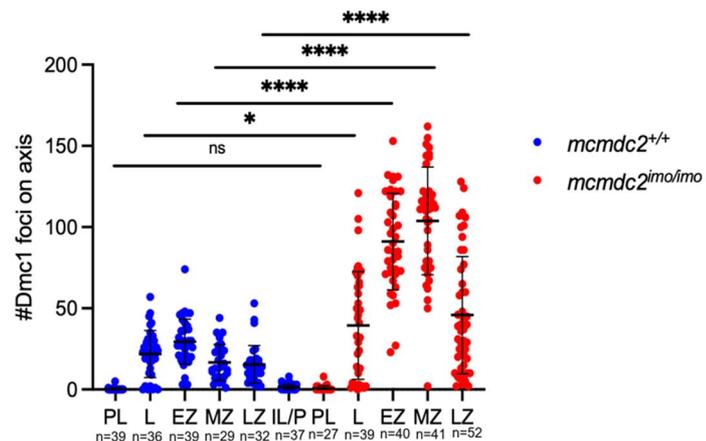


図 3. *mcmcdc2* 変異体における Dmc1 の異常局在。野生型に比べ、Dmc1 は過剰に集積し、その集積が残る。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Takemoto Kazumasa, Nishimura Toshiya, Kawasaki Toshihiro, Imai Yukiko, Levy Karine, Hart Neta, Olaya Ivan, Burgess Sean M., Elkouby Yaniv M., Tanaka Minoru, Sakai Noriyoshi	4. 巻 20
2. 論文標題 In Vitro Storage of Functional Sperm at Room Temperature in Zebrafish and Medaka	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Zebrafish	6. 最初と最後の頁 229 ~ 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/zeb.2023.0054	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 該当する

1. 著者名 Yukiko Imai, Ivan Olaya, Noriyoshi Sakai and Sean M. Burgess	4. 巻 9
2. 論文標題 Meiotic Chromosome Dynamics in Zebrafish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 757445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.757445	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 酒井則良
2. 発表標題 ゼブラフィッシュにおける減数分裂制御因子の雌雄差
3. 学会等名 熊本大学発生医学研究所セミナー
4. 発表年 2023年 ~ 2024年

1. 発表者名 酒井則良
2. 発表標題 培養系における精原幹細胞の分化と精子形成の制御
3. 学会等名 第46回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 酒井則良
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ生殖細胞の培養、移植、順遺伝学
3. 学会等名 愛媛大学南予水産研究センター第2回南水研セミナー
4. 発表年 2022年～2023年

〔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
---------	---------