

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011

課題番号：23657009

研究課題名（和文） マウス亜種間ゲノム衝突による変異爆発

研究課題名（英文）：Mutation burst by conflict of two mouse subspecies' genomes

研究代表者

城石 俊彦（SHIROISHI TOSHIHIKO）

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：90171058

研究成果の概要（和文）：

マウス亜種間の MHC 領域内ホットスポットで相同染色体間組換えを起こした個体に観察された高頻度の自然突然変異（Recombination-induced-mutation: *Rim*）の原因を解明するため、変異したゲノムを持つ精子 DNA をプール化して PCR プライマーで増幅して検出するシステムの開発を行った。また、*Rim* 突然変異の原因と考えられる DNA 二重鎖切断（DSB）とその後の組換え型 DNA の効率の良い検出系を Tol2 トランスポゾンシステムの利用により開発した。

研究成果の概要（英文）：

We carried out two experiments to elucidate mechanism by which high-frequency spontaneous mutations (Recombination-induced-mutation: *Rim*) is induced in mice with recombinant MHC haplotypes between two mouse subspecies. First, we tried to detect genome alterations similar to *Rim* by PCR-based monitoring of *Rim*-type mutations using pooled sperm DNAs of intra-MHC recombinant mice. As a result, we could not observe expected PCR-products by this method. One possibility to explain this result is that there are different types of mechanism for induction of *Rim*. Alternatively, present intra-MHC recombinant mice have lost the activity to give rise to *Rim*. Second, we tried to develop an efficient assay system to detect DNA-double strand breaks and subsequent recombination for single male mouse. To do this, now we constructed the DNA construct that consists of recombination-target DNA sequence for *Prdm9* protein, which is known to determine recombination site by introducing Histon3 chemical modification as hotspot mark, and of GFP reporter connected to the *Prdm9* target sequence. Now we are introducing this construct into mouse genome by means of Tol2 transposon system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：ゲノム構築・再編・維持

## 1. 研究開始当初の背景

1980-90 年代にマウス17 番染色体上のMHC 領域内のPsmb9 遺伝子近傍で、日本産亜種マウス由来の“wm7 染色体” (図1の薄灰色部分) が相手の染色体型に関係無く、高頻度で減数分裂期の相同染色体間組換えを示すことを見出した (Shiroishi et al. Nature 1982)。さらに、wm7 染色体はこの組換えのhotspot からセントロメア側に組換えの“活性化因子”を、テロメア側には雄組換えの“抑制因子”を持つことを示した (Shiroishi et al. EMBO J. 1991)。その後、この組換えhotspot 近傍でwm7 染色体と西欧州産亜種マウス由来の染色体の間で組換えを起こした系統を維持していたところ、小規模の飼育集団から多数の可視突然変異体が誘発されることを見出した。その発生頻度は、非組換え型染色体集団では0/5,500 (分母は観察個体数) だったのに対し、組換え型染色体集団では6/3,500 という高値であった。申請者は、これらの突然変異体に対してRecombination-induced-mutant (Rim)と命名した。しかし、Rim の生成機構は長い間謎のままであった。

2010 年、フランスの研究グループが、申請者が供与したwm7 染色体を用いて、“活性化因子”がC2H2 型Zinc Finger (ZnF)反復ドメインを持つメチル基転移酵素“Prdm9”であることを報告した (Baudat et al. Science 2010)。それによると、組換えのhotspot の13bp の認識配列にPrdm9 のZnF 反復ドメインが結合すると、ヒストンH3 がメチル化 (H3K4Me3)され、それがマークとなって組換え開始反応であるDNA の二重鎖切断 (DSB) が誘導される。Prdm9 は他の染色体にもトランスで働きゲノムワイドに多数のhotspot での組換え開始反応を誘導する (Grey et al PLoSBiol 2009)。また、マウス系統間のPrdm9 多型がhotspots での組換え活性を左右することもわかってきた。

興味深いことに、減数分裂前期の精母細胞核内ではwm7 染色体の対合相手の染色体にのみメチル基修飾が入り、wm7 染色体上のDSB 誘導が阻止されていた。Rim 発見の経緯とこれら最新の研究成果から次の仮説が浮上した。マウス亜種内の染色体上ではヒストン修飾系とその抑制系が連動して過剰なDSB 誘発によるゲノム不安定を阻止している。しかし、染色体分配や組換えで抑制系が他の亜種のものに交換されると、ヒストン修飾制御系が破綻して多数のゲノム領域でDSB が誘導され、結果として突然変異率の上昇を引き起こす。17番Wm7 染色体の場合、ヒストン修飾系と抑制系がhotspot を挟んで連鎖していると考ええるとRim 生成をうまく説明できる。

## 2. 研究の目的

マウス亜種ゲノム間での相同染色体組換え系統を維持している際に高頻度に可視突然変異体 (Recombination induced mutation: Rim と命名) が生成されることを発見した。本研究では、組換え開始におけるDNA 二重鎖切断の部位特異性を決めるメチル基転移酵素 Prdm9 によるヒストン修飾系とその抑制系の制御破綻という視点から、この変異生成メカニズムの解明をめざす。ヒトでは、活性型 Prdm9 アリルの働きによる Non-allelic homologous recombination (NAHR) などのゲノム変異生成が報告されている。本研究では、遺伝子コピー数変異・染色体重複や欠失などの変異生成メカニズムの理解に加えて、遺伝的分化を遂げた生物集団の二次的接触 (ゲノム衝突) による爆発的変異生成という遺伝学の新しいパラダイムの創成に挑戦する。

## 3. 研究の方法

日本産亜種マウスと西欧州産亜種マウス由来の非組換え型17 番染色体を持つ二つの系統を対照群として、Prdm9 によって生じた17 番染色体上のhotspot での組換え型wm7 染色体を持つマウス個体の減数分裂前期核でのゲノム不安定性をさまざまな手法を用いて比較解

析する。組換え型wm7 染色体のゲノム不安定性の有意性が確認できたら、大規模な交配実験によってhotspot のテロメア側に存在するヒストン修飾の抑制因子領域での多数の組換えマウス個体集団を作出する。これらのマウス個体集団を対象に、ゲノム不安定性の検出系を用いた表現型解析と遺伝統計解析によりヒストン修飾系の抑制因子を同定・単離する。その抑制因子の機能解析を元に、ヒストン修飾系と抑制系の制御破綻がゲノム不安定性を生む分子メカニズムを解明する。

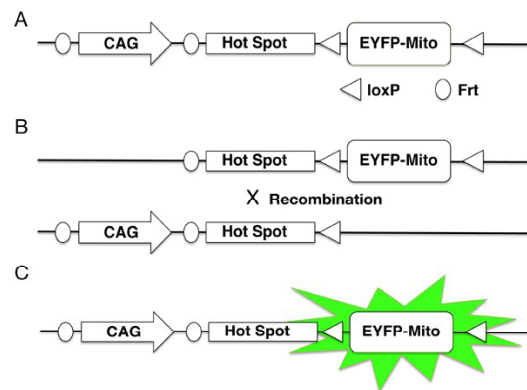
#### 4. 研究成果

(1) プール化精子 DNA を用いた Rim 変異生成の定量化 Rim 変異が Prdm9 によるヒストン修飾の制御破綻が原因で誘導されたのであれば、低い頻度でも同様な変異が小数の精母細胞で生じていると考えられる。そこで、MHC 内組換え系統のマウス個体の精子 DNA をプールした上で、そのゲノム DNA をテンプレートにして、Rim 変異遺伝子のみを増幅する PCR プライマーを設計し、nested PCR によって関連するゲノム構造変化の検出を試みた。これまでのところ、この方法での既存の変異に対応するようなゲノム構造変化は検出されなかった。この理由として、個々の変異生成機構に多様性がある可能性と、既存の MHC 内組換え系統において変異生成活性が低下してしまった可能性がある。

(2) トランスジェニックマウスによる DNA 二重鎖切断 (DSB) 検出系の構築

活性型 PRDM9 遺伝子を持つヒトの精子を用いた解析では、非対立遺伝子間相同組換え (NAHR) が高い頻度で生じる。そこで、Prdm9 による DSB 誘導を経由した組換えによって、精子が GFP を発現する検出系をトランスジェニックマウスの作出によって構築することを目的として実験を行った。特に、Prdm9 認識配列と雄 1 個体で効率良く DSB の誘発頻度を測定できることをゴールとした。具体的には、全身でミトコンドリア局在型 GFP (mitoGFP) を発現する CAGGS-mitoGFP ベクターの CAGGS プロモーターと mitoGFP を分断す

る様に Psm9 hotspot Genome 断片を挿入した。この時、CAGGS プロモーターは LoxP で、mitoGFP cDNA は Frt 配列で挟み、それぞれ個別に削除可能にした。現在このコンストラクトを Tol2 トランスポゾンシステムにより 1 遺伝子座に 1 コピーのみが挿入された Transgenic マウス系統を作製している (下図参照)。



- A) 遺伝子導入用コンストラクト
- B) Cre/loxP, Flp/Frt を用いて Promoter と YFP を分断  
その後、交配により Recombination を誘発
- C) 精子において YFP による Recombination 検出

#### 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 1 件)

日本語総説

1. 『生物の科学 遺伝』: Review, 相同染色体間組換えのホットスポット - 研究の歴史と最近の急展開』 河野宏光, 城石俊彦, エヌ・ティー・エス社, 2012 in press.

[学会発表] (計 1 件)

1. 河野宏光, 田村勝, 長田直樹, 鈴木仁, 太田邦史, 城石俊彦. "Prdm9 は種分化遺伝子か? - 野生マウスの多型から考える -" 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜. 2011 年 12 月 13-16 日.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

城石 俊彦 (SHIROISHI TOSHIHIKO)  
国立遺伝学研究所・  
系統生物研究センター・教授

研究者番号：90171058

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
田村 勝 (TAMURA MASARU)  
国立遺伝学研究所  
系統生物研究センター・助教  
研究者番号：50370119