

課題番号: 14

減数分裂による遺伝子の多様性を創出する分子基盤の解明

[1] 組織 (以下10.5ポイント)

代表者: 林 克彦

(京都大学大学院医学系研究科)

対応者: 松居 靖久

(東北大学加齢医学研究所)

分担者: なし

研究費: 物件費 21 万 8960 円, 旅費 8 万 1040 円

[2] 研究経過 (以下10.5ポイント)

(本研究の目的・概要, 及び, 研究打ち合わせ等の開催状況を記載して下さい。また, 分かりやすい図・表を一点挿入して下さい。)

生殖細胞は次世代に遺伝情報を伝えることのできる唯一の細胞系列であり、他の体細胞系列では認められない特異的な発生過程を経る。その一つが減数分裂である。減数分裂は配偶子形成のために遺伝子量を半減するばかりでなく、相同染色体同士を交叉させることにより次世代の個体の遺伝子多様性を創出している。相同染色体間の交叉は Hotspot と呼ばれる領域に高頻度に形成されることが知られているが、ヒトを含めた哺乳類において交叉部位の特異性を規定しているメカニズムは不明であった。交叉の形成は減数分裂中の相同染色体対合の安定性にも関係し、その異常は不妊の一因となることから、交叉形成のメカニズムの解明は近年ますますその重要性を増している。

本研究代表者と対応者は 2005 年に減数分裂特異的遺伝子 Meisetz/Prdm9 を単離し、その機能を解析した。その結果、Meisetz/Prdm9 を欠損したマウスでは減数分裂が相同染色体の対合異常により停止していること、減数分裂時に能動的に起こる DNA 損傷が修復されずに多くのゲノム領域で残存していることが明らかになった (図)。この研究の他に、近年 Meisetz/Prdm9 は減数分裂時に染色体の Hotspot に局在していることが明らかになった。これらの研究背景をもとに本研究代表者と対応者は、Meisetz/Prdm9 欠損マウスで認められた現象をさらに詳しく解析することにより、相同染色体間の対合と交叉形成における Meisetz/Prdm9 の機能を

詳細に解明することを目的として本研究を提案するに至った。具体的には、Meisetz/Prdm9 欠損マウスの精母細胞における相同染色体の対合に重要な減数分裂特異的 DNA 修復酵素 Dmc1 の局在を定量的に野生型のものと比較することであった (図)。

これまでの本研究代表者と対応者の研究により、Dmc1 は野生型の精母細胞では DNA の損傷部位に局在するが、Meisetz/Prdm9 欠損マウスの精母細胞では DNA 損傷部位以外に点在する Dmc1 が多く認められた。本研究では、Dmc1 の局在変化をより定量的かつ経時的に観察するために、Meisetz/Prdm9 欠損マウスの 15-18 日齢のそれぞれの精巣より細胞を単離し、スライドガラス上に塗布した。対照群として野生型および Meisetz/Prdm9 ヘテロ欠損マウスの個体からも同様に採取した。Meisetz/Prdm9 欠損マウスおよび対照群のマウスは、東北大学加齢医学研究所で維持されている Meisetz/Prdm9 欠損マウスを用いた。また精巣細胞塗抹標本の作製は、本研究代表者により対応者の研究室で行われた。作製された塗抹標本は、まずその質を確認するために免疫染色に供した。この免疫染色には相同染色体の対合の観察に適した SCP3 に対する抗体と、DNA 損傷・修復を観察する γ H2AX に対する抗体を用いた。質的に良好であると確認された後に、塗抹標本をフランスの共同研究者である Bernard de Massy 博士に送付し、Dmc1 抗体による免疫染色を行った。

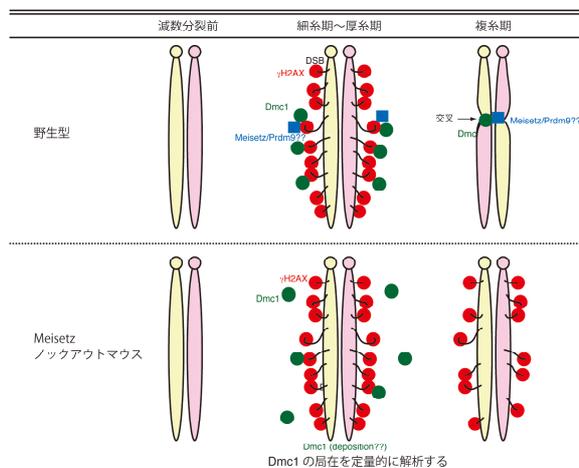


図 減数分裂が開始され細糸期になると、能動的な 2 本鎖 DNA の切断 (Double Strand Break: DSB) が起こる。DSB 領域の H2AX はリン酸化され (γ H2AX)、野生型のマウスでは Dmc1 などの DNA 修復酵素がリクルートされる。Meisetz は Hotspot の部位にリクルートされ、後の交叉形成に関与することが示唆されている。Meisetz ノックアウトマウスでは Dmc1 の局在に変化がおき、DSB の修復が異常になることが示唆されている。本研究では、Meisetz ノックアウトマウスの細糸期~厚糸期の精母細胞において、Dmc1 の局在を定量的かつ経時的に解析する。

[3] 成果 (以下10.5ポイント)

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

第1に東北大学加齢医学研究所で維持されている **Meisetz/Prdm9** 欠損マウスを用いて、十分な量の精巣細胞塗抹標本を作成した。また精巣細胞の採取は経時的に行われ、減数分裂の進行にともなう **Dmc1** の局在の変化を詳細に観察するのに適している。第2にこれらの標本を用いて免疫染色を行った結果、相同染色体の対合と DNA 損傷・修復の様子が期待通りに経時的に観察された。また **Meisetz/Prdm9** 欠損マウスの精母細胞では、期待通りに、相同染色体の対合異常と DNA 損傷の修復異常が認められた。これはこれまでの本研究代表者と対応者の研究結果を支持するものである。第3にこれらの精巣細胞塗抹標本は、現在 **Bernard de Massy** 博士により解析されている。具体的には **Dmc1** の局在を経時的かつ定量的に観察している。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究は、特に京都大学医学研究科機能微細形態学教室と東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターとの学術交流を活性化させた。本研究代表

者は、東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターの若手研究者と交流することにより、将来的にも有用な研究者ネットワークを拡大した。

また本研究はフランス・**Institute of Human Genetics** の **Bernard de Massy** 博士との共同研究に発展し、学術的国際交流にも貢献した。

Meisetz/Prdm9 はヒトにも保存されており、近年不妊症との関連も指摘されている。これらのことから、本共同研究で明らかにされる成果は、将来的にヒトの不妊症の原因究明にもつながることが期待される。

[4] 成果資料 (以下10.5ポイント)

本共同研究により得られた試料は、現在本研究代表者、対応者、および **Bernard de Massy** 博士により解析中であるため、現在までのところこの研究成果が掲載されている論文はない。