

# 生殖細胞における減数分裂の制御機構と不妊原因の解明

現在の所属 熊本大学発生医学研究所 染色体制御分野  
石黒 啓一郎

## 研究目的

生殖細胞における体細胞分裂から減数分裂への切替のメカニズムは長年の謎とされていた。最近、我々は減数分裂移行期の生殖細胞クロマチンより、世界に先駆けて減数分裂の開始に決定的な役割を担う新規の因子を同定した(Ishiguro et al Dev Cell 2020)。MEIOSIS initiator (MEIOSIN)と名付けた因子はDNA結合因子と推測されるが、これを欠損させると減数分裂への進行が見られなくなる。MEIOSINは減数第一分裂の進行に関連する遺伝子のプロモーターに結合する転写因子として働くが、これによって直接制御される標的には多くのhypothetical gene (ゲノムデータベース上にIDのみが付与されている機能不明遺伝子)または機能未解析の遺伝子が含まれることが判明している(Takemoto et al Cell Rep. 2020)。これらMEIOSINの転写制御下に置かれている未解析の遺伝子には、減数分裂の進行に必要とされる未知のものが含まれる可能性がある。そこで本研究では減数第一分裂の制御を支える新規遺伝子の網羅的解析を行って体細胞分裂との違いを本質的に決定付ける減数分裂制御のメカニズムの解明と不妊の原因遺伝子探索することを目的として、MEIOSINの標的遺伝子について解析を行った。

## 研究成果

### (1) ZFP541の減数分裂における役割の解明

MEIOSIN標的遺伝子のうち未解析の遺伝子について、まずRT-PCR法により組織特異性を検討して精巣と胎児期卵巣に発現が限定される遺伝子を絞り込んだ。それらについて受精卵へのCRISPR-Cas9法での遺伝子破壊を行い、F0個体の精巣が萎縮する表現型を示すことを指標に表現型の解析を行った。このスクリーニングにより*Zfp541*がMEIOSIN標的遺伝子の一つとして同定された(Horisawa-Takada et al Nature Commun. 2021)。*Zfp541*遺伝子がコードするタンパク質は、Zinc fingerドメインを持つことからDNA結合能を持つことが示唆された。まず*Zfp541*遺伝子の各臓器組織における発現パターンの特異性を検討したところ、精巣において強い発現を示すことが明らかとなった(図1a)。single cell RNA-seqデータの再解析から、*Zfp541* mRNAは精巣では減数分裂に進行した精母細胞および円形精子細胞で発現することが示唆された(図1b)。これと符合して、免疫染色の解析からZFP541タンパク質は精巣内では減数第一分裂前期の中盤に相当するパキテン期から円形精子細胞までのステージで核内に出現することが明らかとなった。なお胎児期の卵巣においても弱いながら*Zfp541*の発現は見られた(図1c)。

ゲノム編集を用いて*Zfp541*ノックアウトマウスの作成をして、その機能について検討した。その結果、*Zfp541*欠損マウスのオスでは精母細胞はいったん減数分裂を進行するものの減数第一分裂前期の終盤で死滅して、精巣の萎縮をともなって不妊となることが判明した(図2a, b)。*Zfp541*欠損マウスの精母細胞では概ね相同染色体の交差組換えは正常に進行しているものの、テロメア側での部分的な相同染色体の対合異常やDNA修復の異常を伴ってパキテン期以降のステージへの進行に障害が見られた。なお卵巣においても弱いながらZFP541の発現は見られるが、*Zfp541*欠損マウスのメス妊性に影響は見られなかった。

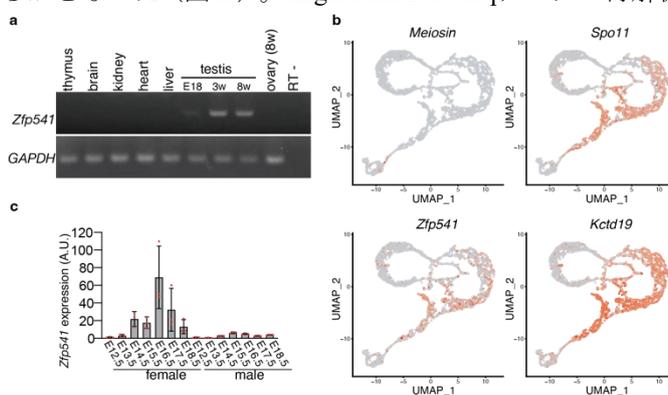


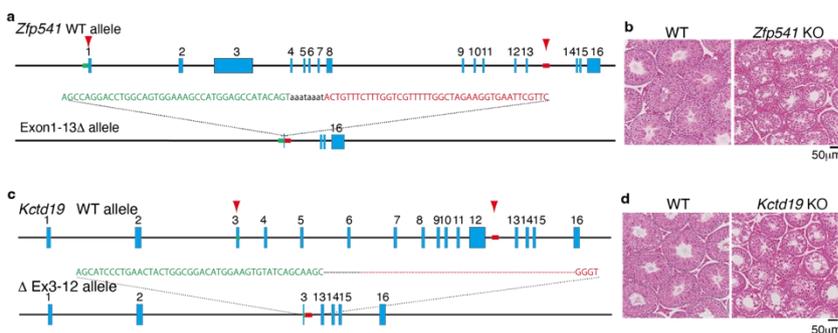
図1. マウス精巣における *Zfp541* の発現パターン

(a) RT-PCR 法により *Zfp541* 遺伝子発現の組織特異性について検討した。*Zfp541* 遺伝子は精巣で特異的に発現を示す。(b)マウス精巣の scRNA-seq データの再解析により *Zfp541* の精巣における遺伝子発現パターンについて検討した。*Meiosin* は減数第一分裂開始のマーカー遺伝子。*Spo11* は減数第一分裂のマーカー遺伝子。*Kctd19* は ZFP541 の相互作用因子として本研究で同定された遺伝子。(c)胎児期卵巣および精巣における *Zfp541* 遺伝子発現を RT-qPCR 法により検討した。

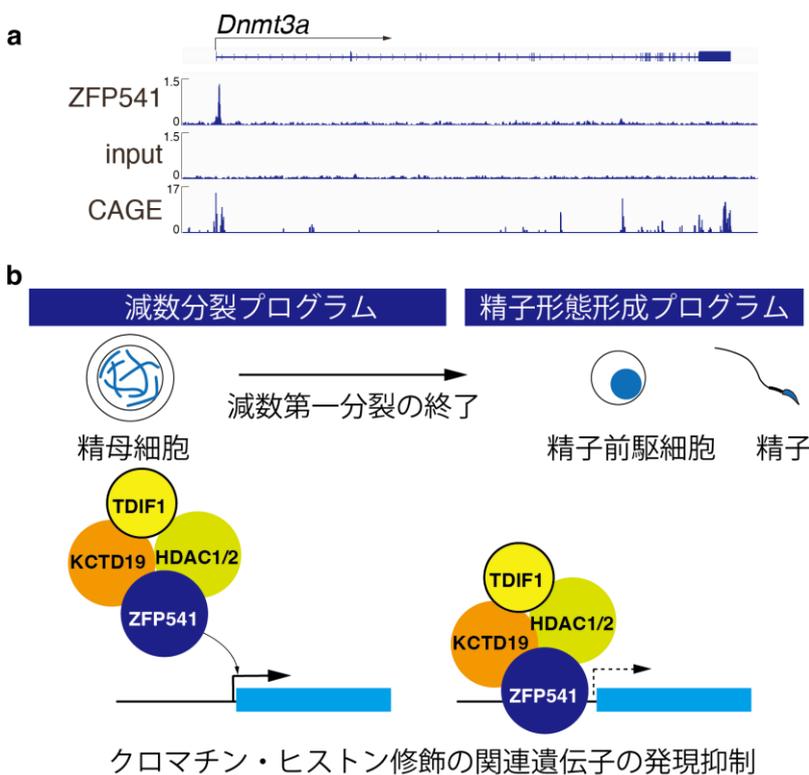
次に精巣クロマチン画分からZFP541タンパク質の免疫沈降と質量分析法を用いて相互作用因子を解析した。その結果、ZFP541がHDAC1/HDAC2,TDIF1およびKCTD19と複合体を形成することが明らかとなった

た。HDAC1/HDAC2との相互作用からZFP541は遺伝子の転写抑制に働くことが示唆された。KCTD19はPOZ/BTBドメインをもつタンパク質で、ZFP541と同様に精巣に特異的な発現パターンを示す。また*Kctd19*遺伝子を欠損させると、*Zfp541*欠損マウスと同様に減数第一分裂を完了できずに不妊となることが判明した(図2c, d)。また我々の研究と同時期に大阪大学微生物学研究所の伊川博士らのグループで行われた*Kctd19*欠損マウスの解析でも同様の結論が示された(Oura et al, PLOS Genet 2021)。

ZFP541タンパク質はそのzinc fingerドメインを介してDNAに直接結合することが示唆された。そこでChIP-seq解析により、減数第一分裂におけるZFP541のゲノム結合部位について検討した。その結果、減数第一分裂においてZFP541が多くの遺伝子の転写開始点近傍に結合することが判明した(図3a)。興味深いことに、ZFP541の標的の多くがクロマチン結合因子やヒストン修飾など転写制御に関連するユビキタなタンパク質をコードする遺伝子であることが判明した。また野生型、*Zfp541*欠損マウスの精母細胞のRNA-seq解析から、これらZFP541標的遺伝子は減数第一分裂前期の中盤を境に発現が抑制されることが示唆された。これらの結果から、ZFP541は転写抑制複合体としてクロマチン・エピジェネティクスの制御に関連する遺伝子群の発現を抑制することにより、減数第一分裂前期のプログラムを終結させるように働いていると結論された(図3b)。精巣では減数分裂の完了に続いて、ヒストンに置き換わってプロタミンへの取り込みや核が高度に凝縮されるなど精子形成に特徴的なクロマチン構造の再構成が起きる。精子形成に先駆けて、ZFP541-KCTD19転写抑制複合体はそれまで恒常的に活性化されていた多くの遺伝子の発現の不活性化に働いていると解釈された。各組織の体細胞系譜ではDNAメチル化、ヒストン修飾、ヒストンバリエーション置換、非ヒストンクロマチン結合タンパク質によってエピゲノム情報の継承が続いている。これとは対照的に、次世代への遺伝情報の伝達に先駆けて雄の減数分裂ではエピゲノム情報が解消される仕組みの一端が本研究で明らかとなった。



**図 2. ZFP541 および KCTD19 の減数分裂における機能の解析**  
 (a) ゲノム編集により作製された *Zfp541* 欠損マウスの変異アリル。  
 (b) *Zfp541* 欠損マウスの精巣の精細管切片。野生型(WT)では精子産生が見られるのに対して、*Zfp541* 欠損マウスでは精子や円形精子細胞の産生が見られない。スケールバー50um。  
 (c) ゲノム編集により作製された *Kctd19* 欠損マウスの変異アリル。  
 (d) *Kctd19* 欠損マウスの精巣の精細管切片。*Kctd19* 欠損マウスでは精子や円形精子細胞の産生が見られない。スケールバー50um。



**図 3. ZFP541 および KCTD19 の減数分裂における機能の解析**  
 (a) ChIP-seq 解析により、ZFP541 は *Dnmt3a* などのクロマチンやヒストン修飾など転写制御に関連する遺伝子の転写開始点近傍に結合することが明らかとなった。  
 (b) 精子形成プログラムに先駆けて、ZFP541 は転写抑制複合体としてクロマチン・エピジェネティクスに関連する遺伝子群の発現抑制に働く。

**(2) FBXO47の減数分裂における染色体対合過程における役割の解明**

*Fbxo47*もMEIOSINの標的の一つとして同定された遺伝子である。*Fbxo47*は遺伝子発現の定量解析や発現パターンの解析により、精巣内の精母細胞において特異的に発現していることや減数第一分裂の初期

のステージで働いていることが判明した(Tanno et al, iScience 2022)。さらに質量分析法を駆使した解析により、FBXO47は精母細胞において微量かつ一過的に発現して機能を発揮していることが判明した。そこで、ゲノム編集によりFBXO47欠損マウスを作製して検討を行ったところ、精母細胞における減数分裂の過程でいったんは見かけ上相同染色体の対合が起きるものの、その対合状態が安定に維持できなくなることが判明した。その結果、*Fbxo47*遺伝子を欠損した精母細胞は減数分裂組換えがうまく起こらなくなるため、減数分裂のプロセスを完了できずにやがて死滅してしまうことや、精子形成ができなくなり不妊となることが判明した(図4)。したがって、減数分裂の過程でFBXO47は「相同染色体の対合」状態を安定に維持するメカニズムに必須の役割を果たしていることが示唆された。

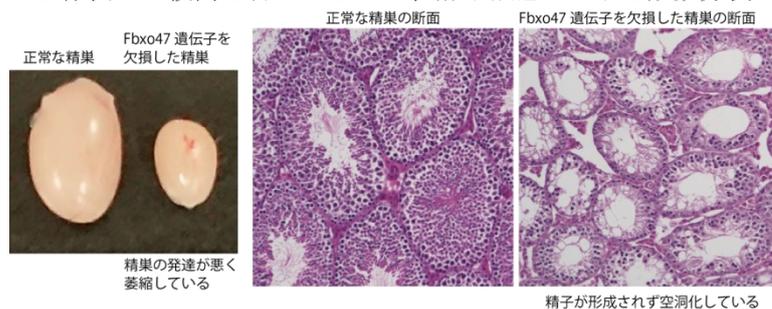


図 4. *Fbxo47* 欠損マウス精巣の解析

(a) *Fbxo47* 欠損マウス精巣では顕著な萎縮が見られる。(b) *Fbxo47* 欠損マウス精巣では減数分裂の途中で欠陥が見られる。

以上のようにMEIOSINの転写制御下に置かれている未解析遺伝子には、減数分裂の進行に必須の働きをするものが含まれることが明らかとなった。減数分裂開始因子の親玉を押さえたことで、体細胞分裂と減数分裂との違いを決定付けるメカニズムの全容解明と不妊の原因解明に向けて、国際的にも圧倒的に有利な状況で研究を推進することが期待される。

## 文 献

- (1) **Ishiguro K**, Matsuura K, Tani N, Takeda N, Usuki S, Yamane M, Sugimoto M, Fujimura S, Hosokawa M, Chuma S, Ko S.H.M, Araki K, Niwa H. MEIOSIN directs the switch from mitosis to meiosis in mammalian germ cells. *Dev. Cell* 52(4), 429-445. (2020)
- (2) Takemoto K, Tani N., Takada Y, Fujimura S, Tanno N, Yamane M, Okamura K, Sugimoto M, Araki K, **Ishiguro K**. Meiosis-specific C19orf57/4930432K21Rik/ BRME1 modulates localization of RAD51 and DMC1 to DSBs in mouse meiotic recombination. *Cell Reports* 31, 107686. (2020)
- (3) Horisawa-Takada Y, Kodera C, Takemoto K, Sakashita A, Horisawa K, Maeda R, Shimada R, Usuki S, Fujimura S, Tani N, Matsuura K, Akiyama T, Suzuki A, Niwa H, Tachibana M, Ohba T, Katabuchi H, Namekawa S, Araki K, **Ishiguro K**. Meiosis-specific ZFP541 repressor complex promotes developmental progression of meiotic prophase towards completion during mouse spermatogenesis. *Nature Communications* 12, 3184. (2021)
- (4) Oura S, Koyano T, Kodera C, Takada Y, Matsuyama M, **Ishiguro K**, Ikawa M. KCTD19 makes complex with ZFP541 and HDAC1 and is required for meiosis exit in male mice. *PLOS Genetics* 17(5): e1009412. (2021)
- (5) Tanno N, Takemoto K, Takada-Horisawa Y, Shimada R., Fujimura S, Tani N., Takeda N., Araki K, **Ishiguro K**.: FBXO47 is essential for preventing the synaptonemal complex from premature disassembly in mouse male meiosis. *iScience* 104008 (2022)