

24. 減数分裂開始因子 MEIOSIN の標的遺伝子の解析

石黒 啓一郎

熊本大学 発生医学研究所 染色体制御分野

Key words : 減数分裂, 不妊, 精巣, 精子形成

結 言

最近、我々はマウス生殖細胞より体細胞分裂から減数分裂へのスイッチに決定的な役割を果たす新規の転写因子 MEIOSIN を同定した。MEIOSIN は減数分裂関連遺伝子のプロモーターへの結合を介して減数分裂プログラムの活性化を制御する。MEIOSIN の標的遺伝子にはゲノムデータベースに眠る未解析のものも多く含まれる。これらの未解析の遺伝子には精子・卵子の正常な形成に必要とされるものが含まれることが明らかとなった。ゲノム編集法を用いた機能解析により、MEIOSIN 標的遺伝子の一つである *Zfp541* は新規の生殖細胞特異的遺伝子であることが判明した。*ZFP541* は *KCTD19* と共に転写抑制複合体を形成して、精子形成プログラムに先駆けてクロマチン・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ことが明らかとなった [1]。

方法・結果および考察

最近、我々は世界に先駆けて体細胞分裂から減数分裂の転換に決定的な役割を担う新規の生殖細胞特異的核内因子を同定した [1]。MEIOSIS initiator (MEIOSIN) と名付けた因子は DNA 結合因子として働くことが推定され、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事が判明した。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機能不明な未解析遺伝子が含まれることが判明した。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。既に我々の先行研究において、このうちの一つである *4930432K21rik* 遺伝子が減数分裂組み換えに機能する新規のリコンビナーゼ結合因子として働いていることを示した [2]。そこで本研究では、減数分裂の進行に必須の役割を果たす新規の因子の同定を目的として MEIOSIN の標的遺伝子の解析を行った。まず MEIOSIN によって発現制御を受ける未解析遺伝子群の中から、精巣・卵巣で特異的に発現を示すものを同定した。次いで、それらの遺伝子について受精卵への CRISPR-Cas9 導入による遺伝子破壊を行い、8 週齢 FO 個体の精巣が委縮を示すか否かを指標に表現型を解析した。

Zfp541 はこのスクリーニングにより MEIOSIN 標的遺伝子の一つとして同定された遺伝子である (図 1) [3]。*Zfp541* 遺伝子がコードするタンパク質は、Zinc finger ドメインと SANT 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もののその機能については不明であった。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 2a)。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 2b)。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 2c)。

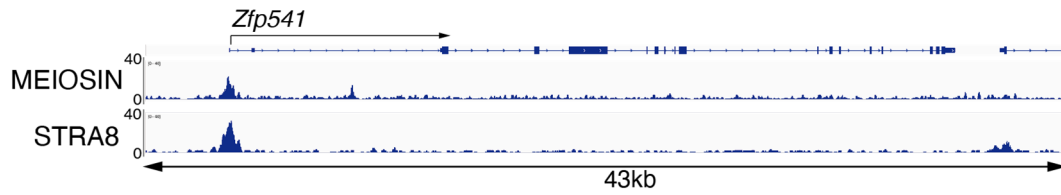


図 1. MEIOSIN 標的遺伝子として同定された *Zfp541*

ChIP-seq 解析により MEIOSIN および STRA8 は *Zfp541* 遺伝子のプロモーター領域に結合することが明らかとなった。

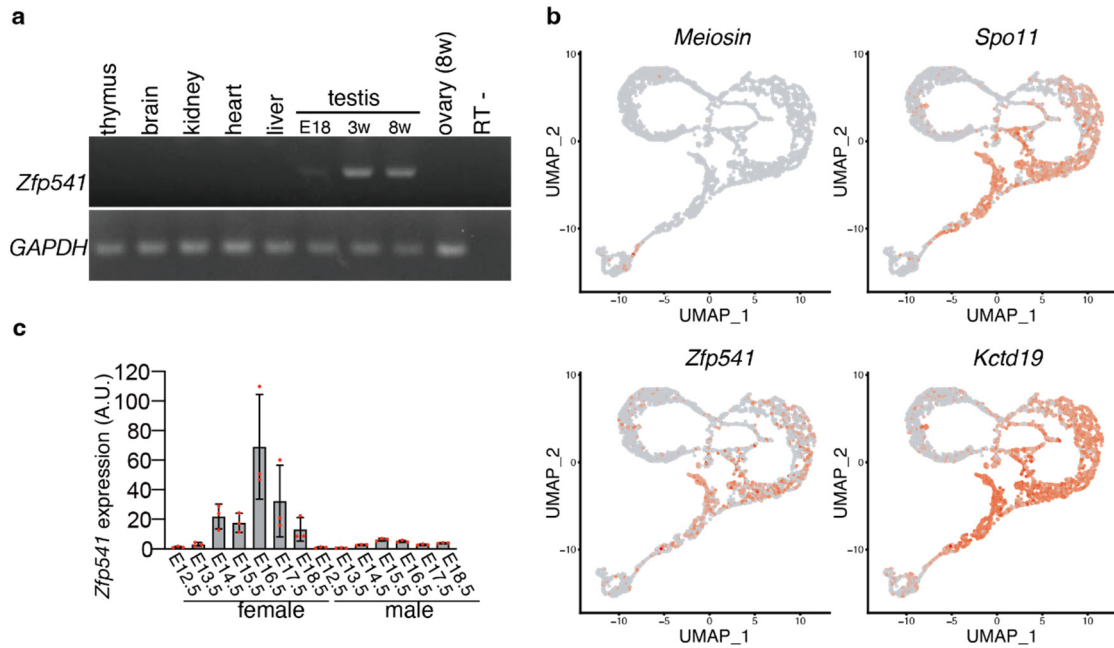


図 2. マウス精巣における *Zfp541* の発現パターン

- 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。
- 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。
- 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。One-way ANOVA test、 $P < 0.05$ 。

ゲノム編集を用いてマウスの *Zfp541* 遺伝子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 3a, 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。

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。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 3c、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・大浦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 [4]。

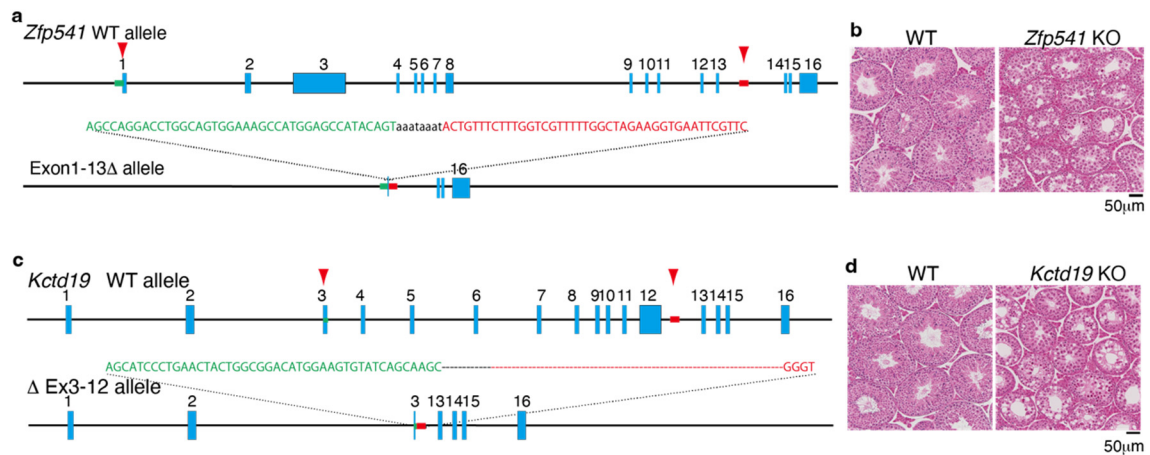


図 3. ZFP541 および KCTD19 の減数分裂における機能の解析

- 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。
- 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 $50 \mu\text{m}$ 。
- 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。
- 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 $50 \mu\text{m}$ 。

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 4a)。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 4b)。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。

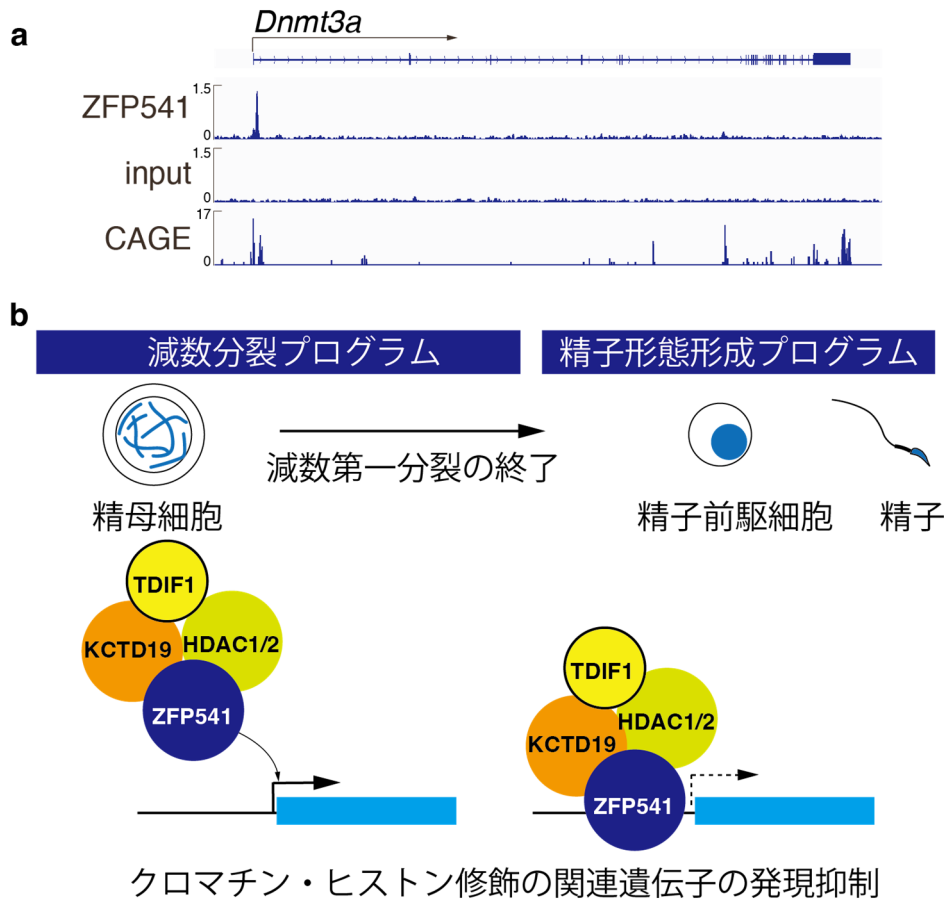


図 4. ZFP541 および KCTD19 の減数分裂における機能の解析

- 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 KCTD19、HDAC1/2、TDIF1 と共に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ことを示すモデル。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、熊本大学発生医学研究所染色体制御分野の高田（堀澤）幸助教、島田龍輝研究員、竹本一政研究員、熊本大学生命資源研究・支援センターの荒木喜美教授、UC DAVIS の行川賢教授である。

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* 2020 ;52(4), 429-445. PMID: 32032549 DOI: 10.1016/j.devcel.2020.01.010
- 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* 2020 ; 31, 107686. PMID: 32460033 DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107686

- 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* 2021 ;12, 3184. PMID: 34075040 DOI: 10.1038/s41467-021-23378-4
- 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* 2021; 17(5): e1009412. PMID: 33961623 DOI: 10.1371/journal.pgen.1009412