

精子産生能を司る染色体対合過程の解析

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

山中 総一郎

有性生殖における染色体相同組み換えは遺伝情報をシャッフルし、種の多様性を生み出す。減数分裂前期には相同染色体が対合し、組み換えが起こり、これが染色体分配や配偶子形成に大きな影響を与える。しかし、染色体対合の分子機構には未解明な点が多く残されており、種ごとにシステムが異なる可能性がある。そこで本研究では、マウスを用いて以下の2つを解明することを目的とした。

- ・染色体対合パターンを1塩基レベルの解像度で時系列的に解析。
- ・対合時に特異的に染色体に結合するタンパク質群を網羅的に同定

これにより、染色体対合の仕組みや哺乳類の生殖能維持のメカニズム解明に貢献することを目指した。

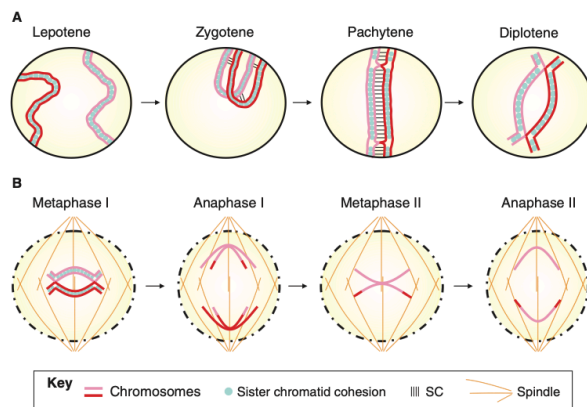
<染色体対合のための実験系の構築>

対合時には染色体間の相互作用がダイナミックに変化することが予想される。ゲノム上の相互作用部位をDNA配列をもとに解明するために、Hi-C法を利用した。Hi-C法とは、当該相互作用部位を濃縮し、そのDNA配列箇所を配列解読することで、任意の2つのゲノム領域間の相互作用を網羅的に検出する方法である。Hi-C法では通常 $1 \times 10^6 \sim 10^7$ 程度の細胞数が必要とされる。私はこれまでに、Hi-C法を 1×10^5 細胞で成功させた経験がある(Yamanaka et al., 2019, Developmental Cell)。本研究では、染色体対合過程を高い時間解像度で明らかにすることを目的としており、このことは各タイムポイントで使用できる細胞数が数千細胞程度に限られることを意味している。そこで、少数細胞用に特化したHi-C法であるtagHi-C (PMID: 32997998)を導入することとした。しかし現在までに、我々のグループでこの手法を再現することができなかった。引き続き条件検討を行うことで、数千細胞からのtagHi-Cによる染色体高次構造の解明を目指す。

<研究の方向性の展開>

当初の予定であったHi-C法を行うことができなくなったため、対合過程解明のための別の方向性を検討した。図1のように、減数分裂前期には染色体と核ラミナ(核膜の裏打ち構造)とが特異的な相互作用を示し、さらにその相互作用の様式が変更することが考えられている。この現象は、顕微鏡を用いた細胞生物学的なアプローチから1920年代で既に見出されているものの、染色体とラミナとの相互作用の様式をDNA配列解析を駆使して明らかにした例はなかった。

分裂期の染色体とは異なり、間期にいる体細胞のゲノムの一部の領域は、核ラミナと相互作用する。このゲノム領域はLamin-associated domain (LAD)と呼



(Tsai and McKee, 2011, JCS)

図1. 減数分裂期における染色体動態
マウスの減数分裂期では凝縮した染色体が対合・組み換え・複製の後に、2回の連続した染色体分配が行われる。

ばれ、主に遺伝子間領域に存在する。LAD の同定方法としてはこれまで Dam-ID (PMID: 18463634) や Lamin に対する ChIP-seq が用いられてきた。これらの手法は、特殊なコンストラクトを細胞内に発現させるか、大量の細胞が実験に必要であるため、マウス個体内の稀少な細胞集団に対して適用することは不可能であった。そこで今回私は、Lamin に対して CUT&TAG を行うこととした。CUT&TAG (PMID: 31036827) は、ヒストン修飾や DNA 結合タンパク質のゲノム上の局在プロファイリングを、少数細胞からでも行うことが出来る手法である。

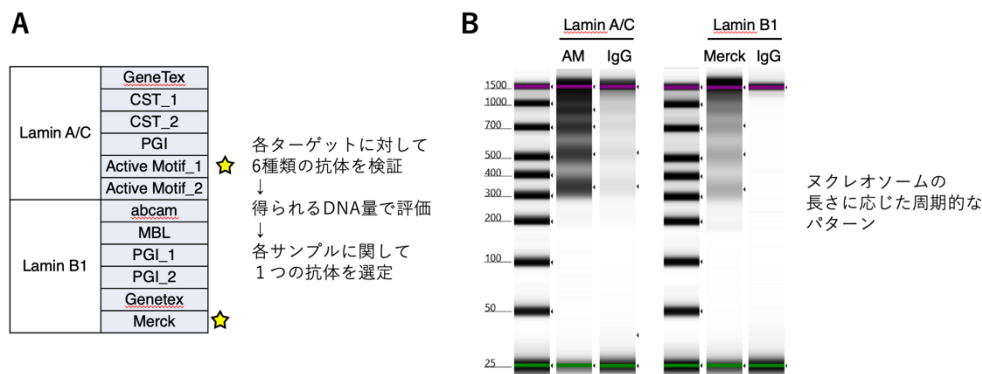


図2. CUT&TAGに使用可能なLamin抗体の選定

A. Lamin抗体をLamin A/C, Lamin B1のそれぞれに対して6種類ずつ用意し、CUT&TAGを行った。このうち★マークのものについて良好な結果が得られた。
B. Lamin A/C, Lamin B1のそれぞれに対してのCUT&TAG処理後のDNAライブラリの泳動パターン。ヌクレオソームの大きさに応じたDNAサイズにバンドが見られる。

これまでに Lamin に対する CUT&TAG を行った先行研究がなかったため、抗体の選定から開始した。計 12 種の抗体の中から、Lamin A/C と Lamin B という Lamin を構成する 2 つのタンパク質に対して、CUT&TAG に使用できる抗体をそれぞれ選定した (図 2)。それらの抗体を用いて行った CUT&TAG の結果を図 3 に示す。今回得られたプロファイルは、Dam-ID 法で検出された Lamin のプロファイルと相関が見られたことから、ゲノム上の LAD を再現性よく同定出来ると結論付けた (図 3)。

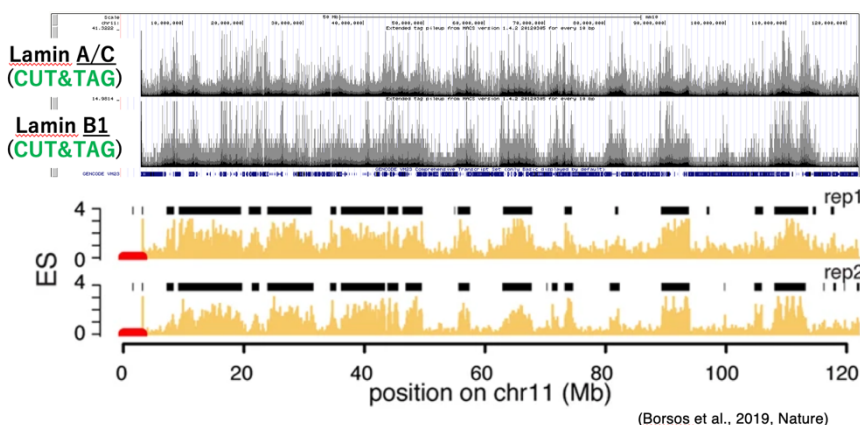


図3. Lamin CUT&TAGによるLADのプロファイリング
(上段) Lamin A/C, Lamin B1のCUT&TAGの結果。マウス 11 番染色体上のシグナルを示している。(下段) 上段と同じゲノム領域におけるDam-IDの結果図。Lamin CUT&TAG ではDam-IDと同様に遺伝子間領域で高いシグナルが観察される。

<Lamin CUT-TAG の長所・短所>

前項において、Lamin CUT&TAG により数万細胞からも LAD の同定が可能であることを示した。次に、LAD のゲノム上の分布についてより詳細に観察したところ、図 4 で示すように、遺伝子のプロモーター上に Lamin CUT&TAG の強いシグナルが見られた。CUT&TAG はその原理上、ゲノムのアクセシビリティが高い領域に非特異的にシグナルが出る可能性があることから、今回のプロモーター上のシグナルは実際の LAD を示すものではないアーティファクトなシグナルであると判断した。この点を更に検証するために、ゲノムのアクセシビリ

ティのみを評価したデータを、Lamin CUT&TAG のデータからサブトラクションし、より厳密な LAD の同定を行うことが今後の展望に含まれる。

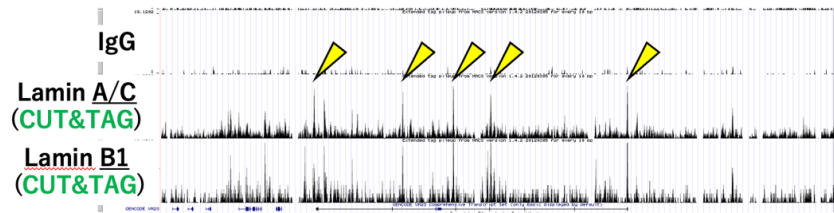


図4. Lamin CUT&TAGではプロモーター領域にノイズが見られる
ある遺伝子領域におけるLamin CUT&TAGのシグナル分布を確認すると、基底レベルに加えてプロモーター領域に強いシグナルが観察される。

<波及的に得られた実験成果>

本研究では染色体対合期の染色体動態を知る目的で、HI-C法を検討した後、Lamin CUT&TAGの確立に至った。精子産生過程では、染色体対合期以外にゴノサイトと呼ばれる胎仔期の生殖細胞で、LADがダイナミックに変わることを見出している。本研究で得られた実験結果の一部は、このゴノサイト期の生殖細胞の性状解明につながり、2報の論文発表に至った (Uneme et al., 2024, PNAS; Li et al., 2024 bioRxiv)。