

新規の減数分裂制御因子 ZFP541-KCTD19複合体は 雄性配偶子形成に関与する

小寺 千聡¹⁾, 高田 幸²⁾, 竹本 一政²⁾, 荒木 喜美³⁾, 大場 隆¹⁾, 近藤 英治¹⁾, 石黒啓一郎²⁾

1) 熊本大学大学院生命科学研究部産科婦人科学講座

2) 熊本大学・大学院生命科学研究部発生医学研究所染色体制御分野

3) 熊本大学・大学院生命科学研究部生命資源研究・支援センター

はじめに

減数分裂は配偶子形成のための生殖細胞特異的な細胞分裂の様式で、2回の連続した染色体分配の過程を経てゲノムが半数化された配偶子が形成される。特に、第一減数分裂は相同染色体の対合と組換えによる二価染色体の形成、そしてゲノム半数化のための染色体分配が組み込まれる点で体細胞分裂と様相が大きく異なり、その制御機構の大部分が謎に包まれている。マウスなどの動物モデルを用いた実験系において、減数分裂の過程に欠陥があると減数分裂が完了せず不妊を呈することが知られているが、それらの因子とヒト不妊症との関連もいまだ明らかではない。

生殖細胞ははじめに体細胞分裂により増殖し、その後レチノイン酸に誘導される STRA8 を介した何らかのスイッチにより減数分裂が開始するとされてきた。われわれは STRA8 と協働する減数分裂開始の転写因子として MEIOSIN を同定した。MEIOSIN 標的遺伝子には減数分裂関連遺伝子が数多く含まれること、そしてゲノム編集法を用いたマウスの *Meiosin* 遺伝子を欠損させると、雌雄ともに不妊を呈することを報告した¹⁾。

さらに、MEIOSIN 標的遺伝子の中にはゲノムデータベースに眠る未解析遺伝子が多く含まれることが明らかとなった。これらの中には減数分裂に関連する生殖細胞特異的な機能遺伝子が含まれていることが想定され、減数分裂進行に必須の因子と仮定すれば、遺伝子破壊により妊孕性に異常を呈することが予想された。そこでわれわれは MEIOSIN 標的遺伝子のうち機能が未知である遺伝子について、マウス受精卵でのゲノム編集法を用いて、8週齢における精巣が萎縮を示すか否かを指標にスク

リーニングを行い複数の新規減数分裂関連遺伝子を同定する^{2,3)}とともに、本研究の対象である *Zfp541* に注目し研究を行った (図1)⁴⁾。

ZFP541は減数第一分裂の進行を制御する転写因子として働く (図2)

ZFP541は Zinc finger ドメインを有する共役転写因子と考えられていた。*Zfp541*の各臓器における発現パターンを検討したところ、精巣特異的な発現が認められた。さらに生殖細胞における Single cell RNA シークエンスデータの再解析からは、精母細胞および円形精子細胞での発現が示唆され、その事実と符合するように免疫組織学的検討においても減数第一分裂前期のパキテン期から円形精子細胞の核内に発現することが明らかとなった。

次に CRISPR-Cas9法を用いて作成した *Zfp541* 欠損マウスの機能解析を行った。精母細胞の減数分裂は第一分裂前期のパキテン期まで進行していたが、途中で死滅して以降のステージ進行に障害がみられた。その結果、雄マウスの精巣内および精巣上体に精子細胞は認められず、交配実験においても産仔は得られず不妊を呈した。

ZFP541はその構造上の特徴から DNA 結合能を持つ転写因子であることが推定される。そこで免疫沈降および質量分析法を用いて、精巣クロマチン分画における ZFP541の相互作用因子を解析したところ、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。とりわけ HDAC1/HDAC2と TDIF1を含むことから遺伝子の転写抑制に働くことが推定され⁵⁾、これらが転写因子複合体として遺伝子発現に抑制的に働くことにより減数分裂進行を制御していることが示唆された。実際に、この複合体によって発現が抑制される遺伝子にはエピゲノムの調節に関連する遺伝子が多く含まれる事が判明した。また Shiらの報告によれば、ZFP541はパキテン期より前に発現する減数分裂組換え関連遺伝子や *Meiosin* の発現を押さえ込むことにも働く解釈さ

連絡先：小寺千聡

熊本大学大学院生命科学研究部産科婦人科学講座

〒860-8556 熊本中央区本荘1丁目1番1号

TEL : 093-373-5269

FAX : 096-363-5164

E-mail : koderachisato@kuh.kumamoto-u.ac.jp

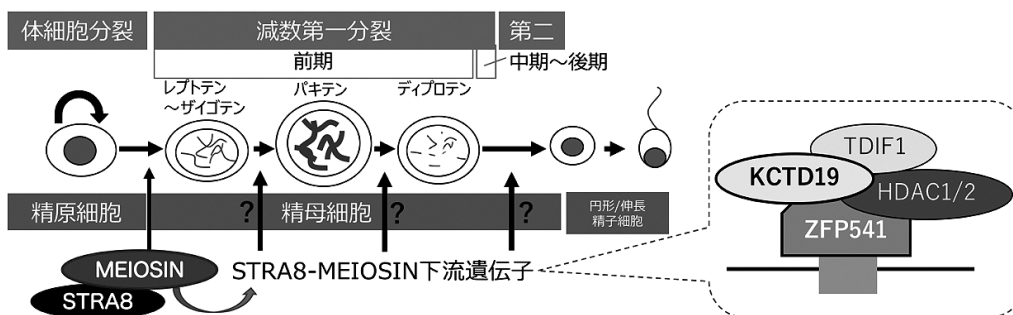


図1 MEIOSIN 標的遺伝子と減数分裂

STRA8-MEIOSIN の下流には既知の減数分裂関連因子が多く含まれることが明らかとなる一方で、多数の機能未知タンパク質も存在する。そのうち HDAC1, TDIF1 および KCTD19 (後述) と複合体を形成する ZFP541 に注目して減数分裂との関わりについて解析を行った。

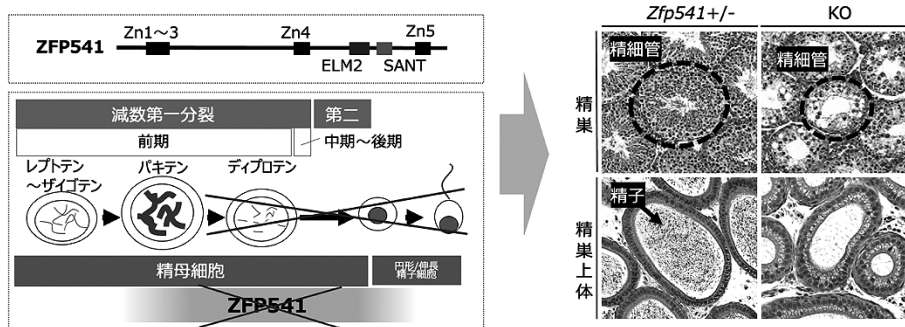


図2 *Zfp541* の減数分裂制御における役割

ZFP541 はパキテン期以降の精母細胞に発現がみられる。*Zfp541* を欠損すると減数第一分裂前期パキテン期以降のステージ進行に障害をきたし、無精子症を呈し不妊となることから、新規転写因子 *Zfp541* は減数第一分裂の進行を制御する精子形成に必須の因子と考えられる。

れている⁶⁾。

Kctd19は減数第一分裂の完了に必須の役割を果たす (図3)

興味深いことに、ZFP541の相互作用因子の1つとして同定された KCTD19は、タンパク質相互作用に関連する POZ/BTB ドメインを有しているものの分子機能は不明であった。われわれの検討では、*Kctd19* の各臓器および生殖細胞の分化段階における発現は *Zfp541* の発現パターンと酷似していた。*Kctd19* 欠損マウスの精巣内および精巣上体に精子細胞は認められず、*Zfp541* 欠損マウスと同様に不妊を呈した。しかしながら、*Kctd19* 欠損マウスの精母細胞では第一分裂パキテン期を越えて中期まで減数分裂の進行が認められ、*Zfp541* 欠損マウスとは表現型が異なることが明らかとなった。微小管マーカーとして Tubulin および動原体マーカーとして MEIKIN⁷⁾ を用いて免疫組織学的検討を行ったところ、*Kctd19* 欠損マウスでは紡錘体は観察されたものの染色体の整列過程に異常を示すことが示された。大阪大学微

生物研究所の Oura, Ikawa らにより行われた *Kctd19* 欠損マウスの解析でも同様の結果が示されており⁸⁾, *Kctd19* の欠損は精子形成過程における減数第一分裂中期の染色体分配の制御に間接的に影響を及ぼすことが示され、雄性不妊に關与すると結論づけた。

以上の結果より、ZFP541と KCTD19は転写因子複合体として挙動を共にして減数分裂を制御していると推定された。しかしながら本研究では KCTD19と ZFP541との相互作用、特に KCTD19が ZFP541の転写活性に作用する分子メカニズムに関しては明らかではなく、今後の検討課題と考えられた。

減数分裂制御機構における性差

今回われわれは、ZFP541および KCTD19は雄性配偶子形成のための減数分裂進行に必須の因子であることを示した。とりわけ本研究では、雄の減数分裂がエピゲノムのリセットを介して後期雄性配偶子形成の発生プログラムと連動していることが初めて示された。一方で雌においては、ZFP541, KCTD19いずれも胎生期卵巣にお

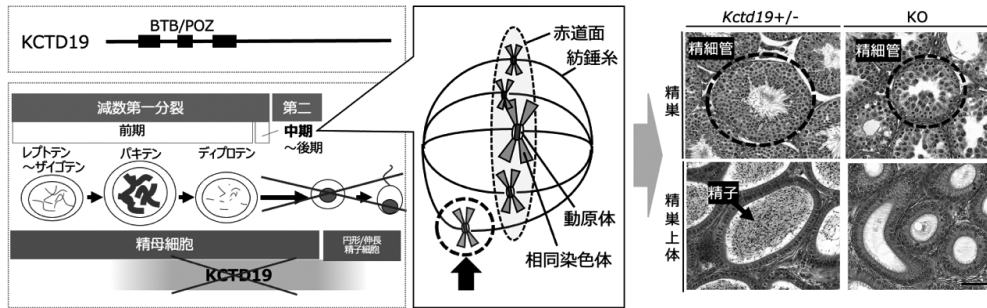


図3 *Kctd19*の減数分裂制御における役割
 KCTD19はZFP541同様にパキテン期以降の精母細胞に発現がみられ、これを欠損したマウスは無精子症を呈するが、第一分裂中期まで減数分裂の進行が認められる。第一分裂中期の精母細胞では、紡錘体の形成はみられるものの動原体が赤道面を離脱した部位に認められる(↑)ことから、*Kctd19*の欠損は染色体分配の制御に間接的に影響を及ぼすと考えられる。

いてタンパク発現が認められるものの、少なくともこれらの単独欠損は妊孕性に影響を及ぼさないことが明らかとなった。減数分裂の基本的な素過程は雌雄とも同じと考えられてきたが、本研究では減数第一分裂の遺伝子発現制御における性差の存在が示される結果となった。

減数分裂異常とヒト不妊症に関連した今後の展望

本邦では新たに出生する児の約6%が体外受精によって誕生しており、また2022年4月からは不妊治療が保険診療となった。このような社会的背景の中、減数分裂の機構を解明することは不妊症に対する新たな治療法開発へと発展する可能性を持つ点で興味深く意義のあるテーマと思われる。

女性においては加齢とともに妊孕性が低下する要因として染色体異数に焦点が当てられ、卵子形成過程における加齢と減数分裂異常についての知見⁹⁾が蓄積されてきた。われわれは、産婦人科診療で経験する早発卵巣不全に注目している。ヒトの平均閉経年齢は50歳とされるが、本邦では毎年約1万5千人が40歳未満で閉経に至り、早発卵巣不全(primary ovarian insufficiency; POI)と呼ばれる。POIの原因は多岐にわたり、ターナー症候群などの性染色体異常や、手術や放射線などによる医原性の卵巣機能不全を除く大部分の症例は原因が不明で、治療法はもちろん予知する方法もいまだない。本邦における晩婚・晩産化の進行を背景として、POIに至って初めて挙児を希望する女性もあるが、POI女性のほとんどは体外受精・胚移植を試みても卵子を得ることはできない。

近年POI患者における減数分裂関連遺伝子異常が報告されている¹⁰⁾が、多くは散発的な症例報告に留まっている。われわれはヒトのPOIに関連する新規遺伝子を系統的に発見するための研究を開始している。熊本大学

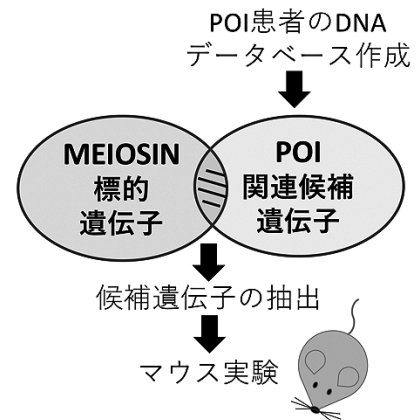


図4 POI患者の遺伝子バリエーションに対する減数分裂関連MEIOSIN標的遺伝子群によるスクリーニング
 POI患者のゲノムデータベースを作成し、これらの患者から抽出される遺伝子バリエーションをMEIOSIN標的遺伝子群でスクリーニングすることで、効率よくPOI発症に関連する減数分裂制御因子を抽出する。

病院産科婦人科で加療しているPOI患者のゲノムデータベースを作成し、これらの患者から抽出される遺伝子バリエーションをMEIOSIN標的遺伝子群でスクリーニングすることで、POIの発症に関連する減数分裂関連遺伝子を抽出しようとするものである(図4)。検体のエクソーム解析データの収集が進めば、疾患モデル動物の解析を併用することにより本研究は臨床から基礎へと発展し、さらに将来的にはPOI発症の予知や早期診断、治療法の開発へ還元できることが期待される。

今回の研究により、減数分裂の遺伝子発現制御には性差が存在することが明らかとなった。近年、ヒトにおける精子数の減少が指摘されており、環境化学物質等の関与が疑われているがその原因は不明である。無精子症の男性は一般集団の約1%を占め、また不妊治療中の男性

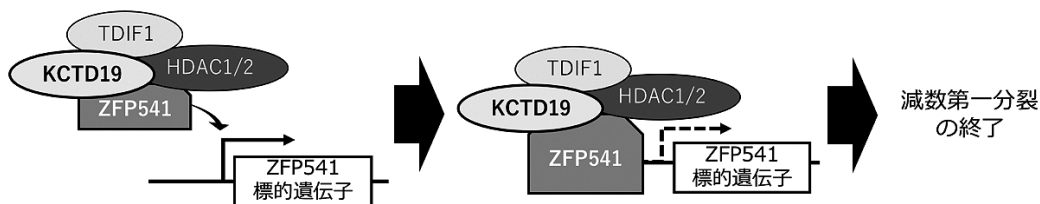


図5 ZFP541-KCTD19複合体は第一減数分裂の進行を制御する転写抑制因子として働く

の5人に1人は無精子症である。造精機能の障害による非閉塞性無精子症のうち性染色体の異数を伴わない症例の多くは原因不明とされている。精子形成過程の減数分裂は外的要因に高い感受性を示す^{11,12)}ことから、非閉塞性無精子症の原因遺伝子を明らかにすることはヒト男性不妊の要因を明らかにするばかりでなく、テーラーメイド化された治療の可能性を期待させるものである。

まとめ (図5)

われわれは、ZFP541はKCTD19と共に転写因子複合体を形成し、雄マウスの第一減数分裂進行に必須であることが明らかにした。さらにこれらの因子を欠損した雄マウスでは、減数分裂が中断することでヒトの無精子症に相当する表現型を呈し不妊となることが示された。さらなる研究の発展により減数分裂の異常とヒト不妊症に關して今後新たな知見が加わることが期待される。

謝辞

本研究は、文部科学省 科学研究費助成事業 新学術領域研究 (非ゲノム情報複製) の支援を受けて、カリフォルニア大学 Davis 校・行川賢博士、九州大学・生体防御医学研究所・鈴木淳史博士・堀澤健一博士、大阪大学・立花誠博士、熊本大学発生医学研究所・丹羽仁史博士・丹野修宏博士・島田龍輝博士、同リエゾンラボ、熊本大学産科婦人科学講座片淵秀隆博士との共同で実施した。

引用文献

- Ishiguro K, Matsuura K, Tani N, Takeda N, Usuki S, Yamane M, Sugimoto M, Fujimura S, Hosokawa M, Chuma S, Ko SHM, Araki K, Niwa H (2020) MEIOSIN directs the switch from mitosis to meiosis in mammalian germ cells. *Dev Cell* 52, 429-445.
- Takemoto K, Tani N, Takada Y, Fujimura S, Tanno N, Yamane M, Okamura K, Sugimoto M, Araki K, Ishiguro K (2020) Meiosis-specific C19orf57/4930432K21Rik/BRME1 modulates localization of RAD51 and DMC1 to DSBs in mouse meiotic recombination. *Cell Rep* 31, 107686.
- Tanno N, Takemoto K, Takada-Horisawa Y, Shimada R, Fujimura S, Tani N, Takeda N, Araki K, Ishiguro K (2022) FBXO47 is essential for preventing the synaptonemal complex from premature disassembly in mouse male meiosis. *iScience* 25, 104008.
- 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 SH, Araki K, Ishiguro KI (2021) Meiosis-specific ZFP541 repressor complex promotes meiotic prophase exit during spermatogenesis. *Nat Commun* 12 : 3184.
- Turnbull RT, Fairall L, Saleh A, Kelsall E, Morris KL, Ragan TJ, Savva CG, Chandru A, Millard CJ, Makarova OV, Smith CJ, Roseman AM, Fry AM, Cowley SM, Schwabe JWR (2020) The MiDAC histone deacetylase complex is essential for embryonic development and has a unique multivalent structure. *Nat. Commun* 11, 3252.
- Xu J, Gao J, Liu J, Huang X, Zhang H, Ma A, Ye J, Zhang X, Li Y, Yang G, Yin H, Khan R, Li T, Fan S, Jiang X, Zhang Y, Jiang H, Ma H, Shi Q (2022) ZFP541 maintains the repression of pre-pachytene transcriptional programs and promotes male meiosis progression. *Cell Rep* 38, 110540.
- Kim J, Ishiguro K, Nambu A, Akiyoshi B, Yokobayashi S, Kagami A, Ishiguro T, Pendas AM, Takeda N, Sakakibara Y, Kitajima TS, Tanno Y, Sakuno T, Watanabe Y (2015) Meikin is a conserved regulator of meiosis-I-specific kinetochore function. *Nature* 517, 466-471.
- Oura S, Koyano T, Kodera C, Horisawa-Takada Y, Matsuyama M, Ishiguro KI and Ikawa M (2021) KCTD19 and its associated protein ZFP541 are independently essential for meiosis in male mice. *PLoS Genet* 17, e1009412.
- Sakakibara Y, Hashimoto S, Nakaoka H, Kouznetsova A, Höög C, Kitajima TS (2015) Bivalent separation into univalents precedes age-related meiosis I errors in oocytes. *Nat Commun* 6, 7550.
- Huang C, Guo T, Qin Y (2021) Meiotic Recombination Defects and Premature Ovarian Insufficiency. *Front Cell Dev Biol* 9, 652407.
- Skakkebaek NE, Lindahl-Jacobsen R, Levine H, Andersson AM, Jørgensen N, Main KM, Lidegaard Ø, Priskorn L, Holmboe SA, Bräuner EV, Almstrup K, Franca LR, Znaor A, Kortenkamp A, Hart RJ, Juul A (2022) Environmental factors in declining human fertility. *Nat Rev Endocrinol* 18, 139-157.
- Hirano K, Nonami Y, Nakamura Y, Sato T, Sato T, Ishiguro KI, Ogawa T, Yoshida S (2022) Temperature sensitivity of DNA double-strand break repair underpins heat-induced meiotic failure in mouse spermatogenesis. *Commun Biol* 5, 504.