

遺伝子組換えに関与する遺伝子群の作用機構

松田宗男¹ 佐藤玄¹ 平井和之¹
宮東昭彦² 福富俊之³ 島幸夫⁴¹ 杏林大学医学部生物学² 杏林大学医学部解剖学³ 杏林大学医学部薬理学⁴ 杏林大学保健学部臨床検査教育学

ヒトの疾患原因遺伝子の75%は、ショウジョウバエでも見つかっており (Pandey and Nichols, 2011), ショウジョウバエのヒト疾患モデルとしての役割は大きい。特に、遺伝的組換えの欠損を示す多くの突然変異は、放射線や紫外線に感受性を示し、多くの疾患との関連が報告されている。我々は、ショウジョウバエを用い有性生殖における配偶子形成から受精までの遺伝的機構解明を進めている。一連の過程のうち、特に組換え機構と受精依存的な発生開始を制御する遺伝的機構の解明を目指している。本研究では、雄で減数分裂時由来の組換えが観察されないキイロショウジョウバエと異なり高頻度に減数分裂由来の雄組換えが観察され、受精非依存性の単為生殖系統が発見されたアナナスショウジョウバエ (*D. ananassae*) を用い以下の2つの解析を行った。

- ① 組換え hotspot 領域について、高頻度に減数分裂由来の雄組換えが観察される系統を用い交配実験と分子マーカーで構造解析をした。組換え機構研究の最も進んでいる酵母や *D. melanogaster* の組換えに関与する24遺伝子を選び、本種雄での発現を qPCR 法と質量分析法 (LC-MS) によるプロテオーム解析を合わせて行った。従来の研究で明らかになってきた組換えの二本鎖切断モデル (Double Strand Breaks Model: DSB) が本種雄でも適用出来るかを検定し、何故多くの生物種で雌雄の組換え頻度に差があるのかを検討した。
- ② ショウジョウバエ受精卵で使われる中心体は、雄由来であることが知られている。従って通常未受精卵では、中心体形成が見られない。今回、中心体マ-

カー (Cnn:Centrosomin) の抗体を用い、有性生殖系統の受精卵、未受精卵、及び単為生殖系統の卵内における中心体の有無とその分布を細胞学的に調べ、何故精子の侵入により核の2倍化とその後の分裂が開始されるか、そのしくみ解明に向け解析を行った。

材料

系統:

Drosophila melanogaster: Oregon-R 系統 (野生型の標準系統)*Drosophila ananassae* の以下の系統。

1. *e⁶⁵ pi ; bri ru* (EP 8N-2): 近交系統, 第2染色体に組換え促進因子が位置付けられている。(Sato *et al.*, 2000, Goni *et al.* 2006)
2. AABBg1: 近交系統, ゲノムの塩基配列が決定されている有性生殖のみを行う標準系統 (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007, Schaeffer *et al.*, 2008)
3. 単為生殖系統
 - 1K4: *D. ananassae/D. pallidosa* モザイク系統 (Sawamura *et al.*, 2005)
 - IM#7: *D. pallidosa* IM#7 系統 (Matsuda & Tobar, 2004)
 - LAE345-IM: *D. pallidosa*-like Lae 集団 (Matsuda & Tobar, 1999)

D. ananassae の系統関係は図1に示す。本種と *D. melanogaster* の分岐は、およそ1,500万年前と推定されている。

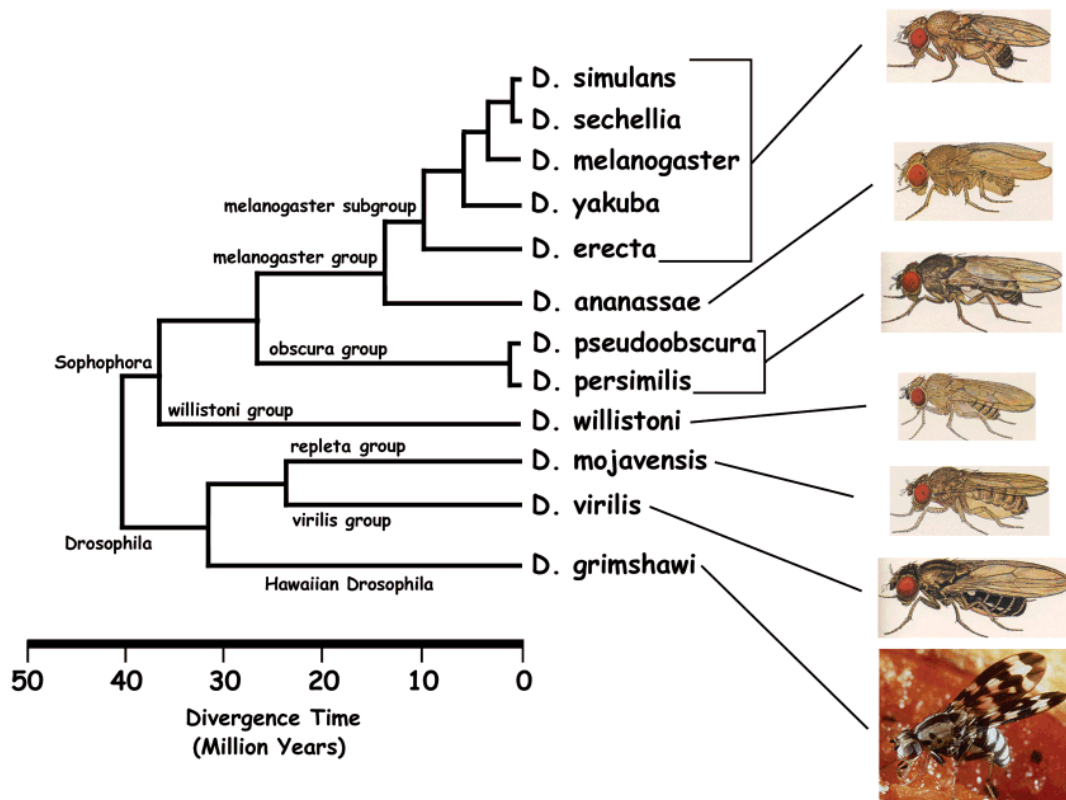


図1 ショウジョウバエの系統関係
(*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007 の結果より作成された系統樹, FlyBase より)

遺伝子発現解析

羽化直後の雄から精巣を成熟した雌から卵巣を分離し以降の解析 (qPCR 法, LC-MS 法) に用いた。

qPCR に用いた meiotic mutant 遺伝子 (Probe などの塩基配列情報は省く) の名称と染色体上の位置, 現在までに知られている機能について表 1 で示した。発現のコントロールとして *αTubulin* と *αGpdh* の 2 つの遺伝子を用いた。

結果と考察

本研究の解析は, 終了していないが, 現在までに得られている結果とそれを基にした考察を以下に記す。

① 組換えホットスポット領域の解析:

我々は, 第 2 染色体動原体近傍の *Om(2C)-Arc* (standard map distance: 0.4cM) 間の組換え頻度は, 標準組換え頻度に対して 30~40 倍 (約 15%) の雄組換え頻度及び雌組換え頻度が 15 倍 (約 6%) を示す系統を発見し, そのほとんどの交叉切断点が唾腺染色体の 45C~46C の 1,283kb の領域に分布 (雄: 81%, 雌: 70%) することを発見した (図 2)。

同領域について, 組換え促進因子を持つ EP 8N-2 系統と, 同系統とヘテロ接合の時にのみ高頻度組換えが見られる系統 (AABBg1) との塩基配列を比較した。図 3 で示すように, *TyrR* (Tyramine receptor) 領域に, AABBg1 系統には無い 12.7kb の挿入配列が, 標準系統にはある 1.1kb の配列が欠失

していることが明らかになった。また, 交叉の切断点は, この挿入配列の両側に分布していることが示唆されている。さらに, 12.7kb の挿入配列は, 既存のトランスポゾン等とは相同性は無く, 有意な ORF も認められなかった。従って, 配列から産生されるタンパク質そのものが組換え頻度に影響しているとは考えられず, ヘテロ接合体でのクロマチン構造に依存し, 乗換え切断点のホットスポットになっている可能性を示唆している。

② 雄組換えに関連する遺伝子の探索と発現解析:

選択した 24 遺伝子 (表 1) のうち DSB (Double strand breaks) の初期に関与すると考えられている 15 の中で, *D. melanogaster* では卵巣, 精巣とも微量の発現しか見られず, 発現量も雌雄で殆ど差がない *mei-P22* と *mei-W68* の発現が *D. ananassae* 精巣では 47 倍 (*mei-P22*) と 1.2~2.2 倍 (*mei-W68*) であった。さらに組換え頻度の高い雄では, より高い発現量が観察された (Data not shown)。このことは, 本種雄組換え機構に, *D. melanogaster* の雌で減数分裂期に DSB を引き起こすと考えられている遺伝子が発現し, 実際に DSB を引き起こしている可能性を示唆している。DSB 生成後の組換えに関与する MRN complex 形成に係わる遺伝子 (6~8) の発現は, 精巣の方が卵巣より低いという傾向は, *D. ananassae* も *D. melanogaster* の場合と変わらない

表1 qPCRの対象とした meiotic mutants のリスト

	meiotic genes	chromosome arm	function
1	<i>c(2)M</i>	3R	reciprocal meiotic recombination
2	<i>mei-P22</i>	2R	reciprocal crossing-over
3	<i>mei-41</i>	X	cell cycle
4	<i>mei-P26</i>	X	germ cell dependent
5	<i>mei-W68</i>	3L	reciprocal meiotic recombination; meiotic DNA DSBs processing
6	<i>nbs</i>	2R	DSB repair
7	<i>rad50</i>	3L	DSB repair; telomere maintenance; chromosome organization; telomere capping
8	<i>mre11</i>	3R	DNA repair protein Mre11; Metallophosphoesterase domain; DNA-binding
9	<i>tefu</i>	2L	protein kinase DSB
10	<i>mus304</i>	2R	meiotic recombination
11	<i>BLM</i>	2L	reciprocal meiotic recombination; DNA duplex unwinding; negative regulation of DSB repair via single-strand annealing
12	<i>okr</i>	3R	DSB repair
13	<i>rad51</i>	3L	recombinase activity; DNA-dependent ATPase activity
14	<i>spn-B</i>	2L	recombination polarity
15	<i>spn-D</i>	2L	ATPase activity
16	<i>brca2</i>	3L	meiotic recombination checkpoint
17	<i>mei-218</i>	X	female meiotic chromosome segregation and recombination
18	<i>Klp3A</i>	X	microtubule binding protein
19	<i>mei-9</i>	X	female meiotic chromosome segregation
20	<i>smc1</i>	2L	meiotic protein required for centromere cohesion,
21	<i>polo</i>	2R	meiotic cell cycle, sperm aster formation
22	<i>ord</i>	3L	sister chromatid cohesion
23	<i>ku80</i>	3R	ATP-dependent DNA helicase
24	<i>wrn</i>	2L	negative regulation of mitotic recombination

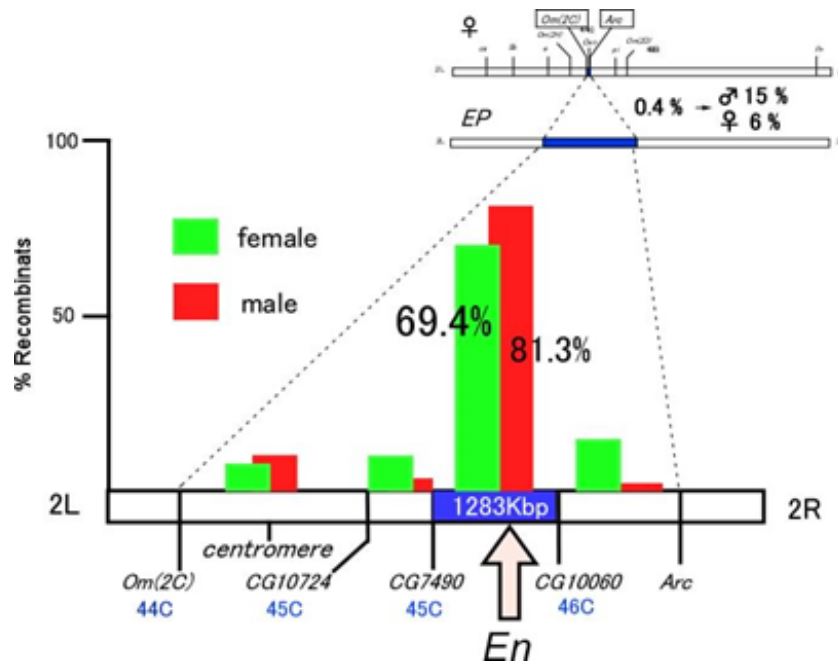


図2 *D. ananassae* 組換え促進因子ヘテロ接合体における第2染色体右腕の組換え頻度の分布。(44C~46Cは、唾腺染色体上の位置を表す)(日本分子生物学会2012より)

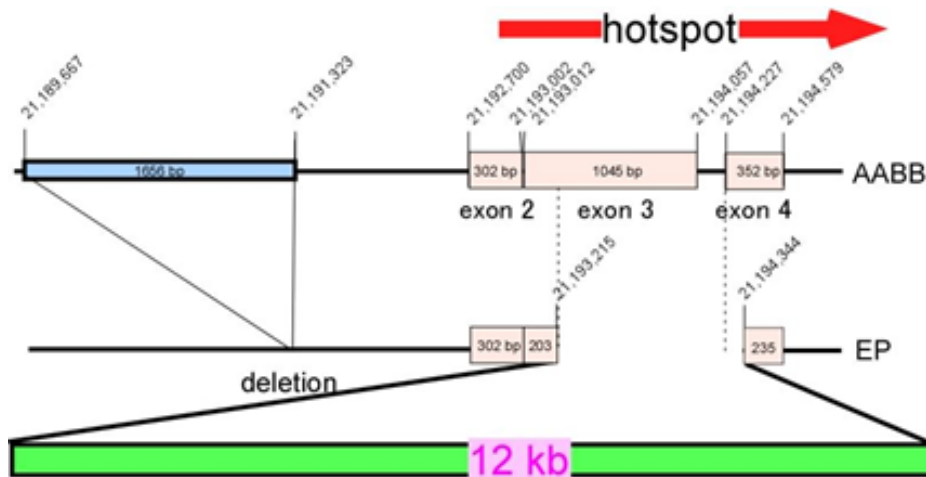


図3 組換えホットスポット領域の2系統間(AABBg1とEP 8N-2系統)の比較(日本分子生物学会2012より)

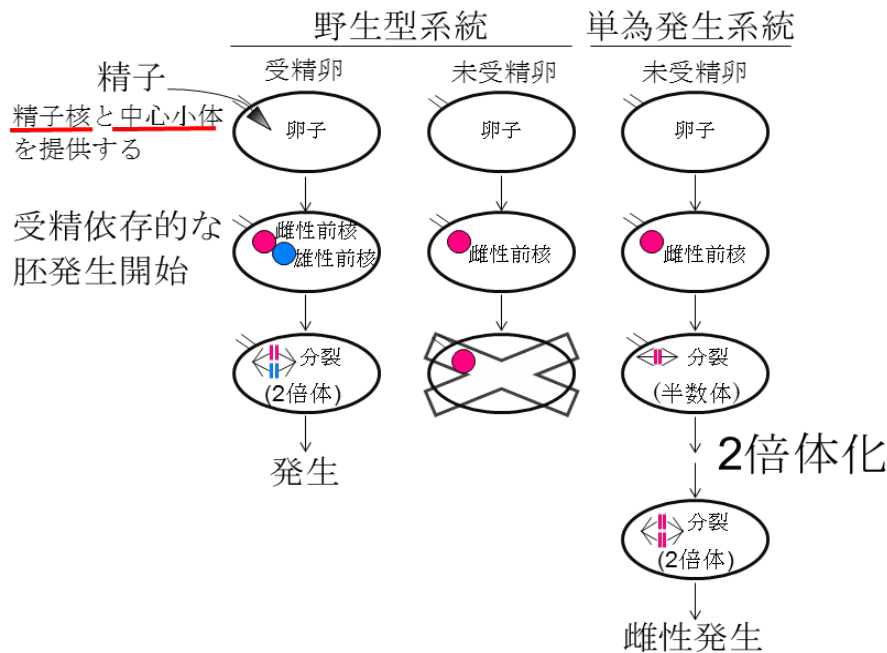


図4 有性生殖と単為生殖の相違点 (平井 他, 日本遺伝学会 2012 より)

い。しかし、組換え頻度、染色体異常の発生頻度の高い *D. ananassae* の系統では、雄雌比が2倍高くなっている。また *D. melanogaster* の精巣/卵巣の発現量比 (0.4) である *Blm* では、0.1~0.2 とその割合が *D. ananassae* では低下している。*D. melanogaster* の *Blm* 突然変異体の雌では、減数分裂期に DSB を誘発すると野生型と比較し組換え頻度が上昇し染色体欠失を起こす。*mei-218* により野生型 *Blm* 遺伝子の発現を抑制していることが知られている (Kohl et al., 2012)。本種の *mei-218* は、雌での発現量が高く、雄での発現が相対的に低くなっている。即ち *D. melanogaster* では、雄で組換えが見られないので、*mei-218* の発現が雄で高いが、雄で組換えが起こる *D. ananassae* では、逆に雄での発現量が低くなっており、雄での組換えの有無と平行な現象である。以上、実験解析の途中ではあるが、本種特有の雄組換えも DSB システムにより引き起こされている可能性を示唆している。雌雄での減数分裂関連遺伝子の ON/OFF のスイッチが、どこで制御されているのが今後の課題である。

③ 有性生殖における受精依存的な発生開始を制御する遺伝的機構の解明

本種で発見され、遺伝学的手法で関連遺伝子 (*parth*) を第2染色体に位置づけられている。単為生殖の機構は以下のモデルと考えられている (Matsuda and Tobari, 2007, 図4)

単為生殖の細胞学的観察

中心体マーカーとして Jordan Raff 博士より送って

ただいた Centrosomin (Cnn) の抗体に加え微小管マーカーとして *atubulin* 抗体を、DNA の有無には、picogreen を用い共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

コントロールとして、野生型の卵 (産卵後 1~2 時間) で DNA を染色した。図5で示したように、受精卵では、既に多くの核が染色され、未受精卵では、極体と思われるものが染色されていた。未受精卵の単為発生卵でも中心体が形成され、発生が進んでいる様子が分る (図6)。

また、核分裂に関与しない中心体もいくつか見られ、その分布は整然とはしていない。これらの観察から、本単為生殖系統の未受精卵の多くは、孵化前 (胚期) に致死となっていると考えられる。以上の観察結果から少なくとも以下の2点が推測される。

- (1) 単為発生卵では、前極側に中心体の新規合成が認められる。
- (2) 単為発生における2倍体化は、異常な分裂装置が形成されることにより、1つの半数体核が融合、または DNA 複製後に染色体が分離できず倍加した核が形成されることが考えられる。

現在は、この単為生殖に関与する遺伝子の探索を行っている。

謝辞

本研究は、平成24年度医学部共同研究プロジェクト研究 (研究代表者: 松田宗男) の助成金及び、文科省 NBRP (課題担当責任者: 松田宗男) からの系統の分譲を受け行った実験であり感謝する。Cnn 抗体を送って戴いた Jordan Raff 博士に感謝する。

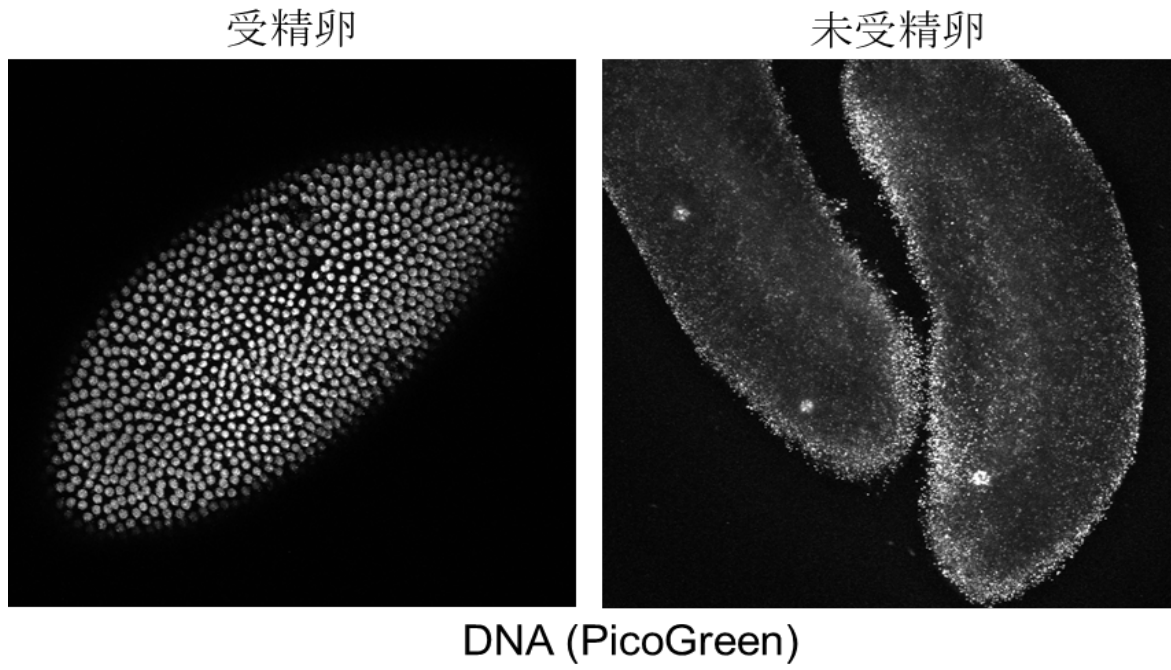


図 5 野生型雌の卵（産卵後 1-2 時間）の PicoGreen による染色（平井 他，日本遺伝学会，2012 より）

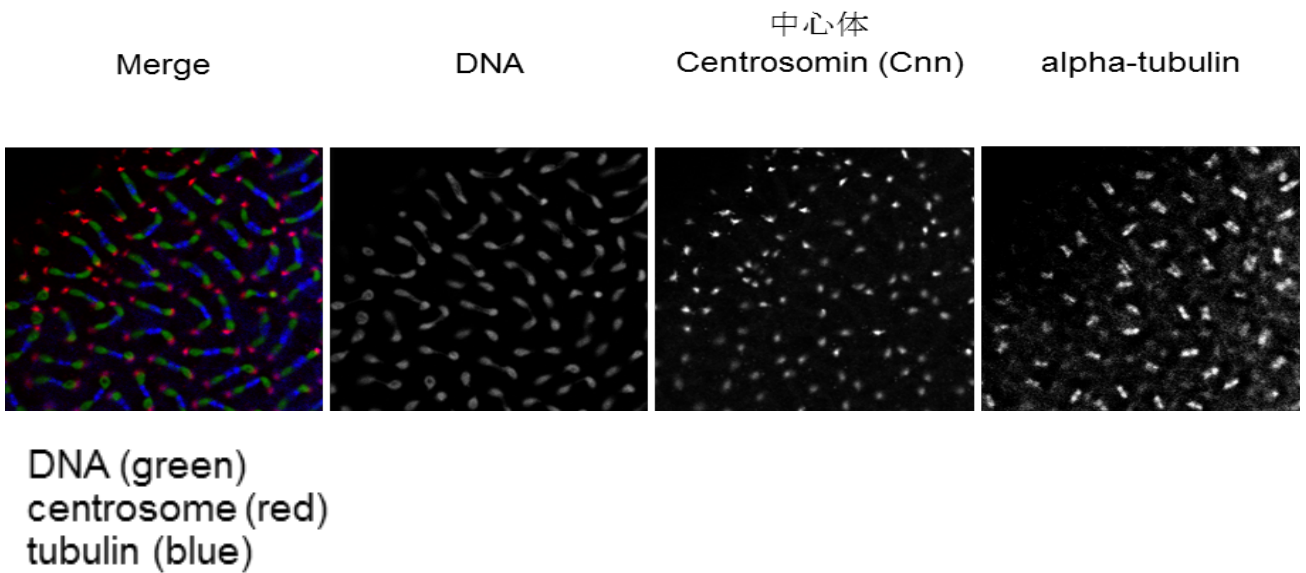


図 6 卵後 1 ～ 2 時間後の単為生殖卵（平井 他，日本遺伝学会，2012 より）

引用文献

1. *Drosophila* 12 Genomes Consortium (M. Matsuda & H. Sato are co-authors). 2007. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 450: 203-218.
2. Goni, B., Matsuda, M., & Tobar, Y. N., Chiasmata and chromosome breakages are related to crossing over in *Drosophila ananassae* males. *Genome* 49: 1374-1383. 2006.
3. Kohl, K.P. et. al., 2012. Evolution of an MCM complex in flies that promotes meiotic crossovers by blocking BLM helicase. *Science* 338: 1363-1365.
4. Matsuda, M., Sato, H., and Tobar, Y. N.: Crossing over in males. In "*Drosophila ananassae* -Genetical and Biological Aspects" (ed. by Tobar, Y. N.) Japan. Sci. Soc. Press and Karger, 1993. p 53-72.
5. Matsuda, M., and Tobar, Y. N.: A parthenogenetic strain of *Drosophila pallidosa*-like in the *Drosophila ananassae* complex. *Drosophila* Information Service 82: 49-50, 1999.
6. Matsuda, M., and Tobar, Y. N., Genetic analyses of several *Drosophila ananassae* complex species show a low frequency major gene for parthenogenesis that maps to chromosome 2. *Genetical Research* 83: 1-7, 2004.
7. Pandey, U. B. , and Nichols, C. D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological Reviews* 63: 411-436. 2011.
8. Sato, H., Goni, B., Matsuda, M., and Tobar, Y.N.: A site specific increase in recombination in *Drosophila ananassae*. *Genes & Genetic System* 75:41-47, 2000.
9. Sawamura, K., Tomimura, Y., Sato, H., Yamada, H, Matsuda, M., & Oguma, Y. Establishing interspecific mosaic genome lines between *Drosophila ananassae* and *Drosophila pallidosa* by means of parthenogenesis. *Genetical Research* 88: 1-11. 2006.
10. Schaffer, S.T., et al.(M. Matsuda & H. Sato are co-authors), 2008. Polytene chromosomal maps of 11 *Drosophila* species: The order of genomic scaffolds inferred from genetic and physical maps. *Genetics* 179: 1601-1655.

講演記録

- 1 平井和之¹, 宮東昭彦², 松田宗男¹ (¹杏林大. 医・生物, ²杏林大・医・解剖) アナナスショウジョウバエ単為発生系統における2倍体化機構の解析日本遺伝学会第84回大会, 2012年09月24日~2012年09月26日, 福岡市
- 2 Kazuyuki Hirai¹, Akihiko Kudo², and Muneo Matsuda¹(¹Kyorin,Biology,²Kyorin,Anatomy). Cellular basis of diploidization in *Drosophila ananassae* parthenogenesis. Cold Spring Harbor Laboratory meeting on Germ Cells2012年10月02日~2012年10月06日, Cold Spring Harbor, 米国
- 3 松田宗男¹, 佐藤玄¹, 平井和之¹, 宮東昭彦², 福富俊之³, 島幸夫⁴ (¹杏林大・医. 生物, ²杏林大・医. 解剖, ³杏林大・医・薬理, ⁴杏林大・保健・臨床検査教育), 遺伝子組換えに関与する遺伝子群の作用機構, 第41回杏林医学会総会, 2012年11月17日, 三鷹市
- 4 佐藤玄¹・島幸夫²・福富俊之³・松田宗男¹ (¹杏林大・医. 生物, ²杏林大・保健・臨床検査教育, ³杏林大・医・薬理): アナナスショウジョウバエ精巣におけるキイロショウジョウバエ雌組換えに関与する遺伝子の発現解析, 第35回日本分子生物学会年会, 平成24年12月11-14日, 福岡