

## 論文の内容の要旨

論文題目 組換えホットスポット活性化因子 Prdm9 の機能解析

( Functional analysis of recombination hotspot activator Prdm9 )

氏 名 河 野 宏 光

〔背景〕 酵母からヒトに至るまでの真核生物における染色体相同組換えは、組換えホットスポットと呼ばれる特定の領域で高頻度で生じる。哺乳類の組換えホットスポットの研究は、細胞表面抗原の遺伝子型判定で組換え比率を簡単に求めることができるマウスの主要組織適合抗原複合体 (MHC) 領域が早から着目され、この領域内にホットスポットが存在し、そこでの組換え頻度が交配に用いる系統で大きく変わることが知られていた。日本産野生マウス由来の R209-wm7 系統を含む交配では高頻度な組換えが観察され、MHC 領域の組換え型染色体を用いた遺伝解析から、ホットスポットに連鎖する組換え活性化因子の存在が予測された。しかし、その正体は長く不明であった。

酵母など多くの生物では、組換えホットスポット領域の周辺でトリメチル化されたヒストン H3 の 4 番目リジン (H3K4me3) などのヒストン修飾がなされる。近年、実験マウス系統である C57BL/6 系統と R209-wm7 系統を用いて、組換えホットスポットの位置を決める原因因子が探索され、減数分裂時に発現するヒストンメチル基転移酵素 Prdm9 が発見された。Prdm9 は、ジンクフィンガー (ZF) ドメインにより DNA を認識・結合し、ヒストンメチル化活性をもつ PR/SET ドメインにより周辺のヒストンを H3K4me3 修飾する。この修飾を目印に DNA 二重鎖切断酵素や修

復酵素を含むタンパク質複合体が形成され、部位特異的な相同組換えが起こるというモデルが現在提示されている。

*Prdm9* は、当初減数分裂進行に必須の転写因子 Meisetz として報告された。この遺伝子のノックアウト (KO) マウスは減数分裂が進行しない。また、多型の非同義置換/同義置換比 (Ka/Ks 比) が高く、MHC 関連遺伝子に次ぐ非常に進化の速い遺伝子である。そして特筆すべきことに、*Prdm9* はマウスの 2 亜種間の交雑を妨げる因子、すなわち哺乳類初の種分化遺伝子とする報告がなされている。

*Prdm9* の性質と機能は、CTCF に代表される他の ZF を有するタンパクと異なると考えられる。多くの ZF タンパクは、転写調節因子として結合配列の周辺遺伝子の発現を制御している。結合配列を認識する ZF はタンパク質の局在位置に決定的な影響を与えるため、同じ遺伝子であれば種間でも多型が許容されにくい。しかし、*Prdm9* は減数分裂の配偶子形成に必須の制御因子であるにもかかわらず、C57BL/6 系統と R209-wm7 系統間でも ZF に多型が存在し、Ka/Ks 比が高いと報告されている。本研究では、一見すると説明困難な性質をもつ *Prdm9* の詳細な機能を明らかにすることを目標とした。

〔結果と考察〕 遺伝子改変マウス作成による機能解析に先立ち、既に報告されている系統間多型の確認のため、野生マウス由来の近交系統を用いた *Prdm9* cDNA の配列解析を行った。その結果、使用した 8 系統間で ZF ドメインを構成する ZF ユニットのリピート数が 11-14 と異なること、予測されるタンパク質の配列が、ZF リピートの塩基認識部位とされる  $\alpha$ -ヘリックスの特定部位で非常に多型的であることが判明した。Ka/Ks 比は、ZF ドメイン以外が一般的な遺伝子と同等の 1 以下であるのに対し、ZF ドメインではリピート数が同一の系統間で比較した場合、1 を大きく超えた。これは ZF ドメインのみが何らかの選択圧により速いスピードで進化していることを意味する。そこで、このリピートを形成している ZF アレイ (ZFA) に着目し、自然集団で捕獲した野生マウスに解析対象を広げ、マウスにおける遺伝的多型の全容解明を目指した。

野生マウスであるハツカネズミ種 (*Mus musculus*) は、少なくとも 3 つの亜種に分類されており、*Prdm9* はそのうちドメスティカス亜種 (*M. m. domesticus*; DOM) とムスクルス亜種 (*M. m. musculus*; MUS) 間の雑種マウスが不妊になる原因遺伝子とされている。今回、DOM、MUS に加えキャストネウス亜種 (*M. m. castaneus*; CAS) と日本産モロシヌス亜種 (*M. m. molossinus*; MOL) 、さらに近縁種を網羅した 100 個体以上のゲノム DNA を用いて *Prdm9* ZFA の配列解析を行った。この結果、116 サンプルから 57 種類の *Prdm9* ZFA アレル配列が得られた。ZF のリピ

一ト数は 9-16 の範囲で異なり、cDNA 配列での解析結果と同様に、ZF の塩基認識部位には多くの多型が観察された。これは、タンパク質をコードする遺伝子としては、MHC のクラス I, II 遺伝子座に匹敵するレベルの顕著な多型と考えられる。

さらに、これらの ZFA 塩基配列データと、そこから予測されるタンパク質のアミノ酸配列から分子系統解析を行った。系統樹の作成は *Prdm9* ZFA とその近傍のイントロン、同一染色体上の *Tcp1* 遺伝子でそれぞれ行い、分類された ZFA のグループと亜種集団の対応を明らかにすると共に、解析した遺伝子領域の樹形を比較した。この結果、系統樹で分類された ZFA グループと亜種集団はおおむね一致した。特に、DOM と MUS の集団では特定の ZFA グループと対応していた。また、CAS の ZFA は 3 グループから構成され、より豊富な多型性を有していた。MOL 集団は、MUS と CAS に対応したグループの ZFA 2 種のみで構成されており、MOL は MUS と CAS の雑種に由来するとの従来の説に一致する。興味深いことに、ZFA グループの一部は全ての亜種の分布域にもみられ、異なった亜種集団間で *Prdm9* 型が共有されていることを示していた。この結果から、亜種間雑種の妊性が *Prdm9* ZFA の影響を受けるのは、一部の ZFA の組み合わせに限られることがわかった。また、分子系統樹の樹形の比較解析により、*Prdm9* ZFA は、他の *Prdm9* 遺伝子の領域とは異なる進化をしており、中間のイントロンは過去に組換えホットスポットであったことを示唆していた。

以上の比較ゲノム解析の結果は、過去に *Prdm9* が亜種間で種分化遺伝子として働いていなかったことを支持する。また、ヒト *PRDM9* の多型解析では、ヒトの起源域とされるアフリカ集団で多型が蓄積していることが明らかになっているが、マウスにおいても起源域とされる中東からアジアに分布する CAS 集団で豊富な多型が観察された。これは、マウス各亜種の進化の道筋を、進化速度の速い *Prdm9* ZFA が反映した結果と考えられる。

次に、これらの成果に基づいて、*Prdm9* の機能をさらに詳細に解析すべく、多型の集中する ZFA のみを系統間で交換可能とするノックイン(KI) マウスの作成、および *Prdm9* の既知の結合配列の一つである *Psmb9* ホットスポット配列を利用した組換え検出系マウスの作成を行った。

KI マウスは、遺伝子ターゲティングにより C57BL/6 系統の ZFA を、HA タグ付加した R209-wm7 系統に由来する ZFA で置換することで作成した。ZFA の前後に変異 lox 配列を付加しており、系統樹立後に CRE リコンビナーゼ作用下で、他の系統の任意の ZFA カセットと交換することが可能である。また、HA タグは既存の抗体での発現検出を可能にするほか、ZF ドメインと近接しているため、その機能に影響を与える可能性があった。まず、正しい遺伝子ターゲテ

イングを確認した ES 細胞から KI マウス系統を樹立した。この系統は、KI アレルのホモ接合同士の交配で、通常よりも初産日数が遅れる傾向がみられた。また、KI ホモ接合体より採取した精子を用いた人工授精でも受精率が低下し、分化中の精母細胞の観察でも異常な染色体対合が観察され、染色体の交叉型組換えマーカーの Mlh1 フォーサイが減少した。これらの結果から、ZFA への HA タグ付加が Prdm9 の機能障害をもたらし、既報の Prdm9 KO マウスのヘテロ接合体に類似した表現型が生じたと考えられる。Prdm9 の N-末端側に他のエピトープタグを付加した報告では、ZFA の結合活性に影響は出ていないため、C-末端側の近接した部分へのタグ付加が ZFA の機能を妨げ、結果的に組換え異常が引き起こされたと推測される。

一方、組換え検出系マウスは、Tol2 レトロトランスポゾンを利用し、*Psmb9* ホットスポット配列で分割したミトコンドリア局在緑色蛍光タンパク質 (mitoEYFP) 発現コンストラクトをゲノムにランダムに導入し作成した。トランスジェニックマウスのうち、特に蛍光の強い個体を選抜した結果、異なる染色体上に *mitoEYFP* が挿入された 3 系統が得られた。これらの系統由来のオスの精子での *mitoEYFP* の発現を確認し、CRE、あるいは FLP リコンビナーゼ発現系統との交配により、プロモーター領域、タンパク質コード領域のみを欠失した個体を各々作成した。さらに、一方に *Psmb9* ホットスポットに結合し活性化する R209-wm7 系統由来の *Prdm9* (*Prdm9*<sup>R209</sup>) 遺伝子を交配により導入した。最終的に *Prdm9*<sup>R209</sup> を保持し、欠失領域の異なる個体の交配で生まれた産仔では、中央の *Psmb9* ホットスポットが *Prdm9*<sup>R209</sup> により活性化し、オスの精子では組換えで生じた発現型コンストラクトより *mitoEYFP* が発現し、精子の蛍光観察のみで組換え比率が求められるはずである。以上の操作を 3 系統で並行して行った。しかし、予想に反して検出系マウスの精子は蛍光を発せず、その原因の探索と別手法による組換えの検出を同時に進めた。最初に、*mitoEYFP* の発現を確認したところ、予想外の領域から mRNA が転写されており、mRNA 間でトランススプライシングと考えられる現象が起きていた。また、用いたプロモーターが減数分裂後に活性が低下し、観察可能な量の蛍光分子が精子に蓄積しない可能性が考えられた。そこで、蛍光ではなく PCR 法で直接 *Psmb9* ホットスポットでの相同組換えを検出したところ、正しい部位で組換えが生じていることがわかった。*Prdm9*<sup>R209</sup> を持たないマウスでは組換えは検出されず、観察された組換えが *Prdm9* 依存であることが確認できた。この実験により、異所的に導入した組換えホットスポットも、結合する *Prdm9* ZFA 型が一致すれば活性化することが明らかになった。これはマウスにおける大半の組換えホットスポットの位置決定に、*Prdm9* が関与していることを示唆している。