

氏 名 竹本 一政

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2004 号

学位授与の日付 平成 30 年 3 月 23 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 The analysis of zebrafish meiotic mutant *ietsugu* which shows
critical decrease of *sycp2* expression

論文審査委員 主 査 教授 相賀 裕美子
教授 荒木 弘之
教授 鐘巻 将人
准教授 野々村 賢一
准教授 石黒 啓一郎 熊本大学 発生医学
研究所

論文の要旨

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

Meiosis is special cell division that halves chromosome numbers from diploid into haploid. To achieve this drastic change, meiocytes express various meiotic chromosomal proteins in addition to mitotic chromosomal proteins. By these meiotic chromosomal proteins, chromosomes in meiosis show meiosis-specific architectures, telomere bouquet on inner nuclear membrane (INM), chromosome axis between sister chromatids, and synaptonemal complexes (SCs) between homologous chromosomes. Although the meiotic chromosomal proteins are divergent between vertebrates and invertebrates, defects in these proteins result in disruption of meiotic chromosomal architecture and sterility. Additionally, chromosomal proteins among vertebrates are conserved. So, the study of meiotic chromosomal protein in vertebrate has clinical importance for human. However, despite many studies of meiotic chromosomal proteins, detail structural role of those proteins in meiotic chromosome architecture remain to be elucidated.

In this study, I analyzed a zebrafish meiotic mutant derived from N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) mutagenesis, which shows defects in meiotic chromosome architecture, *ietsugu* (*its*). Previous study in our laboratory identified that the mutation of *its* mutant is linked to a locus of chromosome 23 which contain meiotic chromosomal genes synaptonemal complex protein2 (*sycp2*) and *smc1al*, however, no mutation was found in those ORFs. Both Sycp2 and Smc1al are structural protein related to SCs. RT-qPCR of these genes revealed that the amount of *sycp2* transcripts in *its* mutant was 80 % lower than in WT sibling while that of *smc1al* was same as WT. Knockout (KO) of *sycp2* by TALEN resulted in sterility due to meiotic arrest at prophase I as same as *its* mutant. By the complementation test using *sycp2* KO and *its* mutant revealed that *sycp2* KO did not complement the sterility of *its* mutant. Furthermore, immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization (FISH) of telomeres revealed that synapsis from telomere bouquet by Sycp1 protein was completely disrupted in *sycp2* KO while it was maintained in *its* mutant. Sycp3 showed large aggregate in nucleus in both mutants. These indicate that the disruption of meiotic chromosomal architecture in *its* mutant is less severe than *sycp2* KO. cDNA cloning revealed that *its* mutant has normal and aberrant transcripts of *sycp2* mRNA that contain 5bp insertion containing termination codon. The ratio of normal *sycp2* mRNA was only 10% in the *sycp2* transcripts of *its* mutant while it was 100% in WT. Genomic sequencing revealed that intron 8 of *its* mutant contains T to A replacement that can work as aberrant 3'-splice site. This mutation cause mis-splicing in minigene containing genomic locus spanning exon8 to exon9 of *its* mutant even in WT background. Immunohistochemistry and western blotting analysis followed by immunoprecipitation of Sycp2 could not detect the Sycp2 protein in *its* mutant testes. These indicate that in *its* mutant, the amount of Sycp2 protein is extremely low. Thus, *its* mutant is hypomorphic mutant of *sycp2* caused by aberrant splicing in intron8. Additionally, analysis of localization of Sycp2 using WT by immunohistochemistry revealed that Sycp2 did not co-localize as aggregate with Sycp3 in preleptotene while these protein begin to co-localize from leptotene. These indicate that Sycp2 is required for re-localization of Sycp3 from aggregate to

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

SCs.

Synapsis from telomere bouquet in *its* mutant could be resulted from low amount of Sycp2 and self-assemble property of Sycp1 that can form SCs-like structure even in *sycp2* KO.

Therefore, I conclude that *its* mutant is hypomorphic mutant of *sycp2* that show maintenance of the association of the tips of SCs and telomeres. Also, using *its* mutant, I revealed that association of the tips of SCs with telomere on INM requires specific meiotic chromosomal protein Sycp2. This clearly indicates the new aspect of meiotic chromosome architecture in vertebrates and that is association of telomere and the tips of SCs is different phenomenon with attachment of telomeres on INM. This also indicates the new role of Sycp2, which was thought to be just a component of SCs, to associate the tips of SCs and telomeres.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

減数分裂は種を超えて保存された生殖細胞特異的な細胞分裂機構である。減数分裂特異的な遺伝子の解析は酵母やマウス等で多くの知見はあるが、未解明な部分は多く残されている。竹本さんは、ENU mutagenesis で単離されたゼブラフィッシュの減数分裂変異体 *ietsugu(its)* の原因遺伝子の同定を目指して研究を開始した。この *its* 変異体は、減数分裂初期のレプトテン期においてすでに異常を示し、それ以降の減数分裂の進行は観察されない。竹本さんは、先行研究によってマップされた部位にある *Sycp2* 及び *Smc1a1* の発現解析実験により、*its* 変異体で mRNA レベルが有意に減少している *Sycp2* を原因遺伝子の第 1 候補として、その可能性を検討した。まず TALEN を用いたゲノム編集により、*Sycp2* 変異体を作製し、その表現型が *its* 変異体同様に減数分裂異常による不妊であること、*its* と交配してその相補性試験を行った結果、ダブル変異体は同様に不妊の表現型を示したことから、*its* の原因遺伝子は *Sycp2* であると結論付けた。しかし、免疫染色による詳細な解析により、*its* 変異体では、*Sycp2* 変異体では全く観察されないテロメア部における *Sycp1* の局在さらにシナプトネマ構造の開始が観察された。この結果から *its* 変異体は *Sycp2* の機能低下変異体ではないかと考えた。さらに、*its* 変異体で転写される *Sycp2* から cDNA を調製し、その配列を解析した結果、*its* 変異体は 10% という低い割合であるが、正常な転写産物をもつこと、しかしながらほとんどの転写産物は、スプライシングの異常によりイントロン 8 の 3' 末端の 5 塩基を含むことを見出した。さらに、イントロン 8 の配列に、T から A への点変異があることにより異常なスプライスアクセプター配列が生じることを見出した。この転写産物は、5 塩基の追加部分に翻訳終始コドンが生じ、その結果、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構により、不安定化されることにより、*Sycp2* の著しい減少がおこると考えられた。さらに、この変異をもつトランスジーンを作成し、野生型のゼブラフィッシュに導入した結果、変異を持つトランスジーンで特異的に、スプライシング異常が誘導された。これらの結果から、竹本さんは、*its* 変異体は点変異によるスプライシング異常により *Sycp2* タンパク質の著しい低下を引き起こし、その結果、減数分裂の異常に至ると結論づけた。この研究は、スプライシングの異常と減数分裂の異常及び不妊を関連付けた点、また *its* 変異体においてテロメア結合領域から対合が進行する過程が捉えられ、マウスの先行研究で示されていた相同染色体対合の素過程についての定説とは異なる新しいデータも示すことができた点などゼブラフィッシュの順遺伝学の強みを活かした優れた内容を含む。竹本さんの研究成果は今後の減数分裂の研究のみならず、スプライシングを介する異常に起因する変異の解析のモデルとしても貢献すると評価され、学位取得の条件をみたすと、審査委員全員で判断した。