

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25112004

研究課題名(和文)生殖幹細胞の減数分裂移行を制御するゲノム-エピゲノムプログラム

研究課題名(英文)Meiosis priming in the germline stem cell cycle in mice

研究代表者

中馬 新一郎(CHUMA, SHINICHIRO)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：20378889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 62,300,000円

研究成果の概要(和文)：生殖系列サイクルにおける遺伝情報の維持と再編の制御転換に焦点を置き解析を進めた。その結果、(1) 遺伝情報の大規模な再編が行われる減数分裂期組換えについて、未分化な生殖幹細胞が減数分裂へ向けた分子プログラムを予め獲得した上で高い遺伝的安定性を維持しつつ体細胞型増殖を行う事、(2) 減数分裂期組換えに関わる遺伝子群と遺伝情報の安定性維持に関わる遺伝子群は生殖系列サイクルの発生段階に応じた特徴的な共発現クロストークを示す事、(3) 多能性幹細胞と生殖細胞のゲノム損傷応答の比較解析から、遺伝情報の安定性は生殖系列サイクルを通じて一定ではなく発生段階に応じた特徴的な調節を受ける事、を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The faithful transmission of genetic information is fundamental to germline stem cell cycles. One exception to this is meiosis when active recombination takes place. How such opposing control of genome stability is coordinated with developmental programs is not well understood. Previous studies have shown that retinoic acid plays a key role in meiosis initiation in mammals. However, retinoic acid is a pleiotropic factor, which for example promotes neurogenesis and not meiosis in pluripotent embryonic stem cells. By developing a culture condition to induce mitosis-to-meiosis transition from germline stem cells and by carrying out multiomics analyses, we found that germline stem cells are primed to enter into meiosis at transcriptional and epigenetic levels independently of retinoic acid. This “meiosis priming” program exhibits characteristic cross-talk regulation with genome stability genes during the developmental cycle of germline cells.

研究分野：発生生物学、遺伝学

キーワード：生殖 幹細胞 ゲノム エピゲノム 減数分裂 遺伝 発生

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞の遺伝情報は個体発生および種の維持の根幹であるため、体細胞と比べてより厳密な制御を受けるものと考えられる。しかし、(1) 生殖細胞の遺伝情報がどのように安定に継承されるのか、(2) 遺伝情報によって変異リスクの大きい減数分裂期のゲノムワイドな DNA 鎖切断と相同組換えはどのように統合して制御されるのか、のいずれも具体的な分子機序は良く分かっていない。哺乳類生殖細胞の減数分裂誘導は古典的にはレチノイン酸(RA)経路を介する事が明らかになっているが、RAはpleiotropicな効果を示し、例えば生殖細胞への分化能を持つ多能性幹(ES)細胞では神経分化を誘導し減数分裂は惹起されない。このため、生殖細胞の側に予め減数分裂を可能とする分子プログラムが存在していて、RAをトリガーとしてそのスイッチが入るものと考えられるが、詳細な分子メカニズムは殆ど明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

生殖細胞では遺伝情報を体細胞よりも厳密に継承する仕組みが働くものと考えられるが、減数分裂期には逆にゲノムDNAを積極的に組換えると共に、クロマチン構造の大規模な変換が起こる。生殖細胞がゲノム恒常性維持から減数分裂組換えへと遺伝情報の制御転換を行う分子プログラムの研究は進んでいない。研究代表者らはマウス生殖幹細胞株(GS細胞株、領域代表京都大学篠原隆司教授が樹立)が体細胞型増殖から第1減数分裂前期に*in vitro*で移行する培養条件を作出した。この生殖幹細胞株の第1減数分裂はほぼ同調して誘導されることから、分子生化学解析の有用な実験対象となる。本研究ではRNAseq、ChIP-seq、プロテオーム等を用いたdata driven型研究と、個別の遺伝子の機能スクリーニングを組み合わせて、生殖細胞の増殖分化転換、即ち遺伝情報の恒常性を維持する体細胞型増殖から第1減数分裂移行を規定する分子プログラムの理解を進めることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

生殖幹細胞から第一減数分裂の移行プロセスでは相同染色体対合やDNA組換え、また配偶子成熟へ向けたクロマチン構造の大規模な転換が行われると共に、次世代の個体発生のためのエピゲノム情報が継承される。研究代表者らは、マウス雄生殖幹細胞の樹立細胞株(GS細胞株)が体細胞型分裂から第1減数分裂前期へ移行する培養条件を作出した。これらGS細胞株およびES細胞株を用いた*in vitro*分化誘導システムおよび体細胞(繊維芽細胞)等を用いてRNA発現解析、ChIP-seq解析や相対定量プロテオーム解析による詳細なマルチオミクス解析を行う事で、生殖幹細胞の増殖分化転換、特にゲノム情報の維持と再編の切替に関わる分子基盤の全体像の把握と、個別の遺伝子機能の解明を目標として研究を進めた。

その結果、GS細胞は未分化生殖幹細胞として体細胞型増殖を行う過程で、減数分裂期の機能遺伝子群のサブセット(減数分裂期コヒーシンなど、class 1 meiosis genesと定義)をRA非依存的にRNAおよび蛋白質レベル共に高発現する事が明らかとなった。一方、減数分裂期の機能遺伝子群の別のサブセット(stra8、rec8など、class 2 meiosis genesと定義)は、GS細胞ではRNAおよび蛋白質発現が低レベルに抑制される一方、RA添加にตอบสนองして速やかに発現上昇が観察された。そこで、これら特徴的な遺伝子発現調節に関わるエピゲノム制御を明らかにする為、ヒストンH3K4me3、K9me3、K27me3、RNA pol IIなどのゲノムワイドなChIPseq解析を行った結果、未分化GS細胞および減数分裂誘導細胞のいずれも減数分裂期の機能遺伝子群class1、2プロモーターはbivalent修飾を持たず、H3K4me3+、H3K9me3-、K27me3-である事が明らかとなった。更にRARおよびアセチル化ヒストン等のChIPseq解析等により、未分化GS細胞においてRARはRA非存在下で減数分裂期の機能遺伝子群のサブセット(主にclass 2 meiosis genes)に予め結合しており抑制性の転写制御に関わる事、およびRA添加によりRNA発現上昇と相関してヒストンアセチ

ル化が明瞭に上昇する事を見出した。更に、これら生殖幹細胞が減数分裂開始へ向けて潜在的に保持する分子プログラムについて、生殖系列サイクルを通じた時系列データの再解析を行う事で、同分子プログラムの中核は多能性幹細胞に既に存在すると共に生殖細胞の分化過程で特異的かつ段階的に獲得される事、また RA-RAR 経路は ES 細胞および体細胞において減数分裂期の機能遺伝子群の抑制に関与する MAX および E2F6 等とクロストーク制御を示す事、およびゲノム安定性維持に関わる遺伝子群と減数分裂に関わる遺伝子群は明瞭な共発現制御を受ける事が明らかとなった。

上述の生殖系列サイクルを通じた遺伝情報の維持と再編に関わるマルチオミクス解析と機能遺伝子解析の他に、ゲノム組換え制御およびチェックポイント応答に関与する新規遺伝子のノックアウトマウス系統の作出と詳細な表現型解析を行った。

4. 研究成果

当初の目的に沿った以下の主要な成果が得られた。(1) 生殖系列サイクルにおいて、未分化型生殖幹細胞は減数分裂期組換えのための分子プログラムを予め獲得した上で、高い遺伝的安定性を示しつつ体細胞型増殖を行う事 (meiosis priming 提唱) (2) 減数分裂期組換えに関わる遺伝子群と遺伝情報の安定性維持に関わる遺伝子群 (*tudor*, *piwi* 等のトランスポゾン抑制遺伝子群を含む) は生殖系列サイクルの発生段階に応じた特徴的な共発現制御クロストークを示す事、(3) 新規アンチリコンビナーゼ遺伝子が内因性 DNA 複製ストレスを抑制することで細胞および個体の遺伝情報の安定性維持に働く事、を明らかにした。生殖系列サイクルを通じたマルチオミクス比較解析により、エピゲノム制御、転写制御、翻訳調節等のゲノムワイドなプロファイルデータを取得し、「遺伝情報の維持と再編」の機能調節が生殖系列サイクルのエピゲノムダイナミクスの中核の一つである事を示す事が出来た。

本研究によって、RA は生殖幹細胞の減数

分裂過程をゼロから開始する分子では無く、生殖幹細胞の側で減数分裂に移行するための分子プログラムを RA 非依存的・独立に予め発生プロセスを通じて獲得しており (meiosis priming) RA は減数分裂組換えの準備が既に整っている生殖幹細胞の減数分裂開始を誘導する「最後の一押し」の分子である事が明らかとなった。また、この meiosis priming は独立した遺伝子発現モジュールとして成立する訳ではなく、トランスポゾン抑制経路 (*tudor*, *piwi* 遺伝子群等) と明瞭な共発現制御の下にあり、また普遍的な DNA 損傷応答経路とも特徴的なクロストーク制御を受ける事が明らかとなった。これらの研究成果は、生殖系列サイクルの「遺伝情報の維持と再編」の分子基盤の理解を前進させると共に、将来的には細胞リソースや個体の遺伝情報の安定化や相同組換え効率を亢進する方法論の探索にも寄与する可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

1. Yoshimura, T., Watanabe, T., Kuramochi-Miyagawa, S., Takemoto, N., Shiromoto, Y., Kudo, A., Kanai-Azuma, M., Tashiro, F., Miyazaki, S., Katanaya, A., Chuma, S., *Miyazaki, J.I. (2018). Mouse GTSF1 is an essential factor for secondary piRNA biogenesis. EMBO Rep. 19 e42054.
2. Mochizuki, A.L., Katanaya, A., Hayashi, E., Hosokawa, M., Moribe, E., Motegi, A., Ishiai, M., Takata, M., Kondoh, G., Watanabe, H., Nakatsuji N, and *Chuma S. (2017). PARI Regulates Stalled Replication Fork Processing To Maintain Genome Stability upon Replication Stress in Mice. Mol Cell Biol. 37 e00117-17.
3. Kabayama, Y., Toh, H., Katanaya, A.,

- Sakurai, T., Chuma, S., Kuramochi-Miyagawa, S., Saga, Y., Nakano, T., and *Sasaki, H. (2017). Roles of MIWI, MILI and PLD6 in small RNA regulation in mouse growing oocytes. *Nucleic acids research* 45, 5387-5398.
4. Inoue, H., Ogonuki, N., Hirose, M., Hatanaka, Y., Matoba, S., Chuma, S., Kobayashi, K., Wakana, S., Noguchi, J., Inoue, K., et al. (2016). Mouse D1Pas1, a DEAD-box RNA helicase, is required for the completion of first meiotic prophase in male germ cells. *Biochemical and biophysical research communications* 478, 592-598.
5. Ichiyanagi, T., Ichiyanagi, K., Ogawa, A., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Chuma, S., Sasaki, H., and *Udono, H. (2014). HSP90alpha plays an important role in piRNA biogenesis and retrotransposon repression in mouse. *Nucleic acids research* 42, 11903-11911.
6. *Chuma, S. (2014). LINE-1 of evidence for fetal oocyte attrition by retrotransposon. *Developmental cell* 29, 501-502.
7. Shiromoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Daiba, A., Chuma, S., Katanaya, A., Katsumata, A., Nishimura, K., Ohtaka, M., Nakanishi, M., Nakamura, T., et al. (2013). GPAT2, a mitochondrial outer membrane protein, in piRNA biogenesis in germline stem cells. *RNA* 19, 803-810.
8. Pandey, R.R., Tokuzawa, Y., Yang, Z., Hayashi, E., Ichisaka, T., Kajita, S., Asano, Y., Kunieda, T., Sachidanandam, R., Chuma, S., et al. (2013). Tudor domain containing 12 (TDRD12) is essential for secondary PIWI interacting RNA biogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 16492-16497.
9. Lim, A.K., Lorthongpanich, C., Chew, T.G., Tan, C.W., Shue, Y.T., Balu, S., Gounko, N., Kuramochi-Miyagawa, S., Matzuk, M.M., Chuma, S., et al. (2013). The nuage mediates retrotransposon silencing in mouse primordial ovarian follicles. *Development* 140, 3819-3825.
- [学会発表](計24件)
- Ami Katanaya, Mihoko Hosokawa, Eri Hayashi, Ayako Mochizuki, Emiko Moribe, Shinichiro Chuma. A proteomic approach to developmental control of genome stability in pluripotent stem cells and differentiated cells in mice. *Frontier of Biomolecular Mass Spectrometry*. Kyoto. 2017.2.7
- 細川 美穂子、刀谷 在美、林 瑛理、望月 綾子、沼田 興治、阿部 訓也、末盛 博文、中辻 憲夫、中馬 新一郎. 生殖系列細胞の発生サイクルにおける減数分裂プログラムの獲得メカニズム. 日本遺伝学会第 89 回大会. 岡山. 2017.9.13
- 望月 綾子、刀谷 在美、林 瑛理、細川 美穂子、森部 江美子、茂木 章、石合 正道、高田 穰、近藤 玄、渡辺 仁美、中辻 憲夫、中馬 新一郎. PARI regulates stalled replication fork processing to maintain genome stability upon replication stress in mice. 日本遺伝学会第89回大会. 岡山. 2017.9.14
- Ami Katanaya, Mihoko Hosokawa, Ayako

Mochizuki, Eri Hayashi, Emiko Moribe, Norio Nakatsuji, Shinichiro Chuma. Developmental control of genome stability and diversification in the germline cell cycle in mice. 新学術領域「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」公開シンポジウム. 筑波. 2017.11.22

Mihoko Hosokawa, Ami Katanaya, Eri Hayashi, Ayako Mochizuki, Koji Numata, Kuniya Abe, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji and Shinichiro Chuma. Meiosis priming in the germline stem cell cycle in mice. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017). 神戸. 2017.12.7

Mihoko Hosokawa, Ami Katanaya, Eri Hayashi, Ayako Mochizuki, Koji Numata, Kuniya Abe, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji and Shinichiro Chuma. Meiosis priming and suppression in male germline stem cells in mice. 新学術領域 生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御 第4回公開シンポジウム. 三島. 2017.11.17

中川史之. ヒト多能性幹細胞のゲノム相同組換え効率の制御メカニズムの探索. 新学術領域 生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御 ステムセルエイジングから解明する疾患原理 合同若手勉強会. 別府. 2016.07.28

刀谷在美. 多能性幹細胞と体細胞のDNA損傷応答比較解析. 再生医科学研究所若手発表会. 京都. 2016.01.21

Mihoko Hosokawa, Ami Katanaya, Eri Hayashi, Ayako Mochizuki, Koji Numata, Kuniya Abe, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji and Shinichiro Chuma. Male germline stem cells are primed to meiosis through epigenetic and translational control in mice. International Symposium on Epigenome Dynamics and Regulation in

Germ Cells. Kyoto. 2016.02.18

Shinichiro Chuma. piRNA in germ cell development. "germline stem cell biology" Gordon Research Conference, Hong Kong, 2015.5.31-6.5

細川美穂子. 生殖幹細胞株の増殖分化転換におけるマルチオミクス解析. 新学術領域「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」若手勉強会, 修善寺, 2015.7.22-24

Mihoko Hosokawa, Ami Katanaya, Eri Hayashi, Ayako Mochizuki, Koji Numata, Kuniya Abe, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji and Shinichiro Chuma. Male germline stem cells are primed to meiosis through epigenetic and translational control in mice. "International Symposium on Epigenetic Dynamic and Regulation in Germ cells", Kyoto, 2016.2.17-19

Ami Katanaya, Mihoko Hosokawa, Eri Hayashi, Ayako Mochizuki, Emiko Moribe, Norio Nakatsuji and Shinichiro Chuma. Developmental control of genome stability in pluripotent stem cells and somatic cells. "International Symposium on Epigenetic Dynamic and Regulation in Germ cells", Kyoto, 2016.2.17-19

中馬新一郎 トランスポゾン制御破綻が引き起こす精子形成不全症 第61回日本実験動物学会シンポジウム 2014.5.15-17 札幌

中馬新一郎 マウス精子形成過程のトランスポゾン抑制とRNP制御 京都大学霊長類研究所研究会 2014.8.26-27 犬山

望月綾子 The role of N16 in the maintenance of genome stability and DNA

recombination in mice 新学術領域「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」若手勉強会 2014.7.16-18 筑波

中馬新一郎 相同組み換え制御及び複製ストレス応答に関するノックアウトマウス解析 新学術領域「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」第2回領域シンポジウム 2014.10.31-11.1 福岡

中馬新一郎 生殖幹細胞の増殖分化転換と核ダイナミクス連携 新学術領域「ゲノムアダプテーション」班会議 (2013.5.30、東京)

中馬新一郎 生殖幹細胞の減数分裂移行を制御するゲノム-エピゲノムプログラム 新学術領域「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」第一回班会議 (2013.11.15、京都)

望月綾子 The role of N16 in maintenance of DNA stability and recombination in mice 新学術領域研究「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」若手勉強会 (2013.11.14、大阪大学)

林瑛理 遺伝子ノックアウトによる哺乳類配偶子形成関連遺伝子の機能解析 新学術領域「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」第一回若手勉強会 (2013.11.14、大阪)

林瑛理 遺伝子ノックアウトによる哺乳類配偶子形成関連遺伝子の機能解析 平成25年度京都大学再生医科学研究所若手発表会 (2013.12.25、京都)

中馬新一郎 多能性幹細胞の大量/長期培養におけるゲノム情報の解析 NEDO公開シンポジウム「再生医療の産業化を支える技術開発」BioJapan2013 (2013.10.10、横浜)

Chuma, S. piRNAs in the testis: mammalian

tudor genes and germinal granules. International Congress of Andrology, Melbourne, Australia, Feb, 2013

〔図書〕(計1件)

中馬新一郎 減数分裂の発生制御とゲノム情報の継承. 実験医学, 32, 853-858 (2014).

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)
該当有りません

取得状況(計0件)
該当有りません

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中馬 新一郎 (CHUMA, Shinichiro)
京都大学・ウイルス再生医科学研究所・
准教授
研究者番号: 20378889

(2) 研究分担者
該当有りません

(3) 連携研究者
該当有りません

(4) 研究協力者
該当有りません