

令和 2 年 4 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03634

研究課題名(和文)体細胞分裂と減数分裂の違いを生み出す分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms that make differences between mitosis and meiosis

研究代表者

石黒 啓一郎(Ishiguro, Keiichiro)

熊本大学・発生医学研究所・准教授

研究者番号：30508114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では体細胞分裂から減数分裂への切替えに働く新規の因子を同定した。MEIOSIS initiator (MEIOSIN)と名付けたタンパク質は1Dだけを付されたゲノムに眠る未解析遺伝子Gm4969にコードされていたが、HMG-likeドメインをもつDNA結合因子と推測された。MEIOSINを欠損させると雄雌ともに精巣・卵巣の萎縮を伴って不妊となることが判明した。ChIP-seqやKOマウスを用いた解析により、MEIOSINは体細胞分裂型の細胞周期の抑制と減数分裂プログラムの活性化とを協調する役割があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回新たに発見したMEIOSINが、卵巣・精巣内で特殊な細胞分裂である減数分裂を開始させる働きをもつことを明らかにしました。また、MEIOSINは卵子・精子を形成するための数百種類の遺伝子に一齐にスイッチを入れる司令塔の役割を果たしていることを明らかにしました。MEIOSINは、減数分裂の発動に必須の働きをしており、卵子や精子の形成に関わる重要な遺伝子であることから、今後の不妊治療などの生殖医療の進展につながる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms regulating meiotic initiation in mammals are enigmatic. It is known that retinoic acid (RA) signaling plays a pivotal role during meiotic initiation. STRA8, which is expressed in response to RA, is thought to be a key factor promoting meiotic initiation. Here we identified MEIOSIN as a germ cell-specific factor that associates with STRA8. MEIOSIN, like STRA8, is expressed in response to RA and plays an essential role in meiotic initiation in both males and females. Functional analyses revealed that MEIOSIN acts as a transcription factor together with STRA8, and that both factors are critical for driving meiotic gene activation. Furthermore, temporally restricted expression of MEIOSIN leads to meiotic entry decision during spermatogenesis. The present study demonstrates that MEIOSIN, in collaboration with STRA8, plays a central role in regulating the mitosis to meiosis germ cell fate decision in mammals.

研究分野：発生生物学

キーワード：減数分裂 生殖細胞 精子 卵子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の場合、体細胞増殖を示す生殖細胞がレチノイン酸に反応して減数分裂に進行することが知られていた。しかしながら体細胞分裂から減数分裂への切替えが何によって制御されているのかという問題は、生物学の基本問題でありながら種を問わず長年の懸案とされていた。マウスではレチノイン酸に反応した生殖細胞において、減数分裂の開始のタイミングと符合して STRA8 タンパク質が一過的に発現誘導されることが知られている。ノックアウトマウスを用いた解析により、STRA8 が減数分裂の進行に必要であることが先行研究により示唆されていたが、その分子機構の解明は国際的にも攻め倦んでいた。

2. 研究の目的

本研究では、体細胞分裂と減数分裂のとの違いを本質的に決定付けるメカニズムの解明を目的とする。とりわけ、(1)体細胞増殖 減数第一分裂の遷移期に相当する生殖細胞から減数分裂誘導因子の同定、(2) 減数分裂における細胞周期の制御と染色体構造変換の連携、(3) 減数分裂仕様の染色体構築の機構、3つの角度から体細胞分裂と減数分裂の制御機構の違いを明らかにする。

3. 研究の方法

精原細胞や胎生期の始原生殖細胞集団のうち、Stra8 陽性細胞は体細胞型から減数分裂型細胞周期へと切り替わる遷移状態にあると推測されるが、ある一時におけるその存在割合は細胞集団のごく一部でその数も多くはない。そこで本研究では内在性の Stra8 遺伝子座に GFP レポーターと精製のタグ(3xFLAG-HA)を導入したノックインマウスを用いて、減数分裂にコミットした最も早い時期の Stra8 陽性細胞を FACS により効率良く集める手法を確立した。本研究では、Stra8 遺伝子の内在性発現パターンを維持できるように promoter 領域と 3'UTR 領域をインタクトに維持するように、stop コドンの直 3'下流に精製のタグ(3xFLAG-HA)+ GFP レポーターをノックインしたマウスを用いた。このノックインマウスの精巢から Stra8 を精製してこれに結合する因子をマスペクトルで同定した。またこのシステムを用いて、このノックインマウス成体 精母細胞から効率良く蛍光標識された細胞をソーティングすることにより、数的に少ない減数分裂にスイッチした時期の細胞だけをピンポイントで回収し RNA-seq 解析を実施した。新たに同定された MEIOSIN の結合部位を ChIP-seq により検討した。

4. 研究成果

本研究では体細胞分裂から減数分裂への切替えに働く新規の因子を同定した。ノックインマウス精巢より STRA8-3xFLAG-HA の精製を行い、質量分析法を駆使して STRA8 と相互作用する新規の核内因子を同定した。MEIOSIS initiator (MEIOSIN)と名付けたタンパク質は ID だけを付されたゲノムに眠る未解析遺伝子 *Gm4969* にコードされていたが、HMG-like ドメインをもつ DNA 結合因子と推測された。MEIOSIN は減数分裂にはいる前のステージで一過的に発現する

ことが判明した(図 1 A)。MEIOSIN を欠損させると雄雌ともに精巣・卵巣の萎縮を伴って不妊となることが判明した(図 1 C, D)。通常野生型の精母細胞では減数第一分裂前期では減数分裂組換え、相同染色体の対合による二価染色体の形成が見られる。これとは対照的に、*Meiosin* を欠損させた精巣では一見すると精母細胞まで分化した細胞は見られるものの、この細胞内では減数第一分裂に特徴的な染色体動態は全く見られなかった(図 1B)。この事実と符合して、MEIOSIN の標的遺伝子の多くは、*Meiosin* を欠損させた精母細胞で発現低下が見られた。興味深いことに *Meiosin* 欠損マウス成体の萎縮した卵巣からは僅かながらも見かけは卵子によく似た oocyte-like cell が採取される(図 1D)。野生型のマウス卵子がキアズマを持つ 20 対の二価染色体を示すのに対して、驚くべきことにこの oocyte-like 細胞は 40 本の姉妹染色分体を示すことが判明した。この事実は *Meiosin* 欠損マウスでは、減数分裂のプロセスを経由せずに生き延びた卵子前駆細胞が見かけ成熟卵子様の分化を遂げながらも体細胞と同じ染色体構成をもつことを示唆している。このことから、“減数分裂の細胞周期”が卵子の分化とは遺伝学的に分離されるプロセスであることが強く示唆された。

MEIOSIN タンパク質が HMG-like ドメインをもつことから、DNA 結合に関与することが推測された。そこで ChIP-seq 解析を用いて精母細胞における MEIOSIN のゲノム結合部位について検討した。その結果、MEIOSIN と STRA8 は減数分裂関連遺伝子のプロモーター近傍に結合することが判明した。したがって、MEIOSIN は減数分裂関連遺伝子を活性化する転写因子として働いていることが示唆された(図 2E)。この MEIOSIN の制御下に置かれている遺伝子群の中には、減数分裂を特徴付ける染色体関連の遺伝子以外に、cyclin A2 などの体細胞型転写産物を不安定化に導く mRNA 分解系の遺伝子なども含まれる。mRNA の 5'-CAP 構造を検出する CAGE-seq 解析から各転写産物の転写開始点を知ることができる。精母細胞における CAGE-seq データとの比較から、ChIP-seq 解析の結果をさらに精査したところ、MEIOSIN の結合部位は転写開始点あるいはそれよりやや転写方向の 3' 側とよく一致することが判明した。減数分裂関連遺伝子は減数分裂進行に先駆けて転写の pausing 状態にあることが知られている。減数分裂に先駆けて、MEIOSIN は転写がコンピテントな状況にある遺伝子の発現を短時間のうちに発火させる役割があることが推定された。以上のことから、MEIOSIN は体細胞分裂型の細胞周期の抑制と減数分裂プログラムの活性化とを協調する役割があることが示唆された。

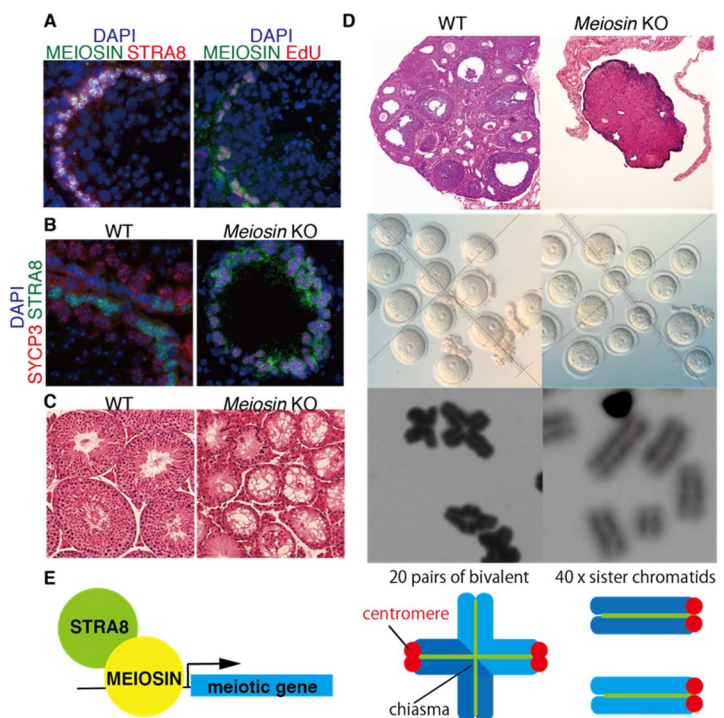


図 1 *Meiosin* 欠損マウスの表現型

(A) MEIOSIN と STRA8 は減数分裂前の前駆細胞で一過的に発現する。(B) *Meiosin* の欠損マウス精細管内では減数分裂への進行が見られない。(C) *Meiosin* の欠損マウスの精細管では精子が見られず空洞化している。(D) *Meiosin* の欠損マウスにおける卵巣の萎縮(上段)、*Meiosin* 欠損マウス卵巣から採取された oocyte-like cell (中段)、野生型の卵子はキアズマを持つ 20 対の二価染色体を示すのに対して、*Meiosin* 欠損 oocyte-like 細胞は 40 本の姉妹染色分体を示す(下段)。(E) MEIOSIN-STRA8 複合体は減数分裂関連遺伝子のプロモーターに結合して転写活性化因子として働く

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishiguro K.	4. 巻 24
2. 論文標題 The cohesin complex in mammalian meiosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 6-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12652.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hiratsuka K, Monkawa T, Akiyama T, Nakatake Y, Oda M, Goparaju SK, Kimura H, Chikazawa-Nohtomi N, Sato S, Ishiguro K., Yamaguchi S, Suzuki S, Morizane R, Ko BSH, Itoh H, Ko MSK	4. 巻 29
2. 論文標題 Induction of human pluripotent stem cells into kidney tissues by synthetic mRNAs encoding transcription factors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-37485-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ida H., Akiyama T., Ishiguro K., Goparaju SK., Nakatake Y., Chikazawa-Nohtomi N., Sato S., Kimura H., Yokoyama Y., Nagino M., Ko MSH., Ko SBH.	4. 巻 9, 277
2. 論文標題 Establishment of a rapid and footprint-free protocol for differentiation of human embryonic stem cells into pancreatic endocrine cells with synthetic mRNAs encoding transcription factors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Res Ther.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-018-1038-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ishiguro K* (Corresponding), Matsuura K, Tani N, Takeda N, Usuki S, Yamane M, Sugimoto M, Fujimura S, Hosokawa M, Chuma S, Ko S.H.M, Araki K, Niwa H	4. 巻 52(4)
2. 論文標題 MEIOSIN directs the switch from mitosis to meiosis in mammalian germ cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dev. Cell	6. 最初と最後の頁 429-445
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.devcel.2020.01.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 石黒 啓一郎
2. 発表標題 体細胞分裂から減数分裂への細胞周期の切替え機構
3. 学会等名 第36回染色体ワークショップ 第17回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石黒 啓一郎
2. 発表標題 マウスにおける減数分裂の開始機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 ワークショップ（横浜）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石黒 啓一郎
2. 発表標題 生殖細胞の減数分裂開始を決定する新規因子
3. 学会等名 ファイザー湯島性分化勉強会2018（東京）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石黒 啓一郎
2. 発表標題 A novel germ cell-specific factor, MEIOSIN, recruits STRA8 to direct initiation of meiosis in mammals
3. 学会等名 The 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石黒 啓一郎
2. 発表標題 A novel germ cell-specific factor, MEIOSIN, recruits STRA8 to direct initiation of meiosis in mammals
3. 学会等名 CSHL Meeting- Germ Cells (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石黒 啓一郎
2. 発表標題 マウスにおける減数分裂の開始機構
3. 学会等名 モロシヌス研究会2018 (札幌)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石黒 啓一郎
2. 発表標題 A novel transcription factor, MEIOSIN, recruits STRA8 to direct initiation of meiosis in mammals
3. 学会等名 Gordon Research conference MEIOSIS (NH, USA) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石黒 啓一郎
2. 発表標題 A novel STRA8 interacting factor, MEIOSIN1, directs initiation of meiosis in mammals
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of 51st JSDB and 70th JSCB (東京)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石黒 啓一郎
2. 発表標題 マウスにおける減数分裂の開始機構
3. 学会等名 第12回日本エピジェネティクス研究会 (札幌)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石黒 啓一郎
2. 発表標題 Identification of a novel nuclear factor for initiation of meiosis
3. 学会等名 8th International Symposium on the 2018Biology of Vertebrate Sex Determination (Hawaii, USA) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishiguro, K.
2. 発表標題 A novel nuclear factor plays a crucial role in initiation of meiosis.
3. 学会等名 CDB Symposium 2018 Dynamic Homeostasis: from Development to Aging (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石黒啓一郎
2. 発表標題 新規の減数分裂誘導因子の同定.
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会.、12月6日 9日、2017, 神戸
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石黒啓一郎
2. 発表標題 新規の減数分裂開始因子の同定
3. 学会等名 第35回染色体ワークショップ・第16回核ダイナミクス研究会合同開催、12月20日 22日、2017、蒲郡.
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ishiguro, K.
2. 発表標題 A novel germ cell-specific factor responsible for initiation of mammalian meiosis.
3. 学会等名 The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro, 26-28 July 2017, Fukuoka, Japan. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ishiguro, K.
2. 発表標題 REC8 and RAD21L plays distinct roles in chromosome dynamics in mouse meiosis I
3. 学会等名 SMC proteins Meeting, 13-16 June 2017, Yamagata, Japan. (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>熊本大学 発生医学研究所 染色体制御分野 http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/chromosome-biology/ 熊本大学発生医学研究所 染色体制御分野 http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/chromosome-biology/</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----