

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15801

研究課題名（和文）転写因子ZGLP1によるマウス始原生殖細胞の雌性運命決定機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of female germ cell fate determination by a transcription factor ZGLP1

研究代表者

長岡 創（Nagaoka, So）

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20870158

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：卵子は受精を経て、体を作る全ての細胞を生み出す力を持っており、生命を繋いできた世代継承の要である。本研究では、アクセスが困難な胎児期にて起こる生殖細胞形成プロセスを培養ディッシュ上で再現し、雌性性決定因子であるZGLP1の制御機構を明らかにすることを旨とした。胎児期から出生にかけての卵母細胞の詳細な遺伝子発現解析と遺伝子改変細胞を用いた機能検証から、ZGLP1により制御される遺伝子群は胎児期から成人期にかけて幅広く卵形成に関与し、減数分裂進行や細胞内恒常性維持などの制御を介して卵母細胞の生存を保證することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

女性の生涯における生殖能力は卵母細胞の「数」と「質」が胎児期に正しく作られることによって保證されるが、胎児期の卵母細胞形成を制御するプログラムの多くは不明瞭である。本研究により胎児期卵母細胞の生存を保證する転写プログラムの理解を向上することができ、女性の妊孕性を規定する卵巣予備能成立の根底プロセスの理解が進んだ。この成果は、不妊症の機序の理解に貢献し、また、将来的なヒト卵母細胞の試験管内誘導の創出にも寄与すると期待できる。

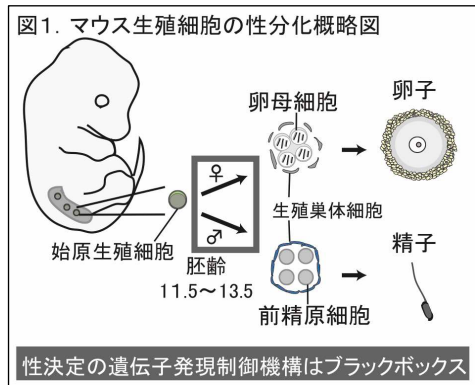
研究成果の概要（英文）：Oocytes possess the ability to create all cell types in the body and thus are the keystone for assuring species' continuation. In this research project, we aimed to elucidate the mechanisms by which ZGLP1, an evolutionarily conserved transcription factor, induces female sex differentiation in developing germ cells. With the use of in vitro germ cell derivation technology, we conducted detailed transcriptome analyses during fetal and neonatal oogenesis. We identified new factors that play pivotal roles in the assurance of oocyte survival through, for example, the regulations of meiotic progression and cellular homeostasis. Our findings advanced the understanding of how ovarian reserve is established and maintained. Additionally, our work provides clues on how to establish human in vitro gametogenesis in the future.

研究分野：発生生物学

キーワード：卵形成 不妊症 早発卵巣不全 減数分裂 始原生殖細胞 試験管内分化誘導 ZGLP1 配偶子形成

1. 研究開始当初の背景

卵母細胞は次世代個体を形成しうる能力を有する生命継承の担い手であり、始原生殖細胞を起源として胎生期に生殖巣体細胞からのシグナルによって運命決定される。近年、研究代表者を含む研究グループによって、卵巣体細胞からの BMP とレチノイン酸によって卵母細胞への分化が進行することが明らかになったが (Miyachi H, et al, *EMBO*, 2017)、これら二つのシグナルの下流で働く転写制御因子は見つかっておらず、卵母細胞誘導過程において液性シグナルと遺伝子発現制御の間はブラックボックスであった。代表者は BMP シグナルに応答して始原生殖細胞にて発現上昇のある転写因子 ZGLP1 に着目し、その分子作用を解き明かすことで、卵母細胞への運命決定の機序を理解できると着想し、本研究を計画した。



2. 研究の目的

本研究では、代表者が独自に開発した卵母細胞分化誘導遺伝子のスクリーニング系を用いて同定した転写因子 ZGLP1 の作用機序の検証及び ZGLP1 の下流遺伝子の機能検証を可能とする新たな *in vitro* 実験基盤を開発し、卵母細胞の運命決定機構 (雌性性決定機構) の理解を飛躍的に進展させることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では以下の項目を実施した。

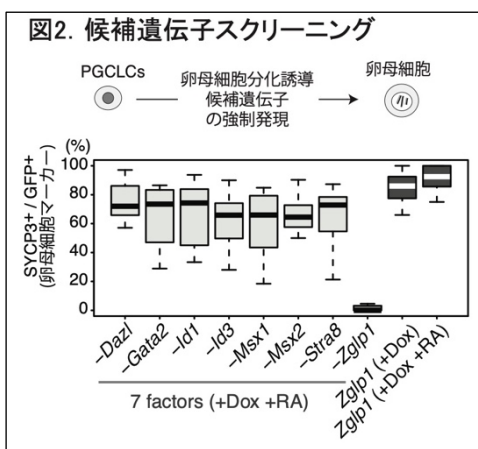
(1) 多能性幹細胞からの始原生殖細胞の試験管内誘導系を用いて BMP 下流因子 ZGLP1 を同定し、始原生殖細胞における ZGLP1 の強制発現、欠損、ChIP-seq を行い ZGLP1 により制御される下流遺伝子を同定した。また、ZGLP1 により制御される遺伝子の発現動態の胎児期卵母細胞から出生にかけての卵形成における発現を調べた。

(2) 新規同定遺伝子の欠損 ES 細胞を作成し、試験管内卵母細胞誘導法を用いて、卵形成における機能の検証を行なった。

4. 研究成果

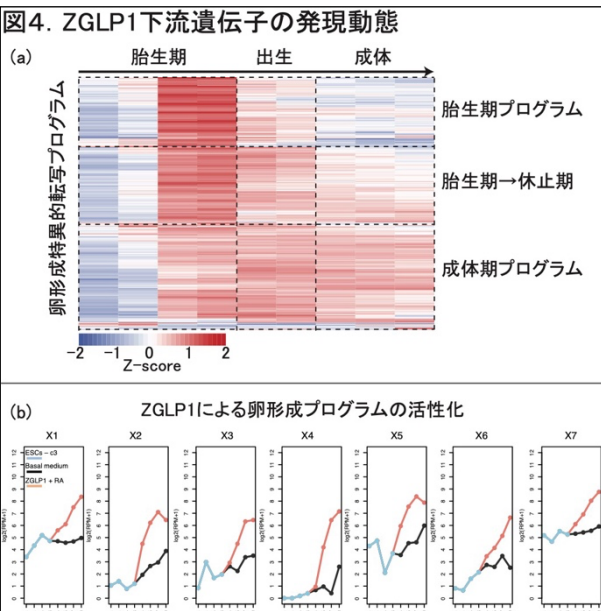
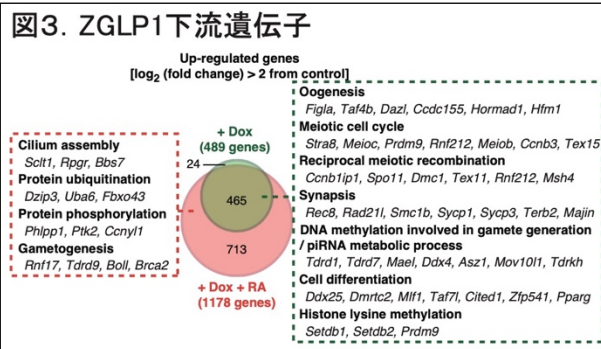
(1) 卵形成始動因子 ZGLP1 の同定と下流遺伝子の卵形成過程における発現動態

マウス PGCs は胎生 6 日～7 日頃にエピプラスト後方部に出現し、胎生 10 日頃に性腺原基へと移動する。胎生 11 日ごろから起こる生殖巣体細胞における性決定を経て、体細胞からのシグナルに反応して生殖細胞は性特異的な遺伝プログラムを開始する。すなわち、卵巣においては卵母細胞へと分化し、精巣においては精子幹細胞への分化プログラムを開始する。我々は卵母細胞への運命決定には卵巣体細胞から産生される骨形成タンパク質 (Bone Morphogenetic Proteins: BMPs) とレチノイン酸 (Retinoic Acid: RA) が協調して働くことにより起こることを明らかにした。そして、*in vitro* 生殖細胞誘導系を用いて BMP の下流因子の探索を行うべく、BMP2 添加 24 時間後にて発現上昇のある遺伝子群を RNA-seq を用いて同定した。転写因子に絞って検索し、生体胎仔マウス生殖細胞におけるトランスクリプトームデータも活用し、8 つの因子を雌性性決定候補遺伝子として選出した。8 つの候補遺伝子すべてを doxycycline 依存的に強制発現させられる ES 細胞株を作製し、



それらを PGC まで分化させた細胞において、候補遺伝子の強制発現を行った。すると、遺伝子の強制発現により卵母細胞へと分化誘導でき、分化誘導能を有する因子が含まれていることが明らかになった。次に、誘導に用いる遺伝子発現ベクターを一つずつ減らし各ベクターの卵母細胞誘導能への寄与を検証したところ、Zgfp1 発現ベクターを除いた時だけ誘導能がなくなり、そして Zgfp1 発現ベクター単独でも卵母細胞への分化誘導ができることが明らかになった。一方で、レチノイン酸の添加のみでは減数分裂を伴う卵母細胞への分化は起こらないが、レチノイン酸は ZGLP1 による分化誘導を促進させる効果をもち、レチノイン酸存在化では、90%以上の ZGLP1 発現細胞が卵母細胞へと分化することが明らかになった (図 2)。

ZGLP1 強制発現細胞および Zgfp1 欠損細胞の遺伝子発現解析から、ZGLP1 は減数分裂、RNA 制御、クロマチン・転写制御、トランスポゾン抑制、卵胞形成、という、卵形成プログラムの基盤を構成する遺伝子群を活性化させることが明らかになった。一方で、レチノイン酸は ZGLP1 による遺伝子発現の活性化を成熟させる作用、そして、多能性因子の発現抑制を含む PGC プログラムの抑制化に寄与することが明らかになった (図 3)。また、これらの ZGLP1 下流遺伝子の生体マウスにおける発現動態を検証したところ、(i) 胎生期の卵母細胞のみで一過的に発現のある因子群、(ii) 生後、成体においても発現が維持または発現が上昇される因子群の 2 群に大別することができた (図 4)。これらの結果は ZGLP1 による雌性性決定直後から、卵形成を構成する複数の機能モジュールが連動して活性化されていることを示唆している。



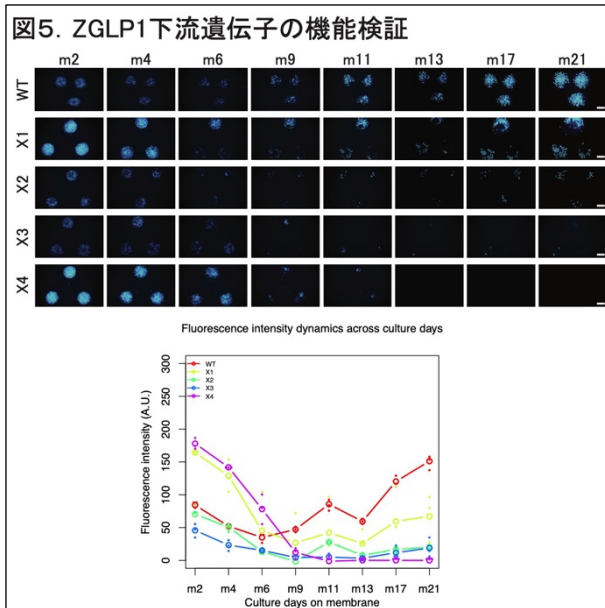
(2) In vitro 卵母細胞誘導系を用いた新規転写因子群の機能検証

新規に同定してきた遺伝子の機能を検証するために、卵巣体細胞との共培養系を用いた卵母細胞誘導系を用いてノックアウト ES 細胞由来生殖細胞の卵形成動態を解析した。まず、下流遺伝子の中から転写因子に注力し (図 2)、その中でも卵形成における機能が不明な 14 遺伝子に着目して、ノックアウト ES 細胞株を樹立した。着目した遺伝子の中には欠損マウスにおいては生殖系列以外の器官発生異常による胚性致死または生後致死をきたす遺伝子も含まれているが、それら遺伝子のノックアウト ES 細胞株は正常に樹立でき、PGC への誘導にも異常は観察されなかった。これは遺伝子欠損による胚性致死により表現型解析が難しかった遺伝子群の生殖系列における機能検証を行うために in vitro 誘導系が有用であることを示す結果である。PGC 形成以降の分化過程を卵母細胞試験管内誘導系にて解析したところ、表現型は大別して、(i) 性決定後の生殖細胞の早期喪失、(ii) 減数分裂進行の異常、(iii) 原始卵胞形成の阻害、(iv) 卵母細胞数の増加、という様々な異常を観察することができ、解析対象の遺伝子群には卵形成の様々な過程を制御する遺伝子が含まれていることが明らかになった。これは ZGLP1 による雌性性決定直後から卵形成を構成する複数の機能モジュール (減数分裂期相同組換え形成、細胞周期、品質管理チェックポイント、レトロトランスポゾン制御、卵胞形成・成長、母型エピゲノム構築) が連動して活性化されていることを示唆している。また、二次卵胞の形成までには顕著な表現型を示さない遺伝子もあり、in vitro 誘導系を用いた卵形成必須遺伝子のスクリーニングの有用性も確

認できた。

本研究では、多能性幹細胞を用いた卵母細胞の試験管内誘導系を用いて卵母細胞への運命決定を担う転写因子 ZGLP1 を同定した。また、その下流遺伝子は生殖細胞形成に関わる様々なプロセス（減数分裂期相同組換え、レトロトランスポゾン抑制、転写・クロマチン制御、RNA 構造制御、卵胞形成、DNA メチル化）に関与している可能性が明らかになった。ZGLP1 の下流遺伝子は（1）胎生期で一過的に発現のある遺伝子群と（2）生後にまで発現が維持または上昇する遺伝子群に大別することができた。卵母細胞への運命決定直後から、胎生期で行われる減数分裂期相同組換えに関わるプログラム以外にも生後の卵母細胞成長に関わるプログラムも活性化

されることは、核内・細胞質・細胞外で起こる各々の卵形成モジュールが連動して活性化され、一つの統一されたプログラムとして動いていると考えられる。同定してきた新規の遺伝子群の中から、卵形成初期に発現される転写因子に着目し、それらの遺伝子を欠損させ試験管内誘導系を用いて機能検証を行ったところ、(i) 性決定後の生殖細胞の早期喪失、(ii) 減数分裂進行の異常、(iii) 原始卵胞形成の阻害、(iv) 卵母細胞数の増加、などの様々な異常を誘発させることができた。これは、上述の「核内・細胞質・細胞外で起こる各々の卵形成モジュールが連動して活性化される」ことが正常な卵形成プロセスに非常に重要であることを示しており、ZGLP1 下流因子の統一的な制御が重要であることを示している。今後、遺伝子変異 ES 細胞を起点とした *in vitro* 卵母細胞誘導系を活用してゲノムワイドな遺伝子発現解析、また、ヒストン修飾の変遷を ChIP-seq により解析し、胎生期から構築される卵特異的な転写ネットワークの構築機序のさらなる解明を目指す。本研究にて着目した転写因子の中には、二次卵胞の形成までには顕著な表現型を示さない遺伝子もあるが、母型エピゲノムの構築など、卵形成自体には必須でなくとも次世代個体の正常な発生に必須のプロセスに関与している可能性もあるため、それら遺伝子群に関しては、母型インプリントの獲得、卵子成熟、胚盤胞発生、個体発生、胎盤形成、などに着目して今後は解析を進める。



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 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Taguchi Jumpei, Shibata Hirofumi, Kabata Mio, Kato Masaki, Fukuda Kei, Tanaka Akito, Ohta Sho, Ukai Tomoyo, Mitsunaga Kanae, Yamada Yosuke, Nagaoka So I, Yamazawa Sho, Ohnishi Kotaro, Woltjen Knut, Ushiku Tetsuo, Ozawa Manabu, Saitou Mitinori, Shinkai Yoichi, Yamamoto Takuya, Yamada Yasuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 DMRT1-mediated reprogramming drives development of cancer resembling human germ cell tumors with features of totipotency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-25249-4	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 該当する
1. 著者名 Nagaoka So I., Nakaki Fumio, Miyauchi Hidetaka, Nosaka Yoshiaki, Ohta Hiroshi, Yabuta Yukihiko, Kurimoto Kazuki, Hayashi Katsuhiko, Nakamura Tomonori, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 367
2. 論文標題 ZGLP1 is a determinant for the oogenic fate in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 1089-1089
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.aaw4115	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 該当する
1. 著者名 Nagaoka So I., Saitou Mitinori, Kurimoto Kazuki	4. 巻 18
2. 論文標題 Reconstituting oogenesis in vitro: recent progress and future prospects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research	6. 最初と最後の頁 145 - 151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.coemr.2021.03.022	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 該当する
1. 著者名 Severino Jacqueline, Bauer Moritz, Mattimoe Tom, Arecco Niccolo, Cozzuto Luca, Lorden Patricia, Hamada Norio, Nosaka Yoshiaki, Nagaoka So I, Audergon Pauline, Tarruell Antonio, Heyn Holger, Hayashi Katsuhiko, Saitou Mitinori, Payer Bernhard	4. 巻 41
2. 論文標題 Controlled X chromosome dynamics defines meiotic potential of female mouse <i>in vitro</i> germ cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 1-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2021109457	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長岡創
2. 発表標題 in vitro 卵母細胞誘導系を用いた減数分裂制御機構の解析
3. 学会等名 国立遺伝学研究所研究会「染色体安定維持研究会」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nagaoka So I.
2. 発表標題 Reconstitution of oogenic processes from pluripotent stem cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
研究協力者	羅 斯明 (Law Sze Ming)	奈良県立医科大学・医学部・教室職員 (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------