

令和 4 年 4 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21504

研究課題名（和文）生殖細胞関連遺伝子変異の探索と疾患モデル動物の作製

研究課題名（英文）Screening of germ cell related genes and generation of disease model animals

研究代表者

石黒 啓一郎（Ishiguro, Kei-ichiro）

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：30508114

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は原発性卵巣不全患者における減数分裂関連因子異常の探索と疾患モデルマウスでの検証を目的とする。本研究ではエキソーム解析による臨床研究から原因遺伝子の特定と疾患モデル動物の作製による検証によって、原発性卵巣不全疾患とMEIOSINの転写制御下に置かれる減数分裂関連遺伝子群との関連について検討した。その結果、タンパク質をコードする配列へのアミノ酸変異、(2)スプライシングに影響を与える配列に変異を示す例が見つかったが、いずれもヘテロ接合と予測された。MEIOSINの転写制御下に置かれる減数分裂関連遺伝子群について疾患モデル動物の作製と解析を行い、雄性不妊を示す遺伝子を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は疾患モデル動物を用いた研究により検証されたものですが、FBX047遺伝子はヒトにも存在することがわかりました。ヒトに見られる不妊症は原因が不明とされる症例が多く、今回の発見は、特に卵巣不全や無精子症や精子形成不全を示す不妊症の病態の解明に資するものと期待されます。また、MEIOSINの指令下で働くことが予想される他の機能未解明の遺伝子の働きについてはまだ十分に解明されていません。今後、卵子・精子の形成過程におけるこれら他の遺伝子の働きも同時に解明することで、生殖医療に大いに貢献できると期待されます。

研究成果の概要（英文）：In order to understand causal relationship between human infertility and meiosis, we have studied whole genome sequence of 11 Primary ovarian insufficiency (POI) patients by exome analysis. By comparing the genome sequence of POI and meiotic genes that we previously identified, we found heterozygous mutations in meiotic genes. This is yet to be evaluated by examining phenotypes in model animals that mimic the mutation. Further, we newly identified a gene that plays essential roles in meiosis. Disruption of FBX047 shows severe impact on homologous chromosome synapsis and meiotic recombination, leading to male infertility. Notably, in the absence of FBX047, although once homologous chromosomes are synapsed, the synaptonemal complex is precociously disassembled before completion of meiosis. Our study will shed light on the understanding of causal relationship between human infertility and meiosis.

研究分野：発生生物学

キーワード：減数分裂 不妊

1. 研究開始当初の背景

初経を迎えるべき年齢ですでに卵巣内の卵胞が枯渇し、卵巣性無月経を呈する場合がある。この病態は原発性卵巣不全 (primary ovarian insufficiency, POI) と呼ばれる。POI の原因としては X 染色体モノソミー (ターナー症候群) が以前から知られていたが、ターナー症候群に特徴的な表現型、染色体型を呈することなく POI のみを症状とする女性もまれではあるが認められ、その原因は不明であった。

一方で申請者は減数分裂の開始に決定的な役割を担う新規の生殖細胞特異的因子 MEIOSIS initiator (MEIOSIN) を同定した。Meiosin 遺伝子欠損マウスの成体卵巣の表現型は、ヒトの POI と酷似することから Meiosin 遺伝子それ自身或いは MEIOSIN によって制御される下流の遺伝子が原因となっている可能性が考えられた。とりわけ Meiosin 遺伝子欠損マウスの成体卵巣の表現型は、ヒトの POI と酷似することから、Meiosin 遺伝子それ自身或いは MEIOSIN によって制御される下流の遺伝子が原因となっている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究は原発性卵巣不全患者における減数分裂関連因子異常の探索と疾患モデルマウスでの検証を目的とする。本研究ではエキソーム解析による臨床研究から原因遺伝子の特定と疾患モデル動物の作製による検証によって、原発性卵巣不全疾患と MEIOSIN の転写制御下に置かれる減数分裂関連遺伝子群との関連について検討することを想定した。なお MEIOSIN は STRA8 と複合体を形成して減数第一分裂の進行に関連する多くの遺伝子のプロモーターに結合する転写因子として働くが、これによって直接制御される標的遺伝子には約 50 個の未解析の hypothetical gene (ゲノムデータベース上に ID のみが付与されている機能不明遺伝子) が含まれることが判明している。これらの未解析の遺伝子には、減数分裂の進行に必要とされる未知のものが含まれる可能性がある。また MEIOSIN の転写制御下に置かれている遺伝子であることからヒトの原発性卵巣不全の原因遺伝子として見つかる可能性が期待される。本研究によりヒト・マウスの卵子の減数分裂異常に関わるこれまでに報告のない原因遺伝子の同定が期待できる。さらにヒトの原発性卵巣不全の病態を解明するとともに、ヒト卵子の減数分裂機構について新たな知見を加え、体外受精・胚移植における妊娠率の改善に寄与する可能性が期待できる。

3. 研究の方法

(1) POI 患者末梢血 DNA の全ゲノムのエキソーム解析

本研究ではヒト原発性卵巣不全患者における減数分裂関連因子異常の探索と疾患モデルマウスでの検証を目的として研究を行った。初経を迎えるべき年齢ですでに卵巣内の卵胞が枯渇し、卵巣性無月経を呈する POI 症状に適合した患者の末梢血 DNA の全ゲノムのエキソーム解析を 11 例実施した。POI 患者試料は熊本大学附属病院産科婦人科外来で採取し、試料の解析は申請者の熊本大学発生医学研究所で実施された。得られた DNA 配列情報は、ヒトゲノム配列データベースとの比較により、既知の減数分裂関連遺伝子と MEIOSIN の転写制御下にある約 300 の遺伝子群に絞って照合を行い、(1) タンパク質をコードする配列に変異が見られないか、(2) スプライシングに影響を与える配列に変異が見られないか、(3) 遺伝子発現に影響を与えるプロモーター周辺に変異がないか、について検討した。

(2) 疾患モデル動物の作製と表現型解析

個人ごとの SNP による違いと真の変異とを区別する必要があるため、患者側に変異の候補が同定された場合にはマウスゲノムの対応箇所に Crispr-Cas9 ゲノム編集法により同等の変異を導入して、疾患モデルマウス変異体の卵巣における表現型を解析する。MEIOSIN の転写制御下に置かれる減数分裂関連遺伝子群についても疾患モデル動物の作製を行った。受精卵へのゲノム編集法による疾患モデル動物の作製は熊本大学生命

資源センターの荒木喜美との協業で行った。

4. 研究成果

POI 患者末梢血 DNA の全ゲノムのエキソーム解析

11 例の POI 症状に適合した患者の末梢血 DNA の全ゲノムのエキソーム解析を実施した。得られた DNA 配列情報は、ヒトゲノム配列データベースとの比較により、既知の減数分裂関連遺伝子と MEIOSIN の転写制御下にある約 300 の遺伝子群に絞って照合を行った。その結果、タンパク質をコードする配列へのアミノ酸変異、(2)スプライシングに影響を与える配列に変異を示す例が見つかったが、いずれもヘテロ接合と予測された。なお 1 例の POI 患者において、Meiosin 遺伝子に既知の SNP とは異なる変異(Lys103 Gly)を homozygous に持つものが見つかった。MEIOSIN と STRA8 は HLH ドメインを介してヘテロダイマーを形成することが判明しているが、Lys103 残基は MEIOSIN タンパク質 HLH ドメインの STRA8 との相互作用の界面に位置することが立体構造モデリングにより予想されるが、ヘテロ接合であるためこれが症状に決定的な要因を与えている可能性は低いと考えられた。

疾患モデル動物の作製と表現型解析

STAR8 タンパク質中の LxCxE 配列に変異を導入した変異型 *Stra8* 発現マウスを作製して、STAR8 と Rb との相互作用を遮断した生殖細胞の減数分裂の開始時期における scRNA-seq で STAR8 発現細胞の遺伝子発現パターンについて詳細な検討を行った。その結果、LxCxE 変異型 *Stra8* 発現マウスの生殖細胞では、減数分裂関連遺伝子の発現の低下が見られることや、STAR8-null 生殖細胞では多能性状態から脱出できずに分化が阻害されていることが判明した。

また MEIOSIN の転写制御下に置かれる減数分裂関連遺伝子群についても疾患モデル動物の作製を行った。10 遺伝子について疾患モデル動物の作製を行った。そのうち FBX047 遺伝子は遺伝子発現の定量解析や発現パターンの解析により、精巣内の精母細胞において特異的に発現していることや減数第一分裂の初期のステージで働いていることを突き止めた。さらに質量分析法を駆使した解析により、FBX047 は精母細胞において微量かつ一過的に発現して機能を発揮していることが判明した。そこで、ゲノム編集によりオスのマウスの FBX047 遺伝子の働きをなくした疾患モデル動物を作製して検討を行ったところ、精母細胞における減数分裂の過程で、いったんは見かけ上相同染色体の対合が起きるものの、その対合状態が安定に維持できなくなることが判明しました。その結果、FBX047 遺伝子を欠損した精母細胞は減数分裂組換えがうまく起こらなくなるため、減数分裂のプロセスを完了できずにやがて死滅してしまうことや、精子形成ができなくなり不妊となることが判明した(図)。したがって、減数分裂の過程で FBX047 は「相同染色体の対合」状態を安定に維持するメカニズムに必須の役割を果たしていることがわかった。なお、FBX047 の働きをなくした卵巣では特に影響は出ないことがわかった。

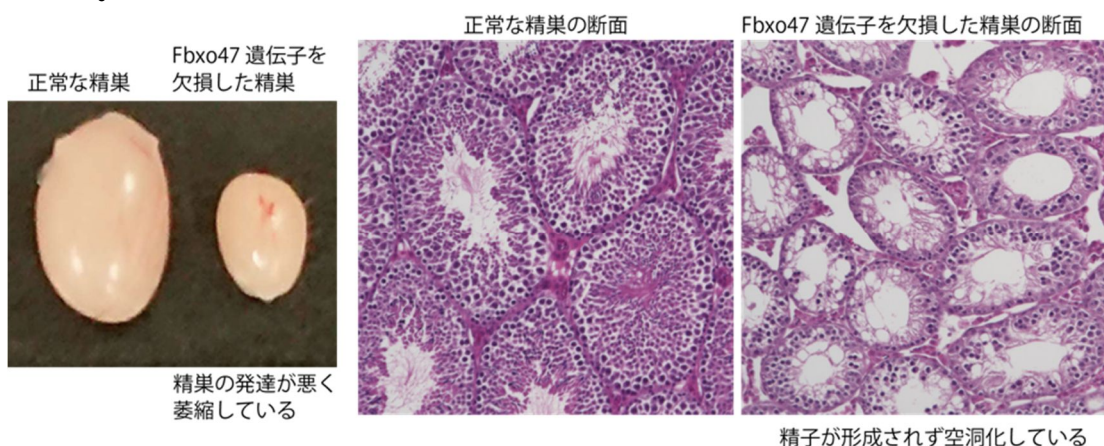


図 FBX047 遺伝子欠損マウスの解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Fujiwara Yasuhiro, Horisawa-Takada Yuki, Inoue Erina, Tani Naoki, Shibuya Hiroki, Fujimura Sayoko, Kariyazono Ryo, Sakata Toyonori, Ohta Kunihiro, Araki Kimi, Okada Yuki, Ishiguro Kei-ichiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Meiotic cohesins mediate initial loading of HORMAD1 to the chromosomes and coordinate SC formation during meiotic prophase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1009048	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 Tanno Nobuhiro, Kuninaka Shinji, Fujimura Sayoko, Takemoto Kazumasa, Okamura Kaho, Takeda Naoki, Araki Kimi, Araki Masatake, Saya Hideyuki, Ishiguro Kei-ichiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Phosphorylation of the Anaphase Promoting Complex activator FZR1/CDH1 is required for Meiosis II entry in mouse male germ cell	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10094
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-67116-0	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 Tanno N, Takemoto K, Takada-Horisawa Y, Shimada R., Fujimura S, Tani N., Takeda N., Araki K, Ishiguro K	4. 巻 25
2. 論文標題 FBX047 is essential for preventing the synaptonemal complex from premature disassembly in mouse male meiosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104008	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.	4. 巻 -
2. 論文標題 Sexually dimorphic properties in meiotic chromosome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sexual Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000520682	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, Shimada R.	4. 巻 96
2. 論文標題 MEIOSIN directs initiation of meiosis and subsequent meiotic prophase programs during spermatogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes and Genetic Systems	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) 10.1266/ggs.21-00054	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 Horisawa-Takada Y, Kodera C, Takemoto K, Sakashita A, Horisawa K, Maeda R, Shimada R, Usuki S, Fujimura S, Tani N, Matsuura K, Akiyama T, Suzuki A, Niwa H, Tachibana M, Ohba T, Katabuchi H, Namekawa S, Araki K, Ishiguro K.	4. 巻 12
2. 論文標題 eiosis-specific ZFP541 repressor complex promotes developmental progression of meiotic prophase towards completion during mouse spermatogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23378-4	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 -

1. 著者名 Oura S, Koyano T, Kodera C, Takada Y, Matsuyama M, Ishiguro K, Ikawa M.	4. 巻 17
2. 論文標題 KCTD19 and its associated protein ZFP541 are independently essential for meiosis in male mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1009412	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 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 高田幸, 小寺千聡, 竹本一政, 坂下陽彦, 前田亮, 島田龍輝, 立花 誠, 行川 賢, 荒木喜美, 石黒啓一郎
2. 発表標題 生殖細胞特異的ZFP541複合体は減数分裂前期脱出の転写制御に働く
3. 学会等名 日本エビジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石黒啓一郎
2. 発表標題 生殖細胞における体細胞分裂から減数分裂への切り替え機構と性差
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田龍輝, 石黒 啓一郎
2. 発表標題 胎児期メス生殖細胞における減数分裂開始と細胞周期G1/S期の同調のメカニズム
3. 学会等名 第 38 回 染色体ワークショップ 第 19 回 核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石黒 啓一郎
2. 発表標題 減数分裂開始に必須の役割を果たすMEIOSINおよび STRA8のタンパク質ドメイン
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石黒 啓一郎
2. 発表標題 MEIOSINによる減数分裂のコントロール
3. 学会等名 第65回日本生殖医学会学術講演会・総会 教育講演（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kei-ichiro Ishiguro
2. 発表標題 SWITCHING FROM MITOSIS TO MEIOSIS IS REGULATED BY SEXUALLY DIFFERENT MECHANISM IN MAMMALIAN GERM CELLS
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting 2020 GERM CELLS (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kei-ichiro Ishiguro
2. 発表標題 MEIOSIN directs the switch from mitosis to meiosis in mammalian germ cells
3. 学会等名 53rd Annual Meeting of JSDB (Online meeting) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小寺千聡, 高田幸, 大場隆, 石黒啓一郎, 片瀨秀隆
2. 発表標題 減数分裂を制御する新規因子KCTD19を欠損した雄マウスは無精子症を呈し不妊となる
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石黒啓一郎
2. 発表標題 体細胞分裂型から減数分裂型の細胞周期への切り替え機構
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム令和3年度成果発表会 (大津)(招待講演) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kei-ichiro Ishiguro
2. 発表標題 Sexually different mechanisms of meiotic cell cycle in mammalian germ cells
3. 学会等名 44th Annual meeting of Molecular Biology Society of Japan, Symposium (Yokohama) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryuki Shimada, Kei-ichiro Ishiguro
2. 発表標題 STRA8 plays multiple roles in gonadal development and meiotic cell cycle in mouse female germ cells
3. 学会等名 International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石黒啓一郎
2. 発表標題 減数分裂開始の性差
3. 学会等名 第93回日本遺伝学会大会 ワークショップ「非ゲノム情報複製機構による生命現象の制御」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石黒啓一郎
2. 発表標題 減数分裂の開始機構
3. 学会等名 第39回日本受精着床学会 シンポジウム「遺伝」(神戸) (招待講演)
4. 発表年 2021年

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り替え
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nobuhiro Tanno, Kazumasa Takemoto, Sayoko Fujimura, Kimi Araki, Kei-ichiro Ishiguro
2. 発表標題 Fbxo47 is essential for stability of the synaptonemal complex in male meiosis
3. 学会等名 第54回 日本発生生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryuki Shimada, Kei-ichiro Ishiguro
2. 発表標題 The coordination of meiotic gene activation and pre-meiotic S phase entry ensure the reproductive life span in murine female
3. 学会等名 第54回 日本発生生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丹野 修宏, 竹本 一政, 高田 幸, 島田 龍輝, 藤村 幸代子, 谷 直紀, 竹田 直樹, 荒木 喜美, 石黒 啓一郎
2. 発表標題 FBX047はマウス雄性減数分裂においてシナプトネマ複合体の安定化に働く
3. 学会等名 第39回 染色体ワークショップ・第19回 核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計12件

1. 著者名 石黒啓一郎 (分担) 先端モデル動物支援プラットフォーム (AdAMS)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 320
3. 書名 マウス・ラットモデル作製・解析プロフェッショナル モデル動物の作製-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	

1. 著者名 石黒啓一郎	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 94
3. 書名 BIO Clinica 2021年 2月号 不妊診療UPDATE 減数分裂開始因子MEIOSINとその標的遺伝子の変異による不妊	

1. 著者名 石黒啓一郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版社	5. 総ページ数 2
3. 書名 週刊医学のあゆみ 275(7)	

1. 著者名 石黒啓一郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 7
3. 書名 「細胞」8月号 特集「非ゲノム情報の複製機構 体細胞分裂から減数分裂へのスイッチ機構	

1. 著者名 石黒啓一郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 7
3. 書名 「細胞」5月増刊号 体細胞分裂と減数分裂における染色体・クロマチン構造の違い	

1. 著者名 石黒 啓一郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 5
3. 書名 実験医学4月号 カレントトピックス 生殖細胞の運命決定 体細胞分裂から減数分裂への細胞周期の切替え	

1. 著者名 石黒啓一郎 - 分担執筆	4. 発行年 2022年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 -
3. 書名 遺伝学の百科事典 継承と多様性の源	

1. 著者名 石黒啓一郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 -
3. 書名 Hormone Frontier in Gynecology 2022年3月号 (Vol.29 No.1) 【特集 受精と胚発生をめぐる話題】	

1. 著者名 石黒啓一郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日本受精着床学会	5. 総ページ数 -
3. 書名 日本受精着床学会誌	

1. 著者名 石黒啓一郎	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 -
3. 書名 Precision Medicine7月臨時増刊号 シングルセル解析の新たな可能性	

1. 著者名 石黒啓一郎	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 -
3. 書名 BIO Clinica 5月号 疾患ゲノム研究の最前線	

1. 著者名 石黒啓一郎- 分担執筆	4. 発行年 2021年
2. 出版社 一色出版	5. 総ページ数 -
3. 書名 ヒトゲノム事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap
<https://researchmap.jp/read0123107>
熊本大学発牛医学研究所
http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/chromosome-biology/ronbun/

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------