

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19315

研究課題名（和文）メス生殖細胞に特異的な減数分裂制御機構の解明

研究課題名（英文）Study on the female specific regulation of meiosis

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）：本研究では、scrRNA-seq解析を用いて減数分裂開始時のメス卵母細胞における遺伝子発現について検討を行った。RBとの相互作用が失われる変異型Stra8遺伝子マウスを作製した。変異型Stra8発現マウスは、RBとの相互作用が失われて、減数分裂への進行に遅延が見られた。さらに変異型Stra8マウスの卵巣では、出生後すぐに原始卵胞の数が早期に減少していることから、卵子がドーマント状態を保てずに出生頃に排除されることが判明した。したがって、STAR8とRBとの相互作用がメス特異的な減数分裂開始に働くこと、さらに減数分裂の開始時に遅延が生じると後の卵子の発生にも影響が及ぼされることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトに見られる不妊症は原因が不明とされる症例が多いことが知られている。女性の場合、妊娠中の母親の母体内で胎児の時期に、減数分裂が開始された生殖細胞の数によって、将来大人になったときの卵子の貯蔵数が決定される。すなわち、女性は生まれる前には、減数分裂が開始されて生涯にわたる卵子が準備されていることになる。本研究は、原発性卵巣不全や早発性閉経など卵子の形成不全や早期枯渇を示す不妊症の病態の解明に資することが期待される。また妊娠中に癌抑制タンパク質RBに影響を与える可能性のある投薬や、創薬での指針となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined gene expression in female oocytes at the onset of meiosis using scrRNA-seq analysis. Mutant Stra8 mice, in which Stra8-RB interaction is lost, were generated. Mutant Stra8-expressing mice showed a delay in progression to meiosis due to loss of interaction with RBs. Furthermore, the ovaries of mutant Stra8 mice showed an early reduction in the number of primordial follicles immediately after birth, indicating that the oocytes were unable to maintain the dormant state and were eliminated around birth. Thus, it is suggested that the interaction between STAR8 and RB acts in female-specific meiosis initiation, and that the delay at the onset of meiosis also affects later oocyte development.

研究分野：発生生物学

キーワード：減数分裂 卵子 不妊

1. 研究開始当初の背景

減数分裂の制御には雌雄性差がある。マウスの場合、オス精巣では生涯にわたって減数分裂が継続されるが、メスの減数分裂は胎児期に性決定による生殖腺の分化を経た後 E13.5-E14.5 のごく狭いタイムスパンの一時期に開始され、思春期を迎えるまでいったん長期の休眠状態に入る。ヒトの場合は40年以上にもわたって休眠状態が持続され、排卵と同時に第一分裂が再開される。この卵子の減数第一分裂の途中での長期休眠状態は、細胞周期の G2 期アレストと考えることが出来る。これによりメス生殖細胞は胎児期のごくわずかな時期に減数分裂に進行したプールによって、生殖可能なライフスパンを支える卵子数が決定されるが、meiotic G2 期アレストをトリガーするメカニズムは全くわかっていなかった。

当グループ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 (Ishiguro et al Dev Cell 2020)。MEIOSIN は STRA8 と複合体を形成して減数分裂の進行に関連する遺伝子の転写開始点に結合して発現を制御する減数分裂開始のマスター因子として働くことがわかっている。さらに、STRA8 の結合因子の探索から、レチノブラストーマ RB が STRA8 と結合することを見出した。RB は LxCxE アミノ酸配列を持つタンパク質に結合することが知られており、実際 STRA8 も LxCxE motif を持つ。本研究では、減数分裂開始の制御において MEIOSIN-STR A8 複合体や STRA8-RB 複合体が雌雄性差にどのように関与するかを決着をつけることが課題であった。

2. 研究の目的

本研究では卵子の長期休眠に関わる未知の因子の同定により、女性・メスの生殖可能ライフスパンを支えるメカニズムの理解を目的とする。とりわけ、STRA8-RB 相互作用が減数分裂開始の制御においてどのように働くかを明らかにすること、減数第一分裂前期のトランスクリプトームにおける雌雄性差を明らかにすること、卵子の休眠のための遺伝子発現プログラムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) STRA8 変異体 (STRA8^{ΔLxCxE}) マウスの表現型解析

LxCxE motif に変異を導入して、MEIOSIN との結合はインタクトであるが RB には結合できない STRA8 変異体 (STRA8^{ΔLxCxE}) マウスを作製した。E14.5, E15.5, E18.5, P2 における卵巣切片、成体精巣切片の組織学的解析を行った。さらに、卵子の染色体解析を行った、異数性が見られないかについて検討した。

(2) STRA8 変異体 (STRA8^{ΔLxCxE}) 卵母細胞のトランスクリプトーム解析

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 E14.5 における STAR8 発現細胞の遺伝子発現パターンについて、scRNA-seq を用いて詳細な検討を行った。さらに、E15.5, E18.5 における STRA8^{ΔLxCxE} 卵母細胞遺伝子発現パターンについて野生型との比較解析を行った。

4. 研究成果

STRA8^{ΔRB} マウスではオスは正常な妊性を示す一方、STRA8^{ΔLxCxE} メスの卵巣では見かけ遅れて meiotic prophase に進行した卵母細胞が認められるものの、meiotic G2 期アレストに入れず早期に枯渇してしまうことが判明した (図 1)。このことから、STRA8-RB の相互作用はメスの減数分裂の開始過程に特異的な役割を持つことが示唆された。またメスでは卵母細胞の長期 G2 arrest のプログラムと減数分裂誘導のプログラムの間には遺伝学的なリンクがあることが推定された。

STRA8-RB の相互作用の減数分裂開始過程への影響を探るために、内在性の *Str a8* 遺伝子座に GFP をノックインした野生型および STRA8^{ΔLxCxE} マウスの胎児期 E14.5 の卵巣より、生殖細胞を分離して scRNA-seq による遺伝子発現解析を行った (図 3B) (17)。この scRNA-seq 解析では、GFP 陽性の細胞集団だけを分離することにより、まさにこれから減数分裂にエントリーしようとしている生殖細胞集団をピンポイントで回収しているため、発生時間軸に沿った遺伝子発現変動のみならず細胞周期のステージごとの分解能で、減数分裂開始の変遷に対する STRA8-RB の相互作用の欠損の効果解析す

ることができる。scRNA-seq の結果から、STRA8 を発現する細胞集団には遺伝子発現パターンレベルでヘテロな性質を持つ中間段階があり、STRA8^{ΔRB} マウスで pre-meiotic G1/S 期の遷移期に相当する亜集団が喪失していることが判明した(図 2)。この事実と符合して、STRA8^{ΔLXCXE} 生殖細胞では全体的に E2F ターゲット遺伝子の発現が十分に活性化状態に達していないことや、核酸アナログ EdU の取り込みが低下していること、すなわち S 期に進行した時の兆候を示していないことが示唆された。この亜集団では E2F 下流の S 期進行に關与する遺伝子群と減数分裂關連遺伝子群が発現低下しており、pre-meiotic S 期への進行に遅延が見られることが示唆された。このことから、メス生殖細胞において STRA8 と RB の結合は pre-meiotic S 期への移行と減数分裂關連遺伝子の活性化とを同調させる役割を果たしていることが示唆された(図 3)。

STRA8^{ΔLXCXE} マウスで見られる G1-S 期移行の遅延は、本来のタイミングから 1 日程度遅れて減数分裂にエントリーする結果をもたらす。しかしながら、STRA8^{ΔLXCXE} 変異体の卵母細胞は生後直後に大部分がアポトーシスによって数が激減することが明らかとなった(図 4)。STRA8^{ΔLXCXE} マウスの出生直前 E18.5 の卵巣より、生殖細胞を分離して scRNA-seq による遺伝子発現解析を行った。その結果、通常であれば卵母細胞の成熟分化(*Nobox*, *Lhx8*)や休眠の維持に關与することが知られる遺伝子(*Foxo3*)の発現が STRA8^{ΔLXCXE} 卵母細胞ではほとんど見られないことが判明した。一方で、STRA8^{ΔLXCXE} 卵母細胞では p53 の活性化を示す下流の遺伝子の発現が亢進していた。この結果から、メス生殖細胞では、細胞周期の pre-meiotic S 期への移行と減数分裂プログラムの活性化とは、胎児期の然るべきタイミングで厳密に同調される必要があり、その後の休眠状態の維持にも影響を及ぼすことが示唆された。

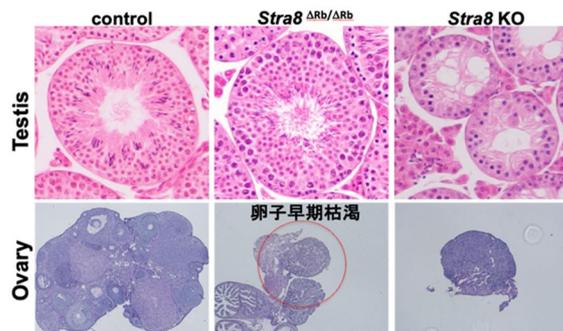


図 1 Rb と結合出来ない Stra8 変異体の表現型

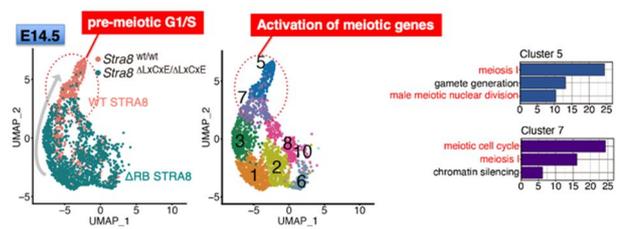


図 2 E14.5 メス生殖細胞における scRNA-seq 解析

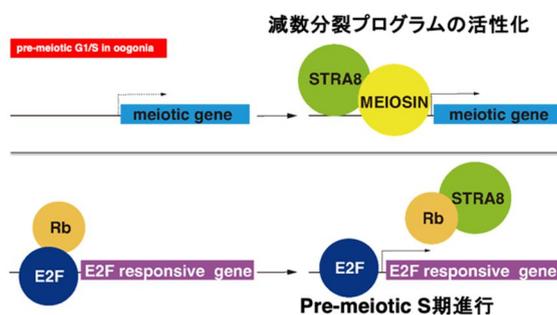


図 3 メス生殖細胞における減数分裂開始の制御

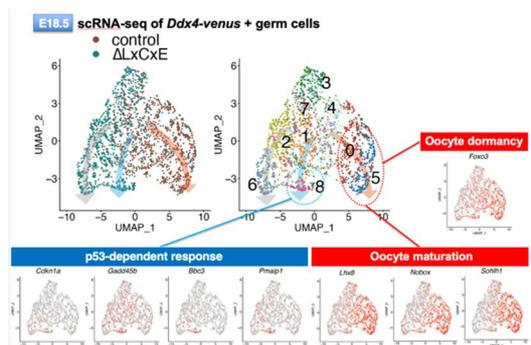


図 4 E18.5 メス生殖細胞における scRNA-seq 解析

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 2件/うちオープンアクセス 6件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 SHIMADA Ryuki, ISHIGURO Kei-ichiro | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Cell cycle regulation for meiosis in mammalian germ cells | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Reproduction and 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） 10.1262/jrd.2023-010 | 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 Ishihara Teruhito, Fenelon Jane C, Griffith Oliver W, Ishiguro Kei-ichiro, Renfree Marilyn B | 4. 巻 165 |
| 2. 論文標題 Conserved H3K27me3-associated chromatin remodelling allows STRA8 but not MEIOSIN expression in mammalian germ cells | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Reproduction | 6. 最初と最後の頁 507 ~ 520 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/rep-22-0286 | 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 Ishiguro Kei-ichiro | 4. 巻 151 |
| 2. 論文標題 Mechanism of initiation of meiosis in mouse germ cells | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Current Topics in Developmental Biology | 6. 最初と最後の頁 1 ~ 26 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.ctdb.2022.04.005 | 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 - |
| 1. 著者名 Tani Naoki, Tanno Nobuhiro, Ishiguro Kei-ichiro | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 Tandem immuno-purification of affinity-tagged proteins from mouse testis extracts for MS analysis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 STAR Protocols | 6. 最初と最後の頁 101452 ~ 101452 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2022.101452 | 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 Nobuhiro, Takemoto Kazumasa, Takada-Horisawa Yuki, Shimada Ryuki, Fujimura Sayoko, Tani Naoki, Takeda Naoki, Araki Kimi, Ishiguro Kei-ichiro | 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 ~ 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 Abe Hironori, Yeh Yu-Han, Munakata Yasuhisa, Ishiguro Kei-ichiro, Andreassen Paul R., Namekawa Satoshi H. | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Active DNA damage response signaling initiates and maintains meiotic sex chromosome inactivation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 7212 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34295-5 | 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 Oura Seiya, Hino Toshiaki, Satoh Takashi, Noda Taichi, Koyano Takayuki, Isotani Ayako, Matsuyama Makoto, Akira Shizuo, Ishiguro Kei-ichiro, Ikawa Masahito | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Trim41 is required to regulate chromosome axis protein dynamics and meiosis in male mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 PLOS Genetics | 6. 最初と最後の頁 e1010241 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1010241 | 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6件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 石黒啓一郎 |
| 2. 発表標題 減数分裂前S期の進行制御における雌雄性差 |
| 3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会 (幕張) (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 石黒啓一郎 |
| 2. 発表標題 精子形成に先がけて起こる減数分裂期のエピジェネティック制御 |
| 3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 (名古屋) (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kei-ichiro Ishiguro |
| 2. 発表標題 The sexually different mechanism of initiation of meiosis in mouse germ cells |
| 3. 学会等名 CSHL meeting Germ Cells (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 石黒啓一郎 |
| 2. 発表標題 減数分裂型細胞周期の制御における性差 |
| 3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会 (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 mechanism of meiotic initiation in mouse germ cell |
| 3. 学会等名 Gordon Research conference2022 MEIOSIS (NH, USA) (招待講演) (国際学会) |
| 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 55th Annual Meeting of JSDB (Kanazawa) (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計5件

| | |
|-------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 石黒啓一郎 | 4. 発行年 2023年 |
| 2. 出版社 ニューサイエンス社 | 5. 総ページ数 18 |
| 3. 書名 月刊「細胞」1月号 減数分裂型の細胞周期と染色体制御 | |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 石黒啓一郎 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 日本内分泌学会 | 5. 総ページ数 5 |
| 3. 書名 日本内分泌学会誌 減数分裂プログラムの制御における雌雄性差 | |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 石黒啓一郎 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 北隆館 | 5. 総ページ数 7 |
| 3. 書名 アグリバイオ 減数分裂型の染色体構造についての動物と植物との対比と共通性 | |

| | |
|--------------------------------------|-----------------|
| 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 10 |
| 3. 書名 日本受精着床学会誌 減数分裂のメカニズムと不妊との関連 | |

| | |
|---|-----------------|
| 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 7 |
| 3. 書名 Hormone Frontier in Gynecology 減数分裂開始の分子機構 | |

〔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HP https://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 |

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 |
|---------|---------|