

令和元年6月25日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07080

研究課題名(和文) マウス卵巣で機能的な卵胞形成に寄与する顆粒膜細胞の形成機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the formation of cell lineages in a mouse embryonic ovary

研究代表者

田中 聡 (Tanaka, Satomi)

熊本保健科学大学・保健科学部・教授

研究者番号：10321944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者が現所属先へと異動となった後、熊本地震により動物管理施設が損傷を受け、遺伝子改変マウスの受け入れ等、計画した実験の遂行が困難となったため、マウスの胎仔卵巣を構成する生殖細胞と生殖腺体細胞の形成を共通で制御する分子機構の解明を目指して研究を進めた。我々は、始原生殖細胞と生殖腺体細胞の前駆細胞の両方の形成を制御する転写因子Six1とSix4を見出し、ポジティブフィードバック機構を介してそれぞれの運命決定因子の発現を制御してい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

マウスの胎仔卵巣を構成する2つの細胞系譜である生殖細胞と生殖腺体細胞は、その細胞数比が生殖細胞分化に大きな影響を与えるが、その形成を共通して制御する分子機構については知られていなかった。本研究により、転写因子Six1とSix4が、異なる発生段階と胚体内の場所で、それぞれの前駆細胞形成を制御するユニークな分子機構が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In mice, BMP and WNT signaling activities play essential roles in primordial germ cell (PGC) formation through the substantial upregulation of Prdm1 (Blimp1) in PGC precursor cells, but their precise mechanisms remain elusive. We found that the transcription factors Six1 and Six4 are required for PGC formation at the downstream to BMP and WNT signaling pathways. Loss of Six1 and Six4, but neither alone, resulted in a reduction in number of PGCs accompanied by the failure of the substantial Prdm1 upregulation in PGC precursors. Further, we identified Prdm1 as a downstream target of Six1/Six4, and Six1/Six4 are the reportedly target genes of Prdm1. These findings suggest that together with T the Prdm1-Six1/Six4 transcriptional positive-feedback loop may contribute to the substantial Prdm1 upregulation during PGC formation.

研究分野：発生生物学

キーワード：生殖細胞 マウス Six1 Six4

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、次世代を産み出すことにより、遺伝情報を伝達して種の存続を図ってきた。有性生殖を行う個体では、精巣と卵巣、雌雄それぞれの生殖巣において次世代のもとである雌雄の配偶子を形成する。体細胞系譜とは異なり、生殖細胞系列には、配偶子へと分化して遺伝情報を次世代へと伝達する能力が与えられている。また、雌雄の配偶子の受精によりそれぞれの親由来の遺伝情報の混合が起こる。これは、生命の多様性を生み出す原動力の1つとなっている。次世代を作り出すためには、精子と卵子のもとである生殖細胞の形成と、その後の性差構築に伴う雌雄の配偶子の形成が必須であるが、その形成を制御する分子機構については十分には明らかにされていない。マウスの胎仔卵巣では、生殖細胞が顆粒膜細胞に覆われて原始卵胞を形成する。この顆粒膜細胞には、初期型と後期型の2種類あり、その細胞機能の違いを、タモキシフェン誘導型の複数の CreER マウスラインと Cre 誘導型の reporter マウスを用いて明らかにすることを目指していた。しかし、申請者が現所属先へと異動となった後、熊本地震により所属先の動物管理施設が損傷を受け、遺伝子改変マウスの受け入れや購入等、計画した実験の遂行が困難となったため、マウスの胎仔卵巣を構成する2つの細胞系譜である生殖細胞と生殖腺体細胞の形成を共通で制御する分子機構の解明を目指して研究を進めた。配偶子形成において、生殖細胞は、生殖腺の“性”に依存して、精子へと分化するか卵子へと分化するのかが決定される。その決定には、生殖細胞とその細胞数比を含めた周囲の生殖腺体細胞環境が重要な役割を担っている。生殖細胞は、生殖腺の体細胞が形成される以前の発生段階で、胚体内の生殖腺原基が生じる場所とは異なる場所で形成されるが、その2つの細胞系譜の形成を共に制御するような分子機構については、これまで知見が得られていなかった。

### 2. 研究の目的

マウスの胎仔卵巣を構成する2つの細胞系譜である生殖細胞と生殖腺体細胞は、異なる発生段階の異なる胚体内の位置で形成される。生殖細胞は、生殖腺される以前の発生段階において胚の後端部にて形成され、その後、形成された生殖腺原基へと移動、配偶子形成が進行する。生殖腺の雌雄の性分化や配偶子形成には、生殖細胞と生殖腺の体細胞との細胞数比を含めた細胞間相互作用が重要であるが、それぞれの細胞数を共通して制御する分子機構は明らかにされていない。我々は、生殖細胞と生殖腺の体細胞の両方の形成を、ホメオボックス型の転写調節因子 *Six1* と *Six4* がそれぞれ制御していることを見出した。*Six1* と *Six4* は、共通の DNA 結合配列に結合して転写活性化因子として相補的に働いている。そのため、それぞれの単独欠損では、他方が相補的に働き表現型を示さなかったが、*Six1* と *Six4* の二重欠損胚を用いて解析を行うことにより、隠されていた *Six1* と *Six4* の機能が明らかとなってきている。例えば、我々は二重欠損胚での解析から、*Six1* と *Six4* が、生殖腺原基の形成と生殖腺の性の決定をそれぞれ独立した転写カスケードを介して制御していることを見いだしている (Fujimoto, Tanaka, *et al.*, *Developmental Cell*, 2013)。この *Six1* と *Six4* の二重欠損胚では、“入れ物”となる体細胞系譜の細胞数が減少するため小さな生殖巣が形成されるが、それに合わせるように、“中身”である生殖細胞の細胞数も同様に減少していた。そこで、本研究では、*Six1* と *Six4* による生殖細胞と生殖腺体細胞の前駆細胞集団形成を調節する分子機構の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

研究方法としては、主に *Six1* と *Six4* の二重欠損マウス胚を用いて解析を進めた。*Six1* と *Six4* の欠損マウスでは、*Six1* 遺伝子座に *GFP*、*Six4* 遺伝子座に *LacZ* のレポーター遺伝子がそれぞれノックインされている。そこで、そのレポーター遺伝子の発現を指標として、*Six1* と *Six4* の生殖細胞系譜での発現様式を調べた。マウス生殖細胞形成における *Six1* と *Six4* の役割を明らかにするため、その欠損マウス胚を用いて始原生殖細胞が、どの発生段階：その前駆細胞集団の形成、始原生殖細胞への運命決定、移動、或は生殖巣への定着期で減少しているのかを調べた。さらに、*Six1* と *Six4* が、生殖細胞への運命決定に関わる *Blimp1* の転写活性化を制御しているのかについて、レポーターアッセイやクロマチン免疫沈降法 [chromatin immunoprecipitation (ChIP)] 等の生化学的な解析を行った。

### 4. 研究成果

*Six1* と *Six4* の発現様式を調べたところ、*Six1* は始原生殖細胞と周囲の体細胞に、*Six4* は、特に始原生殖細胞に強く発現していた。*Six* ファミリーは、*Six1*~*Six6* まで存在するが、始原生殖細胞の cDNA プールを用いた PCR 法で調べた結果、*Six1*、*Six4*、*Six5* の生殖細胞での発現が認められた。*Six5* は、*Six1* と *Six4* の共通 DNA 結合配列には殆ど結合しないことから相補的に働くとは考えにくく、生殖細胞数の減少は、*Six1* と *Six4* の共通する標的遺伝子の転写活性化が十分に起こらないためと考えられた。マウスの始原生殖細胞は、胚後端部の尿膜基部の領域で形成され、その後、後腸、腸間膜を通して生殖腺原器である生殖隆起に移動・定着する。*Six1* と *Six4*

の二重欠損マウス胚では、始原生殖細胞の移動や生殖隆起への定着に異常は認められなかった。そこで、始原生殖細胞が形成される胎齢 7.5 日齢の二重欠損マウス胚で始原生殖細胞数を調べた結果、すでに、始原生殖細胞の数が半数以下に減少していた。この時期の始原生殖細胞の数の変化を経時的に調べたところ、*Six1* と *Six4* の二重欠損マウス胚では、野生型胚と同様な増加率を示していた。このことから、始原生殖細胞数の減少は、増殖や生存性の低下によるものではなく、最初に形成される数が少ないためであることが明らかとなった。次いで、始原生殖細胞の前駆細胞を標識できる *Blimp1-RFP* マウスを導入し ( Sugimoto and Abe, 2007 )、*Six1* と *Six4* の二重欠損マウス胚と掛け合わせを行い、*RFP* 陽性の始原生殖細胞の前駆細胞数を調べた。その結果、前駆細胞数の減少並びに、陽性細胞の *RFP* の蛍光強度の減弱が二重欠損胚で観察された。マウス生殖細胞の前駆細胞形成では、*Blimp1* は運命決定因子として働き、その陽性細胞から始原生殖細胞が形成される。また、*Blimp1* は発現量依存的に決定因子として働くことが報告されている ( Ohinata *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2005 )。 *Six1* と *Six4* は転写因子であることから、*Blimp1* の転写を直接的に制御している可能性を考え、*Blimp1* 転写開始点上流の配列を調べた。その結果、*Blimp1* の転写開始点の約 3 kb 上流には、*Six1* と *Six4* の DNA 結合配列が存在していた。そこで、Embryonic stem (ES) 細胞において ChIP 解析を行った結果、この領域に *Six1* と *Six4* が結合する事が示された。また、この領域を用いてレポーターアッセイ行なった結果、*Six1* と *Six4* の結合依存的に転写が活性化することが明らかとなった。一方、P19 embryonal carcinoma 細胞での *Blimp1* の ChIP sequencing 解析から、*Blimp1* が *Six1* と *Six4* の遺伝子座に結合することが示されている (Magnúsdóttir *et al.*, 2013)。さらに、マウス胚での single-cell transcriptome 解析から、*Blimp1* 陽性の前駆細胞で *Six4* の mRNA が特異的に上昇していることが示されている (Kurimoto *et al.*, 2008)。これらのことから、*Six1/Six4* と *Blimp1* の間でポジティブフィードバック機構が働き、*Six1* と *Six4* が、*Blimp1* を安定的に強く発現する細胞集団の形成に寄与していると考えられた。つまり、*Six1* と *Six4* を欠損により *Blimp1* の発現量の多い細胞が維持されず、結果、*Six1* と *Six4* の二重欠損マウス胚では、始原生殖細胞数が減少すると考えられる。同様のポジティブフィードバック機構は、生殖腺の体細胞の前駆細胞形成にも存在していると考えられた。生殖腺の体細胞では、*Ad4BP* (*Nr5a1/Sf1*)がその運命決定因子として発現量依存的に働く。*Six1* と *Six4* は、*Ad4BP* の転写を活性化することで、体細胞の前駆細胞形成に寄与している ( Fujimoto, Tanaka, *et al.*, *Developmental Cell*, 2013 )。この *Ad4BP* の転写開始点上流領域にも *Six1* と *Six4* の結合配列が存在しており、予備的な結果からは、*Ad4BP* が *Six1* と *Six4* の転写活性化に働く可能性が示唆された。以上のことから、異なる時空で形成される生殖細胞と生殖腺の体細胞の両方の細胞系譜において、*Six1* と *Six4* がそれぞれの運命決定因子 *Blimp1* と *Ad4BP* との間の転写制御に関するフィードバック機構を介することで、この運命決定因子を安定的に高発現する前駆細胞集団の形成に寄与していることを明らかにした。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 2 件 )

Y.L. Yamaguchi, S.S. Tanaka, M Kumagai, Y Fujimoto, T Terabayashi, Y Matsui and R Nishinakamura. *Sall4* is essential for mouse primordial germ cell specification by suppressing somatic cell program genes. *Stem Cells* (査読有)33, 2015, 289-330.

S Fatima, K.M. Wagstaff, K.G. Lieu, R.G. Davies, S.S. Tanaka, Y.L. Yamaguchi, K.L. Loveland, P.P.L. Tam, D. A. Jans. Interactome of the inhibitory isoform of the nuclear transporter Importin 13. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* (査読有)1864, 2017, 546-561.

[ 学会発表 ] ( 計 8 件 )

S.S. Tanaka, Y.L. Yamauchi, Y. Fujimoto, K. Kawakami and R. Nishinakamura. *Six1* and *Six4* homeodomain proteins regulate mouse primordial germ cell formation. 48th The Japanese Society of Developmental Biologists, 2015.

田中 聡、山口 泰華、藤本 由佳、川上 潔、西中村 隆一. 転写因子 *Six1* と *Six4* は、生殖巣を構成する体細胞と生殖細胞の前駆細胞形成を制御する. 第 38 回日本分子生物学会、2015

田中 聡、山口 泰華、金井 克晃、川上 潔、西中村 隆一. 生殖腺形成と性分化、生殖細胞形成を共に制御する遺伝子ネットワークの解明. 第 39 回日本分子生物学会、2016

S.S. Tanaka, Y.L. Yamauchi, Y. Fujimoto, K. Kawakami and R. Nishinakamura. *Six1* and *Six4* regulate germ and gonadal somatic progenitor cell formation in mice. 50th The Japanese Society of Developmental Biologists, 2017

S.S. Tanaka, Y.L. Yamauchi and P.P.L. Tam. Importin13 is essential for the peri-implantation mouse embryo development. 第 40 回日本分子生物学会、2017

山口 泰華、Patrick P. L. Tam、田中 聡. Importin13 は、マウス初期胚の発生に必須である。日本繁殖生物学会、2018

Y.L. Yamauchi, Y. Fujimoto, K. Kawakami R. Nishinakamura and S.S. Tanaka. Six1 and Six4 regulate the number of germ progenitors in mice. 第 49 回日本発生生物学会、2018

田中 聡、山口 泰華、Patrick P. L. Tam. Importin13 は、マウス初期胚の発生に必須である。第 41 回日本分子生物学会、2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。