

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19304

研究課題名（和文）生殖細胞系列と体細胞系列の高次クロマチンドメインの違いを規定するメカニズムの解明

研究課題名（英文）Study on the difference in chromatin domain between germ and somatic cells

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） 4,800,000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。MEIOSINを欠損させると精巣・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。

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遺伝子が含まれることが判明したが、直接制御される標的遺伝子には多くの未解析のhypothetical geneが含まれることが判明している。そのうち5つについて精巣萎縮の表現型が認められたので、さらに機能解析を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が最近同定した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によって制御を受ける未解析の遺伝子について、それらの機能が徐々にわかってきました。これらの新規の遺伝子は、減数分裂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る。

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：分子生物学

キーワード：減数分裂 生殖細胞 染色体 精子形成 配偶子 生殖 発生 卵子

## 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応答して減数分裂に進行することが知られていた。しかしながら減数分裂の切替え制御が何によって制御されているのかという問題は、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応答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たが、その分子機構の解明は国際的にも攻め倦んでいた。最近我々は、減数分裂の開始に働く新規の因子 MEIOSIN を同定した。MEIOSIN は減数分裂関連遺伝子のプロモーター近傍に結合して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を見出した(Dev Cell 2020)。この MEIOSIN の標的遺伝子が減数第一分裂において何らかの機能を果たすことが示唆されていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、減数分裂の制御機構の解明を目的とする。MEIOSIN の制御下に置かれている遺伝子群の中には減数分裂での機能を特徴付ける遺伝子が複数含まれるが、この標的遺伝子には多くの未解析の hypothetical gene が多く含まれることが判明した。これらの未解析の遺伝子には、減数第一分裂に必要とされる未開拓の因子や体細胞型の細胞周期を積極的に抑制するものが含まれる可能性がある。そこで本研究ではこれらの遺伝子のノックアウトマウスを作製して機能の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

MEIOSIN の制御下に置かれている hypothetical gene について、発現パターンの組織特異性を RT-PCR 法で検討して精巣と卵巣に発現が限定される遺伝子を絞り込んだ。さらにスクリーニングによって選抜された 10 の遺伝子について受精卵への CRISPR-Cas9 導入による遺伝子破壊を行い、8 週齢 F0 個体の精巣が委縮を示すか否かを指標に表現型を解析した。なお効率良くスクリーニングを進める必要があるため、allele の塩基配列の確認の手間を省くことができるように標的遺伝子座を大きく欠失させる ssODN 法を用いた。そのうち精巣委縮の表現型を示すものについて、さらにライン化して homozygous マウスの機能解析を進めた。このスクリーニングにより選抜された複数の因子については抗体を作成して組織学的検討を行った。

## 4. 研究成果

MEIOSIN 標的遺伝子のKOスクリーニングにより4930432K21rik遺伝子の破壊で精巢の萎縮が確認された。

4930432K21rikは特徴的なドメインを持たないため当初機能の推定が困難であった。しかしながら、4930432K21rik の抗体を作成し、精巢クロマチン分画からのIP-MS解析から減数分裂組換え因子 (BRCA2, HSF2BP) や ssDNA binding proteinとの相互作用が示唆された。したがって、4930432K21rikは減数分裂組換えの修復過程で働いていることが強く示唆された。さらに4930432K21rikは減数第一分裂のときに染色体の軸に沿ってfoci状の局在を示すことが判明した。さらにKOマウスの詳細な表現型解析から、4930432K21rikは減数分裂組換えの素過程でDSBによって露出されたssDNA末端に局在して、RAD51-HSF2BP-BRCA2リコンビナーゼをリクルートすると同時にssDNA binding proteinをキックアウトする役割があると解釈された (図1)。

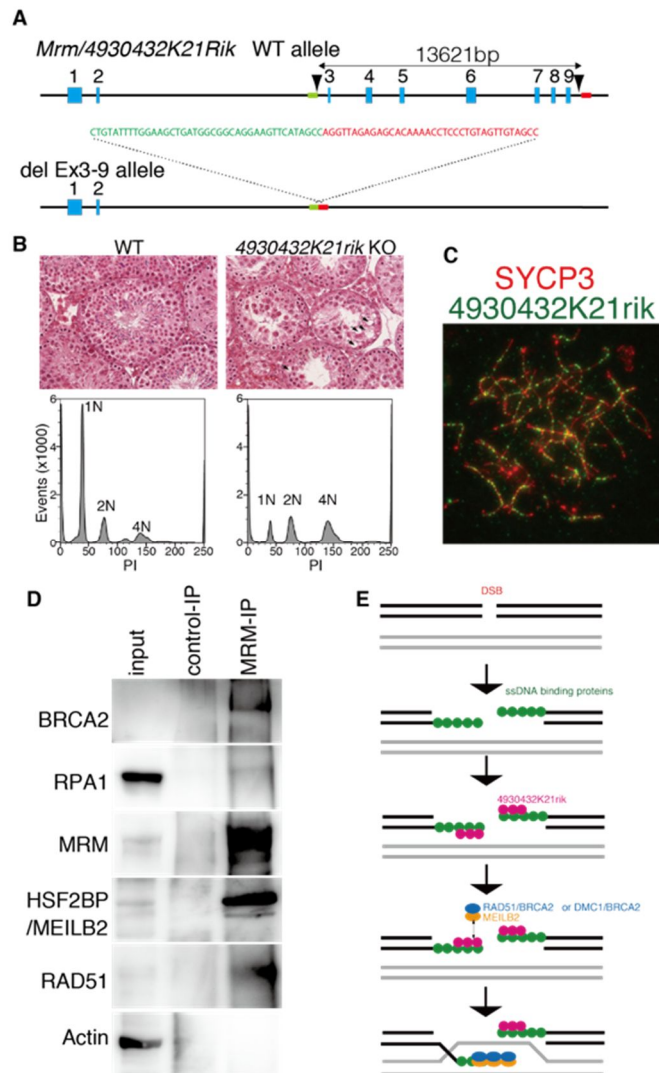


図1. 新規の減数分裂組換え因子 4930432K21rik の解析

時にssDNA binding proteinをキックアウトする役割があると解釈された (図1)。この考えは、本来非相同DNA末端結合修復NHEJが優位に働くmammalの細胞核内で、減数分裂期では相同組み換えが効率良く働くようにする機構とも符号する。減数分裂組換えの過程でリコンビナーゼをリクルートする機構は実はこの分野では解明されていない問題で、この成果は大きなインパクトを与えることが期待される。

またさらに、MEIOSIN target である ZFP541 は meiotic prophase の後半から半数体の round spermatid で発現する Zinc finger ドメインを持つタンパク質であることが判明した。Zfp541 を欠損させると減数第一分裂以降のステージへの進行が見られず不妊を示すことが明らかになり、減数第一分裂を exit する過程で何らかの役割を担っていることが推定された (図 2)。精巢クロマチン分画からの IP-MS 解析から ZFP541 は HDAC、KCTD19

と相互作用することが判明している。この事実は ZFP541 が抑制性の転写制御に働くことを示唆する。また ChIP-seq 解析の解析から ZFP541 は多くの遺伝子の TSS に結合することがわかっている。KCTD19 は精巣で特異的に発現する機能不明の未解析の因子であったが、クロマチンリモデリング因子によく見られる POZ/BTB ドメインをもつことから ZFP541 と相互作用して転写抑制に協調している可能性が示唆される。実際に、Kctd19 を欠損させると Zfp541 KO マウスと同様の不妊の表現型を示すことが明らかになり、減数第一分裂を exit する過程で何らかの役割を担っていることが推定される。本研究はこれまでに先行研究が少ない減数分裂の遺伝子発現プログラムの終結について一石を投じる可能性が期待される。ZFP541-KCTD19-HDAC 複合体による遺伝子発現制御と減数分裂脱出との関連を明らかにして公表を目指す。

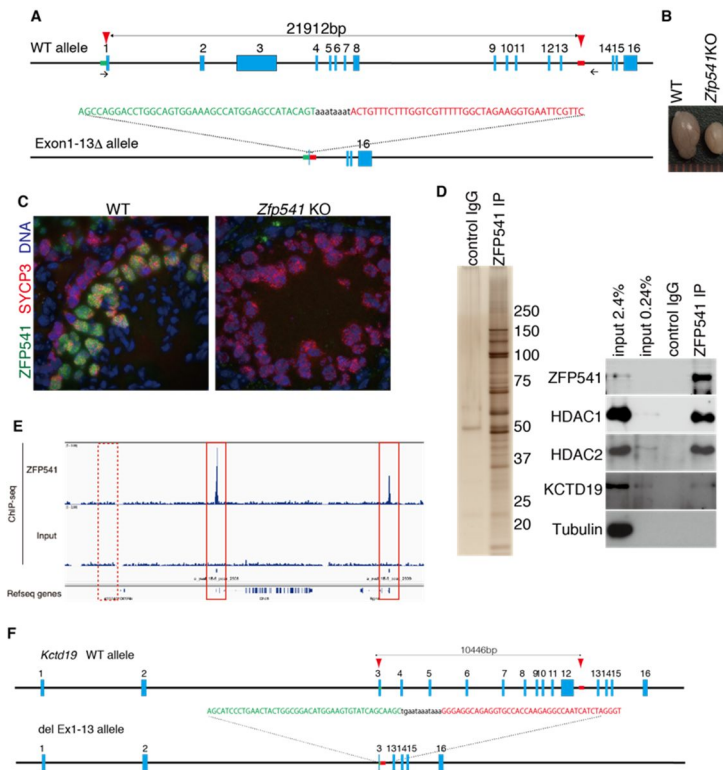


図 2 . 減数分裂後期における ZFP541-KCTD19-HDAC 複合体の転写制御の役割

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 無
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10件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3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）
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

〔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  <a href="http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/chromosome-biology/">http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/chromosome-biology/</a></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