

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008-2009

課題番号：20770177

研究課題名 (和文) 生殖幹細胞の減数分裂移行と相同組換え制御の分子基盤

研究課題名 (英文) Meiotic transition of germline stem cells and molecular regulation of homologous chromosome recombination

研究代表者 中馬 新一郎 (CHUMA SHINICHIRO)
京都大学・再生医科学研究所・助教

研究者番号：20378889

研究成果の概要 (和文)：本研究計画ではマウス生殖幹細胞株を用いて体細胞型分裂周期から DNA 複製を経て第 1 減数分裂前期へ同調して移行する培養実験条件を作出した。同実験系を用いる事で生体内の生殖細胞では研究が困難であった哺乳類の減数分裂を制御するシグナル伝達や相同染色体組換えに伴うクロマチン動態等の詳細な分子生物学的、生化学的解析を進める事が可能となり、レチノイン酸シグナルと Akt 経路のクロストークが減数分裂移行を制御する事を発見した。

研究成果の概要 (英文)：In this research project, we developed a novel culture system in which an established germline stem cell line derived from mouse spermatogonia can be synchronously induced to enter into meiotic prophase in vitro. This culture system enabled detailed molecular and biochemical analyses on mammalian meiosis such as inductive and inhibitory signaling pathways, their crosstalk and chromatin dynamics during homologous chromosome recombination.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
H20 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
H21 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：発生生物

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：生殖細胞、減数分裂、発生、ゲノム

1. 研究開始当初の背景

減数分裂の制御機構の研究は主に単細胞モデル生物、特に酵母を用いて行われて来た。一方、多細胞生物において体細胞周期から減数分裂移行を制御するシグナルカスケードおよび相同染色体組換え等クロマチン動態の分子制御の解析は進んでいない。これは多細胞生物の生殖細胞では細胞レベルで減数分裂の詳細、経時的な解析を可能とする効率の良い実験系が欠如していた事が理由の一つである。研究代表者はマウスをモデルとしてこれまでに(1)胎仔始原生殖細胞が培養下で第1減数分裂前期に移行する実験条件作出とその制御分子の同定(Chuma et al., Dev. Biol., 2001)、(2)始原生殖細胞を成体精巣へ異時的に細胞移植する事で減数分裂、配偶子成熟、受精を経て個体発生へ寄与可能な事(Chuma et al., Development, 2005)、(3)雄生殖細胞の分化過程に沿った *in vivo* 遺伝子機能獲得、抑制実験系(Shoji et al., Dev. Biol., 2005)を報告し、また(4)精原細胞の樹立細胞株であるマウス生殖幹細胞株(Kanatsu-Shinohara et al., Biol. Reprod., 2003)が第1減数分裂前期に同調して移行する培養実験条件を作出した。本研究計画ではこのマウス生殖幹細胞株の減数分裂移行実験系を解析の主軸に研究の遅れている哺乳類減数分裂制御の分子生物学的研究を進める。

2. 研究の目的

生殖細胞は遺伝情報を次世代に伝達し、個体発生の起点となる細胞系譜である。その発生分化過程ではゲノム再プログラム化、個体発生の維持形成、相同染色体組換え等重要な生命現象が起こる。初期胚で運命決定を受けた生殖系譜細胞は体細胞型分裂により増殖する一方、減数分裂、雌雄配偶子形成、受精を経て次世代の個体発生を開始する。生殖細胞ゲノムの正確な保持と伝達は個体発生、種の継続に重要であると共に、減数分裂による

1倍体化とゲノム相同組換えによって遺伝情報の多様性が生まれる。減数分裂の制御および相同組換え機構の研究は主に酵母を用いて行われる一方、多細胞生物においてその分子基盤の解明は進んでいない。研究代表者はマウス生殖幹細胞株が第1減数分裂前期に同調して移行し相同染色体組換え複合体を形成する培養実験条件を作出した。本研究では同実験系を主な研究材料として分子生物学、生化学、遺伝学的解析を用い、(1)生殖幹細胞から減数分裂移行を制御するシグナルカスケード、(2)相同染色体組換え複合体の時系列変化と制御機構、を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 生殖細胞の減数分裂移行を制御するシグナルカスケードの解明：マウス生殖幹細胞株は GDNF、bFGF (FGF-2) のシグナル存在下で体細胞型分裂による増殖を行うが、研究代表者は両シグナルが生殖幹細胞株の減数分裂移行を抑制する事を見出した。両因子を除いた培養条件では生殖幹細胞株は自律的に第1減数分裂前期に移行する。GDNF、bFGF の減数分裂抑制は更にレチノイン酸によって上位に抑制される。この減数分裂過程はアポトーシスインヒビターの選択的使用によって観察可能となった。本研究では上述の減数分裂制御因子のシグナルクロストークを生殖幹細胞株を用いて解析し、個体レベルの細胞移植実験により生理機能を実証する事で、生殖細胞の減数分裂開始を制御するシグナルカスケードを明らかにする。

(2) 相同染色体組換え複合体の時系列変化と制御機構：減数分裂の初期移行を明瞭に特徴付けるのはゲノム DNA の能動的二重鎖切断と相同染色体組換えである。同機構は体細胞周期における DNA 損傷とその修復とは異なり、Spo11により DNA 二重鎖が能動的に切断され、RecA ホモログ Rad51、Dmc1 を含む相同遺伝子組換え複合体が二重鎖切断部位に集積し、相同染色体対合を介してゲノム DNA 組換えが進

行する。本研究では生殖幹細胞株の同調的な減数分裂移行を利用し、(2.1) 減数分裂期相同染色体組換え複合体に関して Rad51、Dmc1 および SYCP3、REC8 等のシナプトネマル構造に着目して、各複合体構成分子の同定と経時的な分子集積を解析する。その結果を基に機能未知の遺伝子、蛋白質に関して生化学的、遺伝学的実験により分子、生理機能を明らかにし、減数分裂初期遺伝子群、特に相同染色体組換え複合体分子の発現制御と減数分裂開始シグナルのクロストークを解明する。これらの研究により生殖細胞の体細胞周期-減数分裂制御と相同染色体組換え機能発現の連携を調べ、哺乳類減数分裂の初期過程における分子ネットワークを解明する事を目指す。

4. 研究成果

マウス生殖幹細胞株が第1減数分裂前期に同調して移行する培養実験条件を作出し、(1)減数分裂誘導に伴い DNA 複製、cohesin 複合体及び axial element 形成、ヒストン修飾等のクロマチン動態の変化と未分化幹細胞マーカーの消失および細胞周期、DNA 組換え複合体誘導等の詳細な時系列解析を行い、(2)減数分裂誘導における Akt 経路とレチノイン酸 RAR レセプターの活性化・不活性化制御およびレンチウイルスベクターを介した各種 dominant positive、dominant negative 体発現等によるシグナル伝達クロストーク、(3)生殖幹細胞株のマウス新生仔精巣への移植法を用いた Akt、レチノイン酸 RAR レセプター経路の生体での生理機能の検証、を行った。これらの研究によりマウス未分化生殖幹細胞から第一減数分裂初期へ同調して移行する極めて重要な培養実験系の確立と体細胞-減数分裂周期の転換とクロマチン動態を制御するシグナル伝達クロストークの同定に成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline: Shoji M, Tanaka T, Hosokawa M, Reuter M, Stark A, Kato Y, Kondoh G, Okawa K, Chujo T, Suzuki T, Hata K, Martin SL, Noce T, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Sasaki H, Pillai RS, Nakatsuji N, Chuma S. Dev Cell. 2009, 17, 775-87.

2. Ultrastructural characterization of spermatogenesis and its evolutionary conservation in the germline: germinal granules in mammals: Chuma S, Hosokawa M, Tanaka T, Nakatsuji N. Mol Cell Endocrinol. 2009, 306, 17-23.

3. Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on beta1-integrin: Kanatsu-Shinohara M, Takehashi M, Takashima S, Lee J, Morimoto H, Chuma S, Raducanu A, Nakatsuji N, Fässler R, Shinohara T. Cell Stem Cell. 2008, 3, 533-42.

(全て査読有り)

[学会発表] (計2件)

1. Shinichiro Chuma: Ultrastructural characteristic of spermatogenesis and its evolutionary conservation in the germline. 15th European testis workshop with NAFA annual meeting (2008.5.2-6 Naantali, Finland) (招待講演)

2. Takashi Tanaka, Mihoko Hosokawa, Norio Nakatsuji, Shinichiro Chuma: The roles of tudor genes in mammalian spermatogenesis. 第32回日本分子生物学会年会 (2009.12.9-12 横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中馬 新一郎 (CHUMA SHINICHIRO)
京都大学・再生医科学研究所・助教
研究者番号：20378889

(2) 研究分担者

なし
研究者番号：

(3) 連携研究者

なし
研究者番号：