

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370089

研究課題名(和文)生殖細胞の減数分裂誘導とクロマチン構造転換の制御ネットワーク

研究課題名(英文)Regulatory network and chromatin dynamics of meiosis induction in the germline

研究代表者

中馬 新一郎(CHUMA, SHINICHIRO)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：20378889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らはマウス生殖幹細胞株が体細胞型分裂から第1減数分裂前期(レプトテン-ザイゴテン期)に同調して移行する培養条件を作出した。本研究計画では同in vitro減数分裂誘導系を研究材料の主軸にマルチオミクスデータ取得と細胞生物学的解析を行った。生殖幹細胞の増殖分化転換に伴うトランスクリプトームおよびプロテオーム制御の解明を通じて、減数分裂移行を規定する分子プログラムとクロマチン動態制御の初期プロセスについて包括的かつ重要な理解を得る事が出来た。

研究成果の概要(英文)：We established a culture system to induce meiotic transition (leptotene-zygotene stage of prophase I) of mitotically proliferating mouse germline stem cells in vitro. In this research project, we carried out multi-omics analyses and cell biological studies of the in vitro differentiation model of meiosis induction in germline stem cells. Integrated analyses of transcriptome and proteome regulation led to a comprehensive characterization of the key initial processes of chromatin remodeling in meiotic nuclei of mammalian germ cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：減数分裂 クロマチン 生殖細胞

## 1. 研究開始当初の背景

単細胞モデル生物、特に酵母等と比べて多細胞生物の生殖系譜における体細胞型分裂から減数分裂誘導の細胞周期転換の制御メカニズム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均一な細胞レベルでの詳細、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大きな理由の一つである。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の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、抑制実験系の作出(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。本研究計画ではマウス生殖幹細胞株の培養下における減数分裂誘導実験系を研究材料の主軸に、プロテオーム解析やクロマチン動態の分子生化学的解析を行い、(1)生殖幹細胞から減数分裂移行に伴う核内動態転換、(2)減数分裂を誘導する分子経路と核内動態の制御クロストーク、の解明を進める。

## 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。多細胞生物では初期胚で運命決定を受けた予定生殖細胞は体細胞型分裂により増殖する一方、減数分裂、配偶子形成、受精を経て次世代の個体形成を開始する。生殖細胞ゲノムの安定な保持と伝達は個体、種の継続に重要であると共に、減数分裂による相同遺伝子組換えと1倍体化によって遺伝情報の多様性が生まれる。

減数分裂の制御機構の研究は主に酵母等の単細胞生物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体細胞型増殖から第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。この第1減数分裂前期への移行は培養下ではほぼ同調して均一に進行する事から細胞生物学、分子生化学解析の有用な実験対象となり、生体精巣等を用いた研究では困難であった体細胞型分裂から減数分裂移行に伴う詳細なクロマチン制御の時系列解析を進める事が可能となる。本計画ではこれら生殖幹細胞株の培養システムを研究材料の中心としてdata driven型マルチオミクス解析と個別の遺伝子、経路の機能解析を進め、生殖幹細胞の体細胞型増殖から減数分裂誘導過程のクロマチン動態転換と減数分裂期核成立の初期プロセスの全体像を把握する事を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では生殖幹細胞株が体細胞型分裂から減数分裂前期へ同調的に移行する培養実験系を利用し、時系列に沿った核内動態、特にシナプトネマル構造、組換え複合体、エピゲノム修飾等に関わるクロマチンリモデリング因子等の経時的な発現や集積の包括的な分子同定と変動解析を行う。蛋白質はnano-HPLC MS/MS 質量分析によるプロテオーム解析、RNA発現はマイクロアレイおよびRNA seq解析、蛋白質-ゲノムDNA 相互作用はクロマチン免疫沈降等を用い、網羅的data driven 型研究を展開する。得られた時系列データは統計解析を行うと共に生物学的情報を付加したデータマイニングと意味抽出を行う。これら研究を通じて生殖幹細胞から減数分裂開始に伴うゲノム、クロマチン動態の初期プロセスについて包括的データのカタログ取得を行うと共に機能的に重要と予測される変動分子や特異的な機能経路を同定する。

#### 4. 研究成果

マウス生殖幹細胞株 (GS 細胞株、京都大学篠原隆司博士らにより分与) は GDNF、bFGF の存在下で体細胞型増殖を行うが、両シグナルは GS 細胞の未分化性を維持すると共に減数分裂を抑制する。GDNF、bFGF の減数分裂抑制は更にレチノイン酸刺激によって上位に抑制され、レチノイン酸レセプターを介した転写制御が細胞自律的に減数分裂移行を決定する。この減数分裂の誘導過程 (レプトテン-ザイゴテン期まで) はアポトーシスインヒビターの選択的使用もしくはアポトーシス促進遺伝子の条件的抑制によって観察可能となった。GS 細胞の減数分裂誘導後、STRA8 等の減数分裂マーカーは 24 時間で発現が大幅に上昇する一方、核内 (プレ) レプトテン形成は 72-96 時間で > 90% 以上の細胞で観察される。GS 細胞の減数分裂誘導後 0、1、3、5 日の時系列 RNA seq 解析を行った結果、減数分裂期クロマチン因子等について初期応答遺伝子群、後期応答遺伝子群がクラスターリングされる事が明らかになった。レチノイン酸レセプター(RAR)に対する ChIP seq 解析等と RNA seq 解析の結果を統合する事により、減数分裂期クロマチン因子等の約半数は RAR による直接の転写制御を受け一方、残り約半数は RAR に依存しないもしくは間接的な発現制御を受け事が明らかとなった。後者の遺伝子群についてプロモーター領域のシスエレメント解析により制御候補因子を同定した。GS 細胞の減数分裂誘導過程における包括的なプロテオーム制御を解明する為、nanoHPLC-MS/MS 解析を行った。蛋白質の相対定量データ取得は安定同位体を用いる SILAC 法を使用した。GS 細胞の培養条件を至適化する事で SILAC ラベルを行った GS 細胞および減数分裂誘導サンプルを得る事が出来た。蛋白質同定率を上げる為にペプチドサンプルの多次元分画、特にアルカリ逆

相分画を C18 分画と併用した。これらプロテオーム解析は ES 細胞や体細胞との比較により GS 細胞の体細胞型増殖時の特性解明および減数分裂誘導時の包括的プロテオームの変動について網羅的データを得た。興味深い結果の得られた因子についてはプロテオーム解析と併せてウェスタンブロット解析による確認を行った。これら ChIP-seq、RNA seq、プロテオーム等によるマルチオミクスデータを統合して得られた減数分裂制御に関する機能遺伝子候補についてはレンチウィルスシステムを用いた機能獲得、抑制スクリーニングによる表現型解析を進めた。また各種化合物 (キナーゼ阻害剤、チェックポイント阻害剤、代謝経路制御化合物) の減数分裂誘導に与える影響を調べた。これら研究によって減数分裂移行を規定する分子プログラムとクロマチン制御のクロストークおよび減数分裂期核成立の初期プロセスについて包括的かつ非常に重要な成果を得る事が出来た。

#### 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 8 件)

- ① Ichianagi T, Ichianagi K, Ogawa A, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Chuma S, Sasaki H, Udono H. HSP90 $\alpha$  plays an important role in piRNA biogenesis and retrotransposon repression in mouse. *Nucleic Acids Res.* 2014 Oct 29;42(19):11903-11. doi: 10.1093/nar/gku881.
- ② Chuma S. LINE-1 of evidence for fetal oocyte attrition by retrotransposon. *Dev Cell.* 2014 Jun 9;29(5):501-2. doi: 10.1016/j.devcel.2014.05.017.

- ③ Pandey RR, Tokuzawa Y, Yang Z, Hayashi E, Ichisaka T, Kajita S, Asano Y, Kunieda T, Sachidanandam R, Chuma S, Yamanaka S, Pillai RS. Tudor domain containing 12 (TDRD12) is essential for secondary PIWI interacting RNA biogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Oct 8;110(41):16492-7. doi: 10.1073/pnas.1316316110.
- ④ Lim AK, Lorthongpanich C, Chew TG, Tan CW, Shue YT, Balu S, Goukko N, Kuramochi-Miyagawa S, Matzuk MM, Chuma S, Messerschmidt DM, Solter D, Knowles BB. The nuage mediates retrotransposon silencing in mouse primordial ovarian follicles. *Development*. 2013 Sep;140(18):3819-25. doi: 10.1242/dev.099184.
- ⑤ Shiromoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Daiba A, Chuma S, Katanaya A, Katsumata A, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Nakamura T, Yoshinaga K, Asada N, Nakamura S, Yasunaga T, Kojima-Kita K, Itou D, Kimura T, Nakano T. GPAT2, a mitochondrial outer membrane protein, in piRNA biogenesis in germline stem cells. *RNA*. 2013 Jun;19(6):803-10. doi: 10.1261/rna.038521.113.
- ⑥ Chuma S, Nakano T. piRNA and spermatogenesis in mice. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2013 Jan 5;368(1609):20110338. doi: 10.1098/rstb.2011.0338.

⑦ Xiol J, Cora E, Kogelgruber R, Chuma S, Subramanian S, Hosokawa M, Reuter M, Yang Z, Berninger P, Palencia A, Benes V, Penninger J, Sachidanandam R, Pillai RS. A role for Fkbp6 and the chaperone machinery in piRNA amplification and transposon silencing. *Mol Cell*. 2012 Sep 28;47(6):970-9. doi: 10.1016/j.molcel.2012.07.019.

⑧ Morozumi Y, Ino R, Takaku M, Hosokawa M, Chuma S, Kurumizaka H. Human PSF concentrates DNA and stimulates duplex capture in DMC1-mediated homologous pairing. *Nucleic Acids Res*. 2012 Apr;40(7):3031-41. doi: 10.1093/nar/gkr1229.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Chuma S, piRNA in germ cell development. "germinal stem cell biology" Gordon Research Conference (Hong Kong) 2015.05.31
- ② 中馬新一郎、トランスポゾン制御破綻が引き起こす精子形成不全症 第 61 回日本実験動物学会シンポジウム (札幌) 2014. 5. 15-17
- ③ 中馬新一郎、マウス精子形成過程のトランスポゾン抑制と RNP 制御 京都大学霊長類研究所研究会 (犬山) 2014. 8. 26-27

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/rc01/index-j.htm>

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・准教授  
研究者番号 : 20378889