

高等動物における体細胞増殖から減数分裂型細胞周期への切替えの分子機構の解明

Study on induction of meiotic cell cycle in mammals

(日本分子生物学会推薦)

代表研究者 熊本大学発生医学研究所 石黒 啓一郎 Kumamoto University Kei-ichiro Ishiguro

In mammals, STRA8 is transiently expressed in response to retinoic acid signaling during meiotic initiation. Although STRA8 is essential for meiotic initiation, the underlying mechanism of this process remains largely elusive. To elucidate the molecular mechanisms of meiotic initiation, we purified STRA8 protein complex from testes of the genetically engineered STRA8 knockin mice. Mass-spectrometric analysis identified a novel nuclear factor StIP1, which is encoded by a previously uncharacterized hypothetical gene. StIP1 shows germ cell specific expression in testis and embryonic ovary. Crucially, despite of STRA8 expression, StIP1 knockout testes show severe defects in initiation of meiosis with mitosis-like chromosome segregation. These results suggest that StIP1 - STRA8 complex plays a crucial role in initiation of meiosis.

研究目的

生殖細胞は通常の体細胞で見られるものと同様の細胞周期の機構を巧みに転用しながらも、減数分裂仕様に大幅に特化した仕組みと特異的な染色体構造変換が与えられるようにプログラムされている。体細胞分裂と比較した場合、減数分裂では第一分裂に還元型の染色体分配が挿入されている点が両者の本質的な相違を決定付けている。とりわけ、この減数第一分裂では姉妹動原体の接着、二価染色体の形成、染色体の axis-loop 構造形成、テロメア-核膜複合体を介した染色体運動など、体細胞系譜では見られないユニークな染色体動態が観察される。さらに生殖細胞は通常の体細胞と同様の細胞周期の機構を巧みに転用しながらも、減数分裂仕様にプログラムされている。例えば減数第一分裂前期(meiotic prophase I)と呼ばれる時期は、通常の体細胞の細胞周期の G2 期に相当するが、そのタイムスパンが通常の細胞周期 G2 期と比べて際だって長いことや、第一分裂 M 期が完了しても次の S 期が開始されずに直ちに第二分裂へ進行する点も、通常の細胞周期と極めて異なる特徴の一つである。このように細胞周期の調節は減

数分裂仕様に大幅に特殊化されると同時に体細胞分裂を積極的に抑制するメカニズムがあると推定されるが、その実態については未だ不明な点が多い。しかしながら、高等動物における体細胞増殖から減数分裂に切り替わる分子機構、それに伴う減数分裂に特化した細胞周期の制御の本質については未だ多くの点が手付かずとされている。

そこで本研究は、高等動物における体細胞増殖から減数分裂への誘導および減数分裂を制御する細胞周期調節の分子機構を明らかにすることを目的とする。具体的には、(1)体細胞型から減数分裂型細胞周期への切り替えの制御、(2) 減数分裂型細胞周期の制御機構、(3) 減数分裂型の細胞周期調節によってもたらされる染色体構造の状態、3つの角度から研究を推進する。とりわけ Stra8 陽性細胞からの減数分裂誘導のマスター制御因子の同定、減数第一分裂の meiotic prophase における SCF および APC/c ユビキチンリガーゼ複合体の基質と調節サブユニットの解析、減数第一分裂における染色体因子の解明に焦点を絞って研究を行う。

研究経過

(1) 体細胞型から減数分裂型細胞周期への切り替えの制御

生殖細胞では減数分裂の進行に伴って、体細胞型から減数分裂仕様に特化された染色体の再構築や cell cycle の切替えが起きている。減数第一分裂に先駆けて、レチノイン酸に応答して Stra8 と呼ばれるタンパク質が一過的に発現することが知られるが、その素性や減数分裂誘導のメカニズム解明は未だ国際的にも攻め倦んでいる。とりわけ♂精原細胞や♀胎生期の始原生殖細胞集団のうち、Stra8陽性細胞は体細胞型から減数分裂型細胞周期へと切り替わる遷移状態にあると推測されるが、ある一時におけるその存在割合は細胞集団のごく一部でその数も多くはないことが研究遂行上のハードルであった。

そこで本研究では内在性の Stra8 遺伝子座に蛍光レポーターと精製用のタグを導入したノックインマウスを作製して、減数分裂にコミットとした生殖細胞集団より Stra8 タンパク質複合体の精製と MS 解析を行った。その結果、Stra8 と相互作用する新規の因子が同定された。Stra8 interacting protein1 (StIP1) と名付けた因子は hypothetical gene によってコードされる DNA 結合因子と推測されるが、雌雄ともに減数第一分裂の開始前と符合するタイミングで一過的に発現を示すことが判明した。さらに StIP1 を欠損させると、Stra8 タンパク質が雌雄ともに減数分裂への進行に障害が見られることが判明した。この StIP1 欠損下では、Stra8 タンパク質は核外に排出されたままであることが判明した。したがって StIP1 は Stra8 を核内に移行させる役割があることが示唆される。次に RNA-seq 法により、遺伝子発現解析を行ったところ StIP1 欠損マウス精巣では減数分裂に特異的な染色体構造因子(コヒーシンサブユニット、減数分裂組換え因子、シナプトネマ複合体)の多くが発現低下を示すことが判明した。これらのことより、StIP1 は Stra8 と協調して減数分裂の誘導に関連する遺伝子発現の転写制御をしていることが示唆された。

(2) 減数分裂型細胞周期の制御機構

減数第一分裂前期(meiotic prophase I)と呼ばれる時期は、通常の体細胞の細胞周期の G2 期に相当する。体細胞の場合、SCF および Anaphase promoting complex(APC/c) と呼ばれる 2 つの E3 ユビキチンリガーゼ複合体は細胞周期の進行に重要な基質を分解へと導くが知られている。我々の予備解析から、これらの E3 ユビキチンリガーゼ複合体を体細胞の培養細胞から精製してくると、それ

らの調節サブユニットや基質結サブユニットと共にユビキチン化の基質が会合してくることがわかっている。本研究では、先ず精製用の 3xFLAG-HA タグを Skp1 遺伝子座および APC2 遺伝子座の last coding exon に付加したノックインマウスを作製した。これらのノックインマウスの精巣から SCF および APC/c 複合体を精製した後、質量分析法により会合因子を同定した。現在、これらの会合因子の減数分裂における役割について検討を進めている。

(3) 減数分裂型の細胞周期調節によってもたらされる染色体構造の状態

近年近年 Hi-C 法を駆使した手法により、体細胞系列においてインスレータータンパク質 CTCF とコヒーシンが協調して Topologically Associated Domain(TAD) と呼ばれる高次クロマチンドメインを規定することが示されている。CTCF はクロマチンの境界領域を決定することにより、エンハンサーの効果を 1 つの独立したクロマチンドメイン内に制限するなど高次クロマチン構造レベルから遺伝子発現を制御する。一方、CTCF のパラログとされる BORIS/CTCF-Like(CTCFL) は精巣特異的に発現することが知られるが、その機能については先行研究が少ないため未だ不明な点が多い。我々は、減数分裂の誘導期における転写制御の解析の過程で、偶然 CTCF と BORIS/CTCF-Like が精巣内の異なるステージの細胞で相互排他的な発現パターンを示すことを見出した。興味深いことに、CTCF が体細胞系列で高発現しているのに対して、BORIS/CTCFL は減数分裂に進行する直前の分化型精原細胞→減数分裂初期の精母細胞で特異的かつ一過的に発現する。この発現時期は Stra8 タンパク質のそれとよく符合している。Stra8 陽性期は染色体構造に特異性が見られ始める pre-meiotic S 期の開始時期と符合する。とりわけ pre-meiotic S 期は減数分裂型コヒーシンが染色体上に検出される最初の時期であり、さらには減数分裂組換えの DSB を規定するプレ組換え複合体因子 Mei4, REC114 や相同染色体対合のセンサーとして働くことが目される HORMAD1, HORMAD2 が出現するなど、この時期には染色体の減数分裂仕様にに向けた大幅な再構成が行われているものと推測される。したがって、減数分裂の開始に伴い核内では CTCF→BORIS/CTCFL への置き換えによってクロマチンドメインの構造変換が起きている可能性が強く示唆される。CTCF と BORIS/CTCFL

はC末側の Zinc finger domainが高い相同性を示すのに対して、N末側のアミノ酸配列が大きく異なる。したがって、両者はターゲットとなるDNA結合配列を共通としながらも、CTCFとBORIS/CTCFLのN末側の違いが結合因子を変えることによりユニークな機能を発揮するものと推測される。そこで本研究では、CTCFとBORIS/CTCFLに特異的に結合する因子の違いを明らかにするためCTCFとBORIS/CTCFLを精製して相互作用する因子のMS解析での同定を進めている。この目的でBoris/CTCFL遺伝子座に精製を容易にするタグとGFPレポーターを導入したノックインマウスを作製した。このノックインマウスの精巣クロマチン画分から、タンパク質複合体を精製しMS分析による相互作用因子の同定を進めている。

考察

本研究により、マウスにおいて減数分裂の誘導機構が生殖細胞系列の分化とは遺伝学的に分離されること、さらにこのプロセスがStIP1-Stra8複合体によってトリガーされることが示唆される。本研究におけるStIP1 KO vs 野生型における精巣のtranscriptome解析から、StIP1欠損マウス精巣で発現低下を示す遺伝子には減数分裂に働く既知の遺伝子以外に、約200個の未解析のhypothetical geneが含まれることが判明している。これらには、減数分裂の進行に必要とされる未知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。これら未解析の遺伝子について、減数分裂の進行における機能を明らかにすることが課題となる。この新規の生殖細胞因子の同定は、 \square 年の懸案とされる減数分裂開始のメカニズム解明の突破口となることが期待される。

さらに、BORIS/CTCFLに特異的に相互作用する因子についてはノックアウトマウスを作製して表現型を解析することが次の大きな課題となる。最終的にはHi-C法によりBORIS/CTCFLによって規定される高次のクロマチン構造を明らかにする必要があるだろう。

本研究は我々が長年携わってきた減数分裂の染色体動態・染色体分配の研究を進展させ、減数分裂型の細胞周期制御と染色体構造の制御を総合的に理解することを目標としているが、染色体異数性疾患、不妊・不育のメカニズムにも大いに関連のある内容で、細胞周期研究と生殖細胞研究を結ぶ新たな分野

として医療への応用にも大きく資する可能性が高い。

研究の発表

口頭発表

1. 石黒啓一郎. マウスにおける減数分裂の開始機構. 基礎生物学研究所セミナー、1月31日、2018, 岡崎.
2. 石黒啓一郎. マウスにおける減数分裂開始機構. 平成29年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会特別講演、1月24日-25日、2018, 大津.
3. 石黒啓一郎. マウスにおける減数分裂開始・Cell cycle制御機構. 「配偶子幹細胞制御機構」第8回新学術領域会議、1月22日-24日、2018, 横浜.
4. Ishiguro, K. A novel nuclear factor plays a crucial role in initiation of meiosis. 第762回九州大学生医研セミナー(多階層生体防御システム研究拠点)、1月17日、2018, 福岡.
5. Ishiguro, K. A novel germ-cell specific factor responsible for initiation of meiosis. KEY FORUM 2018 Stem Cell Traits and Developmental Systems, 11-12 January, 2018, Kumamoto, Japan.
6. 石黒啓一郎. 新規の減数分裂開始因子の同定. 第35回染色体ワークショップ・第16回核ダイナミクス研究会合同開催、12月20日-22日、2017, 蒲郡.
7. 石黒啓一郎. マウス生殖細胞における減数分裂の開始機構. 性と生殖の懇談会、12月12日-13日、2017, 名古屋.
8. 石黒啓一郎. 新規の減数分裂誘導因子の同定. 2017年度生命科学系学会合同年次大会、12月6日-9日、2017, 神戸.
9. Ishiguro, K. Identification of a novel nuclear factor for initiation of meiosis. Symposium on Epigenome Dynamics and Regulation in Germ Cell, 21-22 November, 2017, Tsukuba, Japan.
10. Ishiguro, K. A novel STRA8 interacting factor plays a crucial role in initiation of meiosis. The 1965th NIG Biological seminar, 2 November, 2017, Mishima, Japan.

2016, つくば.

11. Ishiguro, K. A novel germ cell-specific factor responsible for initiation of mammalian meiosis. The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro, 26-28 July 2017, Fukuoka, Japan..
12. 石黒啓一郎. 新規の減数分裂開始因子の同定. モロシヌス研究会、6月23日-24日、2017、阿蘇.
13. 石黒啓一郎. 減数分裂誘導機構の解析. 3 領域合同若手勉強会 2017、6月7日-9日、2017、白浜.
14. Ishiguro, K. Cohesin plays crucial roles in chromosome dynamics in mammalian meiosis. IPR-seminar on chromosome dynamics and genome stability in mitosis and meiosis, 23 March, 2017, Osaka, Japan..
15. 石黒啓一郎. 減数分裂誘導因子 Stra8 相互作用因子の同定. 新学術領域研究「配偶子幹細胞制御機構」第7回領域会議、3月15日-17日、2017、東京.
16. 石黒啓一郎. 減数分裂型コヒーシンの生殖細胞ゲノムにおける役割. 第4回公開シンポジウム「生殖細胞のエピゲノムとその制御」、11月16日-17日、2016、三島.
17. 石黒啓一郎. 減数分裂における染色体動態と細胞周期制御. 新学術領域研究合同若手勉強会 2016、7月27日-29日、2016、別府.
18. 石黒啓一郎. 減数分裂における細胞周期制御と染色体動態. 新学術領域研究「配偶子幹細胞制御機構」第6回領域会議、9月28日-30日、

ポスター発表

1. Ishiguro, K. REC8 and RAD21L plays distinct roles in chromosome dynamics in mouse meiosis I. SMC proteins Meeting, 13-16 June 2017, Yamagata, Japan.
2. Ishiguro, K. A novel nuclear factor plays a crucial role in initiation of meiosis. CDB Symposium 2018 Dynamic Homeostasis: from Development to Aging, 26-28 March, 2018, Kobe, Japan.
3. 石黒啓一郎、Manuela Monti、秋山智彦、木村寛美、近澤奈々、迫田実希、佐藤紗恵子、Redi Carlo、洪繁、洪実. マウス Zscan4 は着床前胚および生殖細胞で発現する. 第39回日本分子生物学会年会、11月29日-12月2日、2016、横浜, Japan.

誌上発表

1. Ishiguro K, Nakatake Y, Chikazawa-Nohtomi N, imura H, Akiyama T, Oda M, Ko SBH, Ko MSH. Expression analysis of the endogenous Zscan4 locus and its coding proteins in mouse ES cells and preimplantation embryos. *In Vitro Cell Dev Biol-Anim* 53:179-190, 2017.
2. Ishiguro K, Monti M, Akiyama T, Kimura H, Chikazawa-Nohtomi N, Sakota M, Sato S, Redi CA, Ko SBH, Ko MSH. Zscan4 is expressed specifically during late meiotic prophase in both spermatogenesis and oogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol-Anim* 53:167-178, 2017.
3. Ishiguro K, Watanabe Y. The cohesin REC8 prevents illegitimate inter-sister synaptonemal complex. *EMBO rep* 17:783-784, 2016.