

43. 全能性の発現を支える卵特異的転写制御基盤の解明

長岡 創

奈良県立医科大学 医学部 発生再生医学講座

Key words : 生殖細胞, 減数分裂, 卵形成, 多能性幹細胞, 試験管内再構成

緒言

卵は次世代の個体発生能を担保する生命継承の担い手であり、その形成機構の異常は不妊や先天異常の原因となる。卵は発生初期に形成される始原生殖細胞 (Primordial Germ Cells : PGCs) を起源とし、形成時には生殖細胞の性は決まっていない。性決定を経て卵形成へとコミットした生殖細胞は、減数分裂による新たな遺伝的組み合わせの創出、母性エピゲノムの獲得、母性因子の蓄積を介して全能性を賦与する細胞形質を獲得する [1]。成体にて実現する卵機能は胎生期から段階的に獲得されていくが、胎生期生殖細胞の数量的リミット、ノックアウトマウス作製にかかる時間とコストなどの要因により、胎生期から断続的に進行する卵機能の獲得機序の多くが未だ不明瞭である [2]。伝統的に、哺乳類における卵形成機構の研究は主に生体マウスを用いた遺伝学的・発生工学的手法により進められてきたが、近年、多能性幹細胞を起点とした生殖細胞の試験管内誘導系が開発され、生殖細胞の発生・分化の分子機序の理解が急速に進んでいる [3]。報告者はマウス多能性幹細胞を起点とした生殖細胞誘導系を活用してこれまでに PGC から卵母細胞への運命決定を担うシグナル・転写機構を解明し、雌性性決定因子として転写因子 ZGLP1 を同定した [4, 5]。この研究にて、ZGLP1 の下流因子として卵形成のごく初期に発現を開始して卵機能獲得に寄与すると考えられる多数の転写因子群を同定した。*in vitro* 卵母細胞誘導系を用いて機能未知な転写因子の機能検証を行ったところ、ZGLP1 による雌性性決定直後から卵形成を構成する複数の機能モジュール (減数分裂期相同組換え形成、細胞周期、品質管理チェックポイント、レトロトランスポゾン制御、卵胞形成、母型エピゲノム構築) が連動して活性化されていることを示唆する結果を得ることができた。

方法および結果

1. 卵形成始動因子 ZGLP1 の同定と下流遺伝子の卵形成過程における発現動態

マウス PGC は胎生 6~7 日頃にエピプラスト後方部に出現し、胎生 10 日頃に性腺原基へと移動する。胎生 11 日頃から起こる生殖巣体細胞における性決定を経て、体細胞からのシグナルに応答して生殖細胞は性特異的な遺伝プログラムを開始する [6]。すなわち、卵巣においては卵母細胞へと分化し、精巣においては精子幹細胞への分化プログラムを開始する。我々は卵母細胞への運命決定には卵巣体細胞から産生される骨形成タンパク質 (Bone Morphogenetic Proteins : BMPs) とレチノイン酸 (Retinoic Acid : RA) が協調して働くことにより起こることを明らかにした [4]。そして、*in vitro* 生殖細胞誘導系を用いて BMP の下流因子の探索を行うべく、BMP2 添加 24 時間後にて発現上昇のある遺伝子群を RNA-seq を用いて同定した。転写因子に絞り検索し、生体胎仔マウス生殖細胞におけるトランスクリプトームデータも活用し、8 つの因子を雌性性決定候補遺伝子として選出した。8 つの候補遺伝子すべてを doxycycline 依存的に強制発現させられる ES 細胞株を作製し、それらを PGC まで分化させた細胞において、候補遺伝子の強制発現を行った。すると、遺伝子の強制発現により卵母細胞へと分化誘導でき、分化誘導能を有する因子が含まれていることが明らかになった。次に、誘導に用いる遺伝子発現ベクターを一つずつ減らし各ベクターの卵母細胞誘導能への寄与を検証したところ、*Zgfp1* 発現ベクターを除いた時だけ誘導能がなくなり、そして *Zgfp1* 発現ベクター単独でも卵母細胞への分化誘導ができることが明らかになった。一方で、レチノイン酸の添加のみでは減数分裂を伴う卵母細胞への分

化は起こらないが、レチノイン酸はZGLP1による分化誘導を促進させる効果をもち、レチノイン酸存在化では、90%以上のZGLP1発現細胞が卵母細胞へと分化することが明らかになった。ZGLP1強制発現細胞およびZglp1欠損細胞の遺伝子発現解析から、ZGLP1は減数分裂、RNA制御、クロマチン・転写制御、トランスポゾン抑制、卵胞形成、という、卵形成プログラムの基盤を構成する遺伝子群を活性化させることが明らかになった。一方で、レチノイン酸はZGLP1による遺伝子発現の活性化を成熟させる作用、そして、多能性因子の発現抑制を含むPGCプログラムの抑制化に寄与することが明らかになった。また、これらのZGLP1下流遺伝子の生体マウスにおける発現動態を検証したところ、(1)胎生期の卵母細胞のみで一過的に発現のある因子群、(2)生後、成体においても発現が維持または発現が上昇される因子群の2群に大別することができた(図1)。これらの結果はZGLP1による雌性性決定直後から、卵形成を構成する複数の機能モジュールが連動して活性化されていることを示唆している。

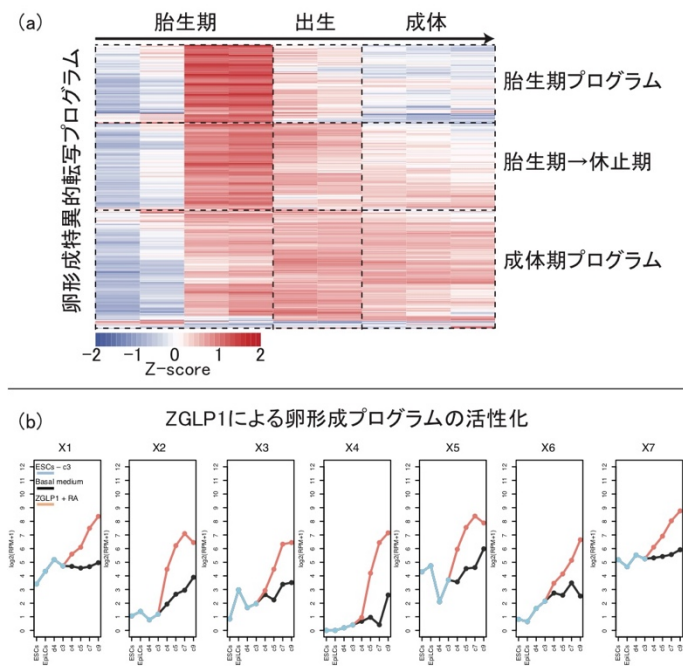


図1. 胎生期から始まる卵形成転写プログラム

転写因子ZGLP1の下流で制御される遺伝子群の発現動態を示す。

- ZGLP1の下流で制御される遺伝子群の生体マウス由来生殖細胞における発現動態を各遺伝子あたり標準化されたZ値に変換したheatmapで示す(Z値はカラースケールを参照)。胎生期:胎生9.5日から胎生15.5日齢マウスの始原生殖細胞および卵母細胞における発現。出生:生後0日、1日齢のマウス卵母細胞における発現。成体:成長段階の卵母細胞における発現。遺伝子はその卵母細胞分化過程における発現パターンによりクラスタリング(ward法)を行い並べている。クラスタリングに応じて胎生期プログラム、胎生期→休止期、成体期プログラム、の3つの大別されたグループに分けている。
- 試験管内誘導系を用いて性未分化なPGCにおいてZGLP1を強制発現させた細胞のRNA-seqを行い、機能未知な転写因子(因子X1~X7)の発現動態を示す。発現値はlog₂(RPM+1)。水色線はES細胞からPGC培養3日目(Doxycycline未添加)の細胞における発現。黒線はDoxycycline不添加条件下での培養3日目~9日目の生殖細胞における発現。赤線はDoxycyclineとRAを添加させた条件下での培養3日目~9日目の生殖細胞における発現。

2. *in vitro* 卵母細胞誘導系を用いた新規転写因子群の機能検証

新規に同定してきた遺伝子の機能を検証するために、卵巣体細胞との共培養系を用いた卵母細胞誘導系を用いてノックアウト ES 細胞由来生殖細胞の卵形成動態を解析した。まず、下流遺伝子の中から転写因子に注力し (図 2)、その中でも卵形成における機能が不明な 14 遺伝子に着目して、ノックアウト ES 細胞株を樹立した。着目した遺伝子の中には欠損マウスにおいては生殖系列以外の器官発生異常による胚性致死または生後致死をきたす遺伝子も含まれているが、それら遺伝子のノックアウト ES 細胞株は正常に樹立でき、PGC への誘導にも異常は観察されなかった。これは遺伝子欠損による胚性致死により表現型解析が難しかった遺伝子群の生殖系列における機能検証を行うために *in vitro* 誘導系が有用であることを示す結果である。PGC 形成以降の分化過程を卵母細胞試験管内誘導系にて解析したところ、表現型は大別して、(i) 性決定後の生殖細胞の早期喪失、(ii) 減数分裂進行の異常、(iii) 原始卵胞形成の阻害、(iv) 卵母細胞数の増加、という様々な異常を観察することができ、解析対象の遺伝子群には卵形成の様々な過程を制御する遺伝子が含まれていることが明らかになった。これは ZGLP1 による雌性性決定直後から卵形成を構成する複数の機能モジュール (減数分裂期相同組換え形成、細胞周期、品質管理チェックポイント、レトロトランスポゾン制御、卵胞形成・成長、母型エピゲノム構築) が連動して活性化されていることを示唆している。また、二次卵胞の形成までには顕著な表現型を示さない遺伝子もあり、*in vitro* 誘導系を用いた卵形成必須遺伝子のスクリーニングの有用性も確認できた。

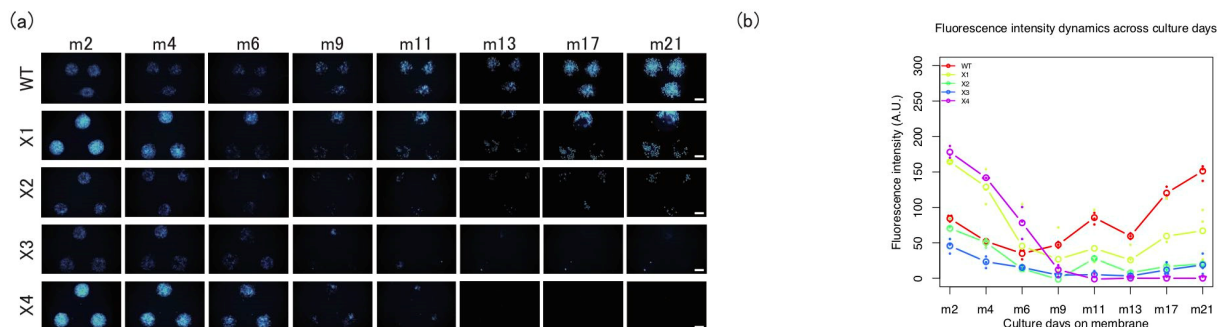


図 2. *in vitro* 卵母細胞誘導系を用いた新規転写因子の機能解析

ZGLP1 の下流遺伝子の中で機能未知の転写因子の遺伝子欠損 ES 細胞株を作製し、試験管内 PGC 誘導した。試験管内誘導した PGC を胎仔卵巣体細胞と共培養し、雌性性決定、減数分裂前期、二次卵胞ステージまでの卵母細胞分化誘導を行った。

- Blimp1-mVenus 陽性細胞を FACS で採取し、卵巣体細胞と再凝集塊を構成し (再構成卵巣)、2 日後にコラーゲン塗布したカルチャーインサート上で培養を開始。カルチャーインサート上での培養日数 2 日目 (m2) から 21 日目 (m21) まで観察。Stella-ECFP の蛍光動態を指標に卵母細胞の成長を観察した。WT は野生型 ES 細胞株由来の生殖細胞。X1~X4 は機能未知の転写因子の遺伝子欠損 ES 細胞株由来の生殖細胞 (スケールバー: 500 μ m)。
- (a) にて観察した Stella-ECFP の蛍光強度を数値化したグラフ。各遺伝子型あたり 3 つの再構成卵巣を観察した。各卵巣の蛍光数値は黒丸、3 つの平均値を白丸で表示。各タイムポイントあたりバックグラウンド蛍光値を差し引いた数値を表示。

考 察

本研究では、全能性を賦与する卵特異的な細胞形質の獲得機序を理解するべく、胎生期の生殖細胞性決定後から段階的に構築される卵特異的転写プログラムに着目して研究を進めた。多能性幹細胞を用いた卵母細胞の試験管内誘導系を用いて卵母細胞への運命決定を担う転写因子 ZGLP1 を同定し、その下流遺伝子は生殖細胞形成に関わる様々なプロセ

ス (減数分裂期相同組換え、レトロトランスポゾン抑制、転写・クロマチン制御、RNA 構造制御、卵胞形成、DNA メチル化) に関与している可能性が明らかになった。ZGLP1 の下流遺伝子は (1) 胎生期で一過的に発現のある遺伝子群と (2) 生後にまで発現が維持または上昇する遺伝子群に大別することができた。卵母細胞への運命決定直後から、胎生期で行われる減数分裂期相同組換えに関わるプログラム以外にも生後の卵母細胞成長に関わるプログラムも活性化されることは、核内・細胞質・細胞外で起こる各々の卵形成モジュールが連動して活性化され、一つの統一されたプログラムとして動いていると考えられる。同定してきた新規の遺伝子群の中から、卵形成初期に発現される転写因子に着目し、それらの遺伝子を欠損させ試験管内誘導系を用いて機能検証を行ったところ、(i) 性決定後の生殖細胞の早期喪失、(ii) 減数分裂進行の異常、(iii) 原始卵胞形成の阻害、(iv) 卵母細胞数の増加、などの様々な異常を誘発させることができた。これは、上述の「核内・細胞質・細胞外で起こる各々の卵形成モジュールが連動して活性化される」ことが正常な卵形成プロセスに非常に重要であることを示しており、ZGLP1 下流因子の統一的な制御が重要であることを示している。今後、遺伝子変異 ES 細胞を起点とした *in vitro* 卵母細胞誘導系を活用してゲノムワイドな遺伝子発現解析、また、ヒストン修飾の変遷を ChIP-seq により解析し、胎生期から構築される卵特異的な転写ネットワークの構築機序のさらなる解明を目指す。本研究にて着目した転写因子の中には、二次卵胞の形成までには顕著な表現型を示さない遺伝子もあるが、母型エピゲノムの構築など、卵形成自体には必須でなくとも次世代個体の正常な発生に必須のプロセスに関わっている可能性もあるため、それら遺伝子群に関しては、母型インプリントの獲得、卵子成熟、胚盤胞発生、個体発生、胎盤形成、などに着目して今後は解析を進める。

共同研究者・謝辞

本研究は主に奈良県立医科大学医学部発生・再生医学講座 (栗本一基教授) で行った。共同研究者は、特別研究員の高島友弥、教室職員の羅斯明、学部生の中前和である。この場を借りて深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Handel MA, Schimenti JC. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet.* 2010 Feb;11(2):124-36. Epub 2010 Jan6. PMID: 20051984 DOI: 10.1038/nrg2723
- 2) Handel MA, Eppig JJ, Schimenti JC. Applying “gold standards” to in-vitro-derived germ cells. *Cell.* 2014 Jun 5;157(6):1257-1261. PMID: 24906145 DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.019
- 3) Saitou M, Hayashi K. Mammalian in vitro gametogenesis. *Science.* 2021 Oct;374(6563):eaaz6830. Epub 2021 Oct 1. PMID: 34591639 DOI: 10.1126/science.aaz6830
- 4) Miyauchi H, Ohta H, Nagaoka S, Nakaki F, Sasaki K, Hayashi K, Yabuta Y, Nakamura T, Yamamoto T, Saitou M. Bone morphogenetic protein and retinoic acid synergistically specify female germ-cell fate in mice. *EMBO J.* 2017 Nov2;36(21):3100-3119. Epub 2017 Sep 19. PMID: 28928204 DOI: 10.15252/embj.201796875
- 5) Nagaoka SI, Nakaki F, Miyauchi H, Nosaka Y, Ohta H, Yabuta Y, Kurimoto K, Hayashi K, Nakamura T, Yamamoto T, Saitou M. ZGLP1 is a determinant for the oogenic fate in mice. *Science.* 2020 Mar 6;367(6482):eaaw4115. Epub 2020 Feb 13. PMID: 32054698 DOI: 10.1126/science.aaw4115
- 6) Nagaoka SI, Saitou M. Reconstitution of female germ cell fate determination and meiotic initiation in mammals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2017;82:213-222. Epub 2017 Dec 5. PMID: 29208639 DOI: 10.1101/sqb.2017.82.033803