

齋藤 通紀

京都大学 大学院医学研究科・教授

生殖系列におけるゲノムプログラミング機構の統合的解明とその応用

## § 1. 研究実施体制

### (1) 「齋藤」グループ

① 研究代表者: 齋藤 通紀 (京都大学、教授)

#### ② 研究項目

- ・EGFP-Blimp1 及び BirAT-Blimp1 ホモノックインマウス及び ES 細胞の樹立
- ・少数の細胞 (1000-10000 細胞) のエピゲノム状態の定量的測定技術の開発
- ・メス PGCLCs の誘導とそれによる発生能を有する卵子の形成
- ・ESCs から PGCLCs を誘導する過程におけるエピゲノム動態の決定
- ・EpiLCs に転写制御因子を発現誘導することによる PGCLCs 誘導能の検証

## § 2. 研究実施内容

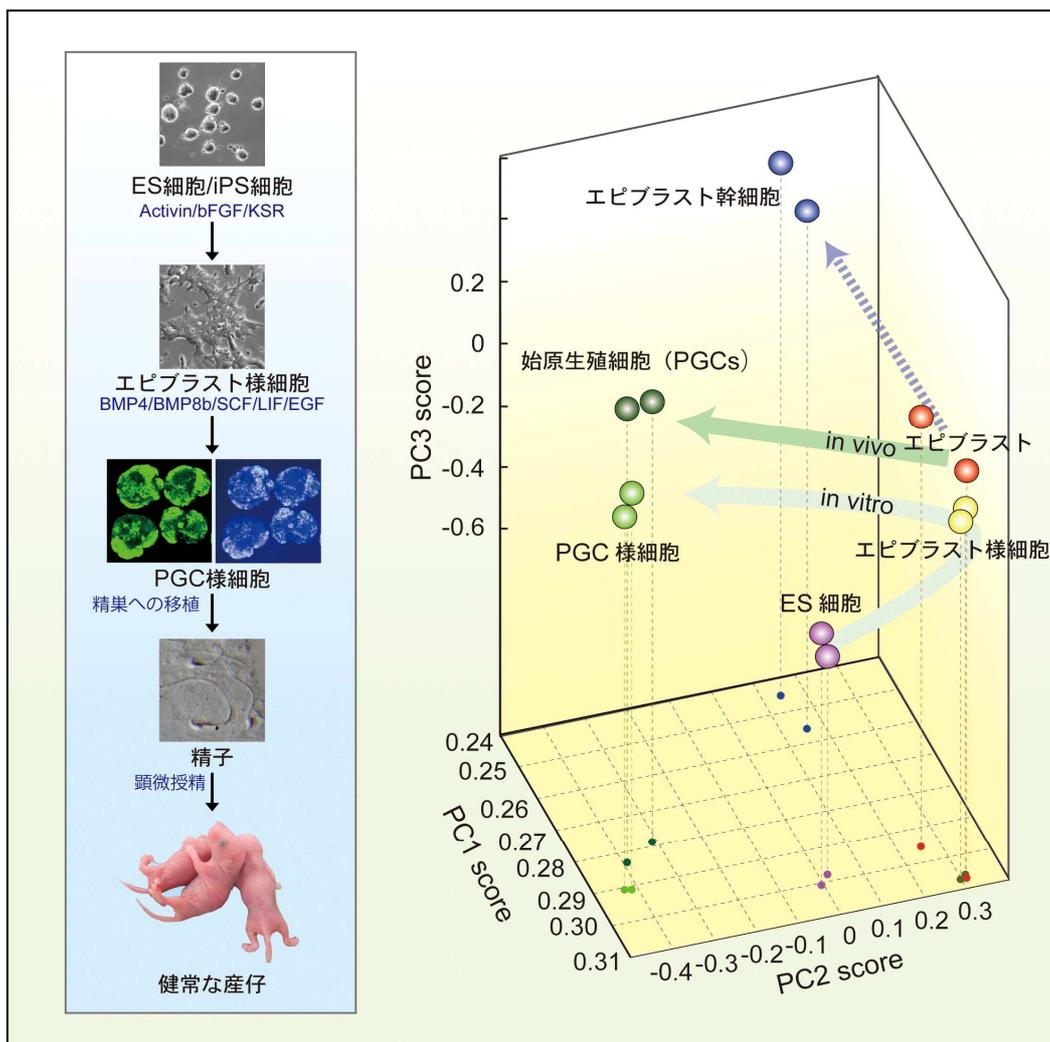
(文中に番号がある場合は (3-1) に対応する)

本研究では、目的達成に相補的な2つの研究を同時に推進する。第一の研究は、1-1) 少数細胞 (〜1000-10000 細胞) のエピゲノム状態を ChIP-Seq. により定量的に測定する技術-微量エピゲノム測定法-を開発し、それに基づき、1-2) 生殖細胞形成・維持過程に伴う様々なヒストン修飾状態を測定する、1-3) 生殖細胞形成・維持過程に伴う Blimp1 及び Oct3/4 のゲノム上の結合配列を同定する。第二の研究は、2-1) Blimp1 や Prdm14 などの生殖細胞形成に必須な因子を胚体外胚葉様細胞に発現誘導することにより、生殖細胞形成過程を再現する、2-2) 再現された過程における Blimp1 や Prdm14 の機能を詳細に解析する。第一第二の研究成果を総合することで、生殖細胞の発生過程で起こるゲノムプログラミングの本態を高い解像度で解明し、それを引き起こすに必要な十分な分子機構を同定する。

一方、我々は、ESCs/iPSCs から胚体外胚葉様細胞 (epiblast-like cells: EpiLCs) を経て始原生殖細胞様細胞 (primordial germ cell-like cells: PGCLCs) を誘導することに成功した。PGCLCs は、生殖細胞を欠損する *W/W<sup>v</sup>* マウスの新生仔精巣に移植することで精子に分化し、得られた精

子は、卵子と顕微授精させることで、健全な子孫に貢献した<sup>2)</sup>(図1)。本研究により、初めて、マウス生殖細胞形成過程の試験管内再構成が可能となった。本実験系を用いて、ESCs、EpiLCs、PGCLCs(それぞれ $10^6$ 細胞)におけるヒストン就職及びDNAメチル化、DNAヒドロキシメチル化の動態を解析中である。

またこれら実験と平行し、初期胚とPGCsにおけるエピゲノムリプログラミングに関する総説(査読付き)を執筆し[Saitou, M., Kagiwada, S., and Kurimoto, K. (2012). Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development*, 139, 15–31.], また生殖細胞発生過程の様々な段階でCre recombinaseによる遺伝子組み換えを薬剤依存的に誘導出来るマウスを作成、それに関する論文を発表した<sup>1)</sup>。



(図1)ES細胞/iPS細胞からエピブラスト様細胞を介したPGC様細胞の誘導。

無血清、フィーダー細胞を用いない状態で培養したES細胞/iPS細胞をActivin, bFGF, KSR存在下でエピブラスト様細胞に誘導、エピブラスト様細胞は、BMP4, BMP8b, SCF, LIF, EGF存在下で凝集塊として浮遊培養すると、PGC様細胞に分化した。得られたPGC様細胞を、生殖細胞を欠損する新生仔マウスの精巣に移植すると健全な精子に分化し、それらは卵子と顕微授精させることで、健全な子孫に貢献した<sup>2)</sup>。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Hirota, T., Ohta, H., Shigeta, M., Niwa, H., and Saitou, M., "Drug-inducible gene recombination by the *Dppa3-MER Cre MER* transgene in the developmental cycle of the germ cell lineage in mice", *Biology of Reproduction*, 85, 367-377, 2011  
(DOI:10.1095/biolreprod.110.090662)
2. Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., and Saitou, M., "Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells", *Cell*, 146, 519-532, 2011, (DOI:10.1016/j.cell.2011.06.052)

#### (3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)