

「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制御等の医療基盤技術」
平成 21 年度採択研究代表者

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. 研究実施の概要

本研究では、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、それを引き起こす必要十分な分子機構を同定する。この目的を達成するため、微量エピゲノム測定法を開発し、始原生殖細胞におけるヒストン修飾、必須転写制御因子 **Blimp1** 及び **Oct4** のゲノムワイドな結合部位の同定、誘導エピブラスト様細胞に **Blimp1** や **Prdm14** などの転写制御因子を発現しそれら因子の始原生殖細胞様細胞誘導機構を詳細に検証する。

本年度の研究では、これら研究を遂行する上で必須の実験材料となる、**Oct4-EGFP** (理化学研究所丹羽プロジェクトリーダー御供与) 及び **Oct4-BirA** ノックイン ES 細胞及びそれらの生殖系列キメラマウス、**EGFP-Blimp1** 及び **BirA-Blimp1** ノックイン ES 細胞及びそれらの生殖系列キメラマウス、生殖細胞マーカーを有し薬剤依存的な遺伝子発現を可能とする ES 細胞株 **BVSC**; **ROSA26::rtTA** もしくは **P14V**; **ROSA26::rtTA** ES 細胞を樹立した。またエピブラスト様細胞を誘導する条件検討を行った。

今後これら実験材料を用いて微量エピゲノム測定法の開発、**Blimp1** や **Prdm14** などの転写制御因子の作用機構解析を正確に遂行して行くことが重要となる。

§ 2. 研究実施体制

(1) 「齋藤」グループ

- ① 研究分担グループ長: 齋藤 通紀 (京都大学、教授)
- ② 研究項目
 - ・ PGC レポーターを有する転写制御因子発現誘導 ES 細胞の樹立

- ・転写制御因子によるエピプラスト様細胞の PGCs への誘導

(2)「栗本」グループ

① 研究分担グループ長:栗本 一基((独)理化学研究所、基礎科学特別研究員)

② 研究項目

- ・ Oct4-EGFP 及び Oct4-BirA, EGFP-Blimp1 及び BirA-Blimp1 ノックイン ES 細胞の樹立
- ・ ホモノックインマウスの樹立と微量エピゲノム測定法の開発

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)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)少数の細胞(~1000細胞)のエピゲノム状態を ChIP-Chip/Seq.により定量的に測定する技術を開発し、それに基づいて、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多能性幹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リ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。これら2つの研究目的を達成するため、本年度はそれぞれの研究推進に必要な実験材料を準備することが重要な目標となった。

第一の研究1-1)における、少数細胞からの ChIP-Chip/Seq.技術開発の材料として、「ES 細胞における Oct3/4 の結合部位及び代表的なヒストン修飾については、すでに十分な知見が蓄積しているので、10⁷ 個の細胞をポジティブコントロールとし、細胞数を段階的に減らしていった際にゲノム DNA のプロファイルが保たれるプロトコルを確立し、ChIP 法の最適化を行うことが出来る」という論理に基づき、タグ付き Oct3/4 をノックインした ES 細胞を作成した。具体的には、Oct3/4-EGFP ノックイン ES 細胞(理化学研究所の丹羽プロジェクトリーダーより供与)、Oct3/4-BirAT ノックイン ES 細胞を作成した。現在それらを用いてキメラマウスを作成中であり、Oct3/4-EGFP ノックイン ES 細胞に関しては生殖系列キメラを得た。さらに、生殖細胞形成・維持過程に伴う Blimp1 のゲノム上の結合配列を同定するため、EGFP-Blimp1 及び BirAT-Blimp1 ノックイン ES 細胞を作成した。同様に現在それらを用いてキメラマウスを作成中であり、また実際に EGFP-Blimp1 が正しく発現するかを ES 細胞を用いた培養系で検証しつつある。

また微量エピゲノム測定法開発の第一段階として、sonication により剪断したゲノム断片を~1000 細胞レベルに希釈し定量的に増幅する技術開発を開始した。

第2の研究2-1)を達成するため、Blimp1 や Prdm14 の発現を誘導でき、かつ PGC マーカー[Blimp1-mVenus:stella-ECFP(BVSC)ダブルレポーター及び Prdm14-mVenus(P14V)レポーター]を有する ES 細胞を樹立する。誘導システムとしては、tetracyclin 発現誘導システムを試みる[doxycyclin(tetracyclin)依存的に標的遺伝子の発現を活性化する M2-rtTA を発現する ROSA26::rtTA システム(Hochedlinger K., Yamada Y., et al., 2005, Cell)].それぞれのマウ

スを交配しその blastocysts から BVSC; ROSA26::rtTA もしくは P14V; ROSA26::rtTA ES 細胞を樹立した。

またこれら実験と平行し、Blimp1 及び Prdm14 の作用でその発現が誘導され、PGCs の生存に必須な因子 Nanos3 の発現及び局在を再現するトランスジェニックマウス(Nanos3-EGFP マウス)を作成し、それらから ES 細胞を樹立¹⁾、また生殖細胞形成機構に関する総説を執筆した。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Yamaji, M., Tanaka, T., Shigeta, M., Chuma, S., Saga, Y., and Saitou, M. (2010). Functional reconstruction of Nanos3 expression in the germ cell lineage by a novel transgenic reporter reveals distinct subcellular localizations of Nanos3. *Reproduction*, 139, 381-393. DOI: 10.1530/REP-09-0373