

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、誘導胚体外胚葉様細胞に **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。

本年度までの研究で、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** ノックイン胚性幹細胞 (**Embryonic Stem Cells: ESCs**)、**EGFP-Blimp1** 及び **BirA-Blimp1** ノックイン **ESCs** 及びそれらに由来するホモマウスの樹立、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 **ESC** 株、**BVSC; ROSA26::rtTA** もしくは **P14V; ROSA26::rtTA ESCs** を樹立した。

また、**ESCs** を **E5.5~6.0** の胚体外胚葉様細胞 (**EpiBL-like cells (EpiLCs)**) に誘導し、そこから始原生殖細胞 (**Primordial Germ Cells: PGCs**) 様細胞 (**PGC-like cells: PGCLCs**) を誘導することに成功した。誘導した **PGCLCs** は、そのグローバルな遺伝子発現、エピゲノム修飾、細胞動態すべての点において **PGC (E8.5~E9.5)** と非常に似ており、また生殖細胞を欠損する **W/W<sup>o</sup>** マウスの新生児精巣に移植すると精子形成を起こし、形成された精子は健常で **fertile** な子孫形成に寄与した (**Hayashi et al., in revision**)。本方法の開発により、 $10^5\sim 10^6$  の **PGCLCs** を比較的容易に得ることが可能となった。

今後これら実験材料及び方法論を用いて、微量エピゲノム測定法の開発、メス **ESCs** の安定増殖、メス **PGCLCs** の誘導とそれによる正常発能を有する卵子の形成、**Blimp1** や **Prdm14** などの転写制御因子の作用機構解析、**PGCs** におけるゲノムプログラミングの本態解明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)「斎藤」グループ

① 研究分担グループ長: 斎藤 通紀(京都大学、教授)

### ② 研究項目

- ・ メス ESCs の安定増殖、メス PGCLCs の誘導と正常発生能を有する卵子の形成
- ・ PGC レポーターを有する転写制御因子発現誘導 ESCs の樹立
- ・ 転写制御因子による EpiLCs の PGCLCs への誘導
- ・ Oct4-EGFP/BirA ノックイン ES 細胞、EGFP/BirA-Blimp1 ノックイン ESCs/マウスの樹立
- ・ 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胚体外胚葉様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、昨年度までの研究でそれぞれの研究推進に必須な実験材料の準備し、また実際の研究を行った。

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、 $10^7$  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、Oct3/4-EGFP (理化学研究所の丹羽博士よりご供与)及び Oct3/4-BirAT ノックイン胚性幹細胞(Embryonic Stem Cells:ESCs)の作成、EGFP-Blimp1 及び BirAT-Blimp1 ノックイン ESCs 及びマウスの樹立を行った。

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。ChIP DNA の増幅に適した DNA の断片化の条件や、担体への非特異的吸着を抑制するキャリアの検討を行い、予備的ながら、 $10^4$ ~ $10^5$  個の細胞から ChIP を行い回収したゲノム DNA 断片を PCR により増幅可能であるという結果を得た。増幅法の改善により、より少数細胞からの ChIP 解析の実現を目指す。

第2の研究においては、2-1)を達成するため、Blimp1 や Prdm14 の発現を doxycyclin(tetracyclin)依存的に誘導可能かつ PGC マーカーを有する ESCs、BVSC

(Blimp1-mVenus : stella-ECFP) ; ROSA26::rtTA 及び P14V (Prdm14-mVenus) ; ROSA26::rtTA ESCs を樹立した。また、ESCs を E5.5~6.0 の胚体外胚葉様細胞 (Epiblast-like cells (EpiLCs)) に誘導し、そこから始原生殖細胞 (Primordial Germ Cells: PGCs) 様細胞 (PGC-like cells: PGCLCs) を誘導することに成功した。EpiLCs は E5.75 のエピブラストと非常に類似したグローバルな遺伝子発現を示した。誘導した PGCLCs は、そのグローバルな遺伝子発現、エピゲノム修飾、細胞動態 (主に細胞周期の G2 期で増殖停止する) すべての点において PGC (E8.5~E9.5) と非常に似ており、また生殖細胞を欠損する *W<sup>W</sup>* マウスの新生児精巣に移植すると精子形成を起し、形成された精子は健常で fertile な子孫形成に寄与した。さらに Blimp1 -mVenus などのトランスジーンに依存しない PGCs の選別法の開発し、BVSCトランスジーンを有さない ESCs 及び iPSCs から PGCLCs を誘導し、それらから *W<sup>W</sup>* マウスへの移植により精子及び健常な子孫を得ることに成功した (Hayashi et al., in revision)。本方法の開発により、 $10^5 \sim 10^6$  の PGCLCs を比較的容易に得ることが可能となり、これらの細胞を用いて、第一の研究で目的とする 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の測定する、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の同定、を行うことも可能となった。

一方で ESC 株がインプリント遺伝子のメチル化の消去等の現象を起こすことがわかったので継代回数依存的な ESC のメチル化の変化を系統的に検証するため、多くの雌雄 ESC 株を樹立した。

またこれら実験と平行し、少数細胞からの cDNA の定量的増幅に関する総説 (査読付き) を執筆し<sup>1)</sup>、PGC 形成過程で発現を開始し特に精子形成過程で顕著な発現を示す遺伝子 *Tdrd5* を同定したので、その詳細な発現・局在・機能解析を行った論文を発表した<sup>2)</sup>。

## §4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ● 論文詳細情報

1. Kurimoto, K., and Saitou, M. (2010). Single-cell cDNA microarray profiling of complex biological processes of differentiation. *Current Opinion in Genetics and Development*, 20, 470-477, 2010 (DOI: 10.1016/j.gde.2010.06.003).
2. Yabuta, Y., Ohta, H., Abe, T., Kurimoro, K., Chuma, S., and Saitou, M. TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly and spermiogenesis in mice. *The Journal of Cell Biology*, 192, 781-795.

### (4-2) 知財出願

- ① 平成22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)