

「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」
平成25年度採択研究代表者

H25 年度
実績報告

松居 靖久

東北大学
教授

世代継承を担うエピゲノム制御の解明

§ 1. 研究実施体制

(1)「松居」グループ

- ① 研究代表者:松居 靖久 (東北大学加齢医学研究所、教授)
- ② 研究項目
 1. 生殖細胞のエピゲノム・リプログラミングの生理的意義の解明
 2. 加齢マウス生殖細胞におけるエピゲノム修飾の解析
 3. 多能性幹細胞と生殖細胞を隔てているエピゲノム制御の解明

(2)「河野」グループ

- ① 主たる共同研究者:河野 友宏 (東京農業大学応用生物化学部、教授)
小林 久人 (東京農業大学総合研究所、准教授)
- ② 研究項目
 1. PBAT (post-bisulfite adapter tagging) 法による DNA メチローム 解析
 2. ChIP-Seq 法によるヒストン修飾解析の解析
 3. RNA-Seq 法によるトランスクリプトーム解析
 4. 加齢マウス生殖細胞におけるエピゲノム修飾の解析

§ 2. 研究実施の概要

世代継承を担う生殖細胞が、正常な個体発生能を獲得する分子機構は、生物学的に重要な問題であるが未知の部分が多い。本研究課題では生殖細胞の正常な世代継承能力を担うエピゲノム制御を解明することを目標とする。

具体的には、マウス胎仔期に始原生殖細胞 (PGC) で起こる、大規模なエピゲノム変化を制御するヒストン修飾関連分子を同定し、それらの世代継承能の獲得における役割を明らかにする。また、より分化の進んだ精子形成細胞を使って、次世代個体の正常な発達を保證する生殖細胞エピゲノムを明らかにする。そのために、加齢に伴い精子でおこるエピゲノム変化を解析し、加齢により生殖細胞で起こるエピ変異候補を同定する。さらに生殖細胞と多能性幹細胞を隔てているエピゲノム障壁を明らかにし、それをもとに分化多能性を発生全能性に直接的に向かわせるエピジェネティック機構を解明する。また、これらの研究に必要となる、少数の細胞によるエピゲノム解析系を確立する。

平成25年度は、まず PGC で起こるエピゲノム変化を制御するヒストン修飾関連分子の同定に関して、培養下で ES 細胞から PGC-like cell (PGCLC) を誘導する際に遺伝子をノックダウンする実験系の確立を行い、siRNA をリポフェクションで PGCLC に導入することでノックダウンが可能であることがわかった。また PGCLC の誘導効率を、細胞イメージアナライザを用いて定量的に評価するアッセイ系を構築した。また、加齢精子のサンプリングを開始した。一方、これまでの研究で、ES 細胞で転写因子 Max をノックダウンすると、生殖細胞関連遺伝子が短時間で、かつ高い効率で誘導されることが明らかになっている。この Max ノックダウン(Max-KD)ES 細胞を、配偶子への分化能をもつ細胞へ変換する目的で、この細胞と PGC のトランスクリプトームおよびエピゲノム解析の結果をもとにパスウェイ解析等を行う。その結果をもとに、Max-KD 細胞と PGC で顕著に異なる分子経路を同定し、違いを修正する操作を行う。平成25年度は、培養条件の操作により、Max-KD 細胞の一部が減数分裂を起こすことが明らかになった。また、エピゲノム解析に必要な細胞のサンプリングを開始した。

さらに、微量サンプルからのエピゲノム解析技術の確立・最適化を行う。まず包括的 DNA メチル化解析 (DNA メチローム) 法として、Post-Bisulfite Adaptor Tagging (PBAT) 法で調整した DNA ライブラリーを、少数サイクル PCR によって増幅することを試み、50 細胞からのライブラリー調整に成功した。またアジレント・テクノロジーから試供されている SureSelect Methyl-seq Kit を使用したターゲットメチローム解析の改良を試み、良好な結果を得ている。さらに ChIP-Seq 法によるヒストン修飾の網羅的解析では、H3K4me1, H3K4me3, H3K4me2, H3K9me2, H3K27me3 ならびに H3K36me3 抗体 を用いて、10⁵ 個の ES 細胞を初期サンプルとして実験を行い、諸条件の設定を進め、おおむね適切な領域を検出可能であることが確認できた。また、H3K4me3 抗体を用いた ChIP-Seq では 10⁴ 細胞を用いた解析でも良好な成績を得ている。さらに、単一細胞を用いたトランスクリプトーム解析を実施するために C1™ Single-Cell Auto Prep System (Fluidigm 社)を導入し、解析準備を整えた。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国際)

1 Leitch, H.G., Okamura, D., Durcova-Hills, G., Stewart, C.L., Gardner, R.L., Matsui, Y., Papaioannou, V.E. On the fate of primordial germ cells injected into early mouse embryos. *Developmental Biology* 385, 155-159, 2014 (DOI:10.1016/j.ydbio.2013.11.014)