

「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

H26 年度  
実績報告書

松居 靖久

東北大学 加齢医学研究所  
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(研究機関別)

- 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(研究機関別)

- 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生殖細胞 DNA メチル化解析

## § 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、生物学的にだけでなく医学的にも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、マウス胎仔期の始原生殖細胞 (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な、少数の細胞によるエピゲノム解析系を確立する。

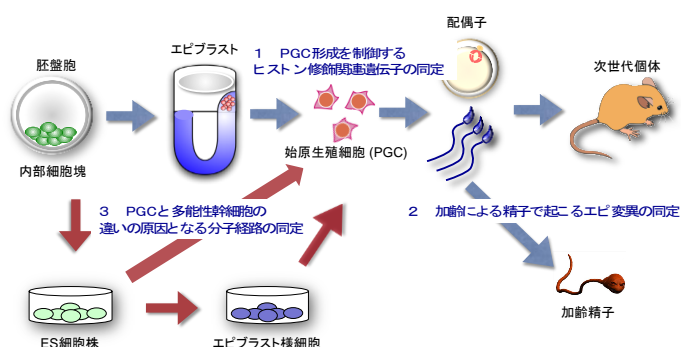


図1 本研究で推進する3つのポイント

平成26年度は、まずマウス胎仔期の始原生殖細胞 (PGC) で起こる、大規模なエピゲノム変化の生殖細胞形成における役割を解明するために、それを制御するヒストン修飾関連分子候補を RNAi スクリーニングにより同定した。培養下で ES 細胞から PGC-like cell (PGCLC) を誘導する際に、ヒストン修飾に係わる 200 種類あまりの遺伝子を、それらの siRNA をリポフェクションで導入することでノックダウンした。次に PGC マーカーの *Blimp1-venus* の発現の程度を、細胞イメージアナライザーを用いて定量的に評価し、ノックダウンにより発現が変化するものを候補遺伝子として選択した。その結果、PGC 分化を促進または抑制する可能性のある、23 種類の候補遺伝子を選択した。

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群が短時間で、かつ高い効率で誘導されるが、生殖細胞としての性質を持つには至っていない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メチロームを比較し、両者で異なる遺伝子発現に関与する可能性のある複数の分子経路候補を同定した。

また Chip-Seq 法によるヒストン修飾解析、PBAT 法およびターゲットメチローム解析法による DNA メチローム解析、および RNA-Seq 法によるトランスクリプトーム解析の至適化を進め、おおむね満足する方法を確立できた。そこで、実際に初期胚、雌雄始原生殖細胞および ES 細胞から Max-KD により誘導された PGCLC におけるメチローム情報の取得を進めた。また、加齢雄マウスから精子サンプルを回収し、ターゲットメチローム解析法でライブラリー作製を完了した。さらに、 $C_1^{\text{TM}}$  Single-Cell Auto Prep System (Fluidigm 社)を用いた PGC の単一細胞を用いたトランスクリプトーム解析を検討した。

本年度の代表的な論文

Matsui, Y., Takehara, A., Tokitake, Y., Ikeda, M., Obara, Y., Morita-Fujimura, Y., Kimura, T., and Nakano, T. The majority of early primordial germ cells acquire pluripotency by Akt activation. *Development* 141, 4457-4467, 2014 (doi:10.1242/dev.113779) (IF: 6.3)

Yamaguchi, Y. L., Satomi S. Tanaka, S. S., Kumagai, M, Yuka Fujimoto, Y., Terabayashi, T., Matsui, Y. and Nishinakamura, Y. Sall4 is essential for mouse primordial germ cell specification by suppressing somatic cell program genes. *Stem Cells* 33, 289-300, 2015, (doi:10.1002/stem.1853) (IF: 7.1)

Akihito Sakashita, Hisato Kobayashi, Takuya Wakai, Yuusuke Sotomaru, Kenichiro Hata, Tomohiro Kono. Dynamics of genomic 5-hydroxymethylcytosine during mouse oocyte growth. *Genes to Cells*. vol.19, No. 8, pp629-636, 2014 (Doi: 10.1111/gtc.12164) (IF: 2.9)