

自己評価報告書

平成23年 4月 1日現在

機関番号：11301

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20062001

研究課題名（和文）始原生殖細胞の分化運命決定を制御する遺伝子ネットワーク

研究課題名（英文）Gene networks regulating development of primordial germ cells

研究代表者

松居 靖久 (YASUHISA MATSUI)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：40241575

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：始原生殖細胞、エピジェネティクス、遺伝子改変マウス、ES細胞、siRNA、DNAメチル化、転写制御、Vasa

1. 研究計画の概要

生殖細胞は個体発能を發揮できる唯一の細胞で、こういった性質を支える分子基盤を解明することは、基礎生物学的な大きな興味であるとともに、医学、農学等の様々な分野での応用の可能性を拓く。生殖細胞の特性を理解する上でもっとも重要なアプローチの一つとして、この細胞が胚発生過程の初期段階で体細胞と分岐して分化運命の決定を受け、さらに配偶子に向かって分化するメカニズムが挙げられる。始原生殖細胞(PGC)形成には従来同定されている分子に加えて、様々な分子カスケードが同時に作用することが予想され、PGCの形成・分化を制御する分子機構の全体像を解明するためには、多角的な戦略による制御分子の同定が必要である。そこで、以下の3つの研究を計画した。(1) ES細胞を用いたsiRNAライブラリースクリーニングにより、機能阻害によりPGCへの分化が誘導される遺伝子を同定する。さらにES細胞及びiPS細胞のin vitro PGC分化培養系から、各分化段階の特徴を示すPGC株を樹立し、それらの細胞特性の分子的解明を行う。

(2) PGCの分化決定時に発現が誘導される遺伝子を、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーションによりスクリーニングし、遺伝子改変マウスを作成して機能解析を行う。

(3) 形成期からPGCで特異的に発現する*mil-1*を含む、いくつかのPGC特異的な遺伝子の発現制御領域には200bpほどの保存配列が存在することに着目し、この領域のDNAの脱メチル化が特異的な発現誘導に関わる可能性を明らかにする。

2. 研究の進捗状況

(1) ES細胞にsiRNAライブラリーを導入するスクリーニングで、生殖細胞特異的遺伝子の発現上昇を起こす5種類の遺伝子を同定した。さらにこれまでに一部の候補遺伝子について、ES細胞でのノックダウンにより得た細胞を、精子形成細胞が欠損したマウスの精巣に移植することにより精子形成が認められ、精子への分化能を持つPGCであることが確認された。これらの結果から、多能性幹細胞からPGCが分化決定される過程に阻害的に働く、新たな分子経路が存在することが示唆された。またES細胞及びiPS細胞のin vitro PGC分化培養系により、各分化段階の特徴を示すPGC株を樹立し、それらの細胞特性の分子的解明を行った。(2) 分化運命決定前後のPGCを使ったディファレンシャル・スクリーニングにより、分化決定時に発現が誘導されるPGC発生制御因子遺伝子候補として2種類の遺伝子を同定した。次にそれらのノックアウトマウスを作成したところ、いずれにおいても、移動期から胎仔生殖巣内に定着した時期のPGC数が正常マウスに比べて有為に減少していることが明らかになった。そのうちの一つの遺伝子のノックアウトマウスについては、PGCの細胞増殖は影響を受けていないが、細胞死が顕著に亢進することが明らかになり、この遺伝子が発生過程のPGCの生死の制御に重要な役割を果たしていることがわかった。(3) *mil-1*の発現制御領域の、PGCにおけるDNAメチル化状態を調べ、分化決定に伴い脱メチル化が起こることを見いだした。さらに*mil-1*や*Blimp1*などのPGC特異的遺伝子の発現制御領域には、SINE配列に類似した保存配列が見られ、PGCの分化決定時にはこれらの遺伝子の保存配列に含まれる

部位の脱メチル化が、共通して起こることがわかった。これらの結果から、PGCの分化運命決定時に起こる特異的な遺伝子発現には、保存配列を始めとした制御領域のDNAの脱メチル化が関与する機構が働いている可能性が示唆された。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由) 3つの研究計画のそれぞれについて、いずれも進捗は順調でデータが蓄積しており、本研究計画の目的を研究期間内に達成できると考える。

4. 今後の研究の推進方策

3つの研究計画のいずれも、現在、研究の最終段階に入っているため、より詳細な分子機構を示すためのデータを得ることに力を入れる。(1) ES細胞を用いた実験では候補遺伝子産物と相互作用するタンパク質を同定する。(2) ノックアウトマウスによる遺伝子機能解析では、候補遺伝子産物の標的となる分子の同定に力を入れる。(3) DNAメチル化による制御に関しては、制御に関わるタンパク質を同定することにより分子機構を解明する。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (17件)

1. Imamura, M., Aoi, T., Tokumasu, A., Mise, N., Abe, K., Yamanaka, S., and Noce, T. Induction of germ cell marker genes during differentiation of mouse induced pluripotent stem cells derived from adult hepatocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 77, 802-811 (2010).
2. Matsui, Y., and Tokitake, Y. Primordial germ cells contain subpopulations that have greater ability to develop into pluripotential stem cells. *Dev. Growth Differ.* 51, 657-667 (2009).
3. Morita-Fujimura, Y., Tokitake, Y., and Matsui, Y. Heterogeneity of mouse primordial germ cells reflecting the distinct status of their differentiation, proliferation and apoptosis can be classified by the expression of cell surface proteins integrin $\alpha 6$ and c-Kit. *Dev. Growth Differ.* 51, 567-584 (2009).
4. Sasaki, H. and Matsui, Y. Epigenetic events in mammalian germ cell development: reprogramming and beyond. *Nature Rev. Genet.* 9, 129-140 (2008).
5. Okamura, D., Tokitake, Y., Niwa, H., and Matsui, Y. Requirement of Oct3/4 for germ cell specification. *Dev. Biol.* 317, 576-584 (2008)

[学会発表] (計36件)

1. 松居靖久「マウス始原生殖細胞の分化運命決定を制御する分子メカニズム」第51回日本哺乳動物卵子学会、シンポジウム「生殖巣内細胞の性質とその応用」、新潟、平成22年5月29日
2. K. Mochizuki and Y. Matsui. DNA demethylation regulates primordial germ cell-specific gene expression in mouse. 2010 Cold Spring Harbor Asia Conference 'Epigenetics, Chromatin & Transcription'. Dushu Lake, China, May 17-21, 2010.
3. 野瀬俊明「マウスES細胞とiPS細胞からの生殖細胞の造成」日本生殖再生医学会2010年2月21日、東京
4. Y. Matsui and Y. Tokitake. Primordial germ cells contain subpopulations that have greater ability to develop into pluripotential stem cells. XXXVI International Congress of Physiological Sciences. Kyoto, Japan, July 27-August 1, 2009.
5. Y. Matsui. Epigenetic control of primordial germ cell-specific gene expression. XX North American testis Workshop 'Testicular function: Levels of Regulation', Philadelphia, USA, April 1-4, 2009.