

平成 30 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07071

研究課題名(和文) 尾索動物種を用いた生殖細胞系列における転写制御機構の解析

研究課題名(英文) Mechanisms of transcriptional regulation in the germline of primitive chordate species

研究代表者

熊野 岳 (Kumano, Gaku)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：80372605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞は全能性を維持するために発生過程において体細胞と分離し続けなければならない。そのためには体細胞を作る遺伝子発現を抑制しつつ、生殖細胞を作る遺伝子をONにするなど、遺伝子発現の調節を厳密に行わなければならない。本研究では、マボヤを用いて、卵に既に存在し、生殖細胞を作る細胞系列に受け継がれる3つの因子が、この遺伝子発現調節に関わることを明らかにした。さらに、マボヤの近縁種であるユウレイボヤ、ワカレオタマボヤを用いた解析により、この遺伝子発現調節機構が、例え系統的に近い種間においても、異なることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In animal development germline is segregated from the somatic lineage to maintain its totipotency and ability to be inherited through next generations. Transcriptional regulation in the germline is known to play a pivotal role for germline cells to maintain these distinct characteristics. In this study, we used a primitive chordate species, *Halocynthia roretzi*, and found that three maternally localized factors, Pem, Popk-1 and Zf-1, which are inherited by the *Halocynthia* germline, regulate germline gene expression during its embryogenesis. Specifically, Pem and Popk-1 suppress somatic gene expression during early embryogenesis while Pem and Zf-1 regulate the timing for the onset of germline gene expression. We also used other closely related primitive chordate species to compare the mechanisms of transcriptional regulation in the germline and found that even among the closely-related species the mechanisms can be different.

研究分野：発生生物学

キーワード：生殖細胞系列 母性局在因子 転写制御 ホヤ

1. 研究開始当初の背景

多くの動物初期胚では、生殖細胞系列において遺伝子発現はグローバルに抑制されており、その後転写抑制は解除され、生殖細胞への分化を促進する特異的遺伝子の発現が起こる。この転写抑制は、体細胞の運命決定に関わる様々な遺伝子が生殖細胞系列では発現しないようにすることで生殖細胞における全能性の維持に貢献していると考えられており、一方で、生殖細胞特異的遺伝子の発現は、全能性を維持しつつ特定の運命へと分化していく特殊なプロセスといえる。このように生殖細胞系列における転写制御機構を明らかにすることは、世代を超えて受け継がれる生殖細胞の特殊な性質やその形成過程を理解するうえで必須であるといえる。

生殖細胞系列での転写制御機構は、ハエ・線虫・マウス等のモデル動物で研究が進んでおり、転写抑制機構については、母性局在因子・誘導因子・クロマチン修飾関連因子等、様々な因子に関わる複雑な機構であることが知られる。最近我々は、脊索動物門尾索動物亜門に属するマボヤにおいて、卵の後極に局在し最終的に生殖細胞系列に濃縮される母性局在因子 PEM が、同系列における転写をグローバルに抑制することを見出し、その抑制機構を明らかにした。ハエ・線虫・カエルに代表される「生殖質局在型」と呼ばれる生殖細胞系列形成過程を示す動物種のなかで、このような母性局在因子の同定および転写抑制機構の解明は新口動物では初めてであり、ホヤが「生殖質局在型」を示す新口動物胚の転写制御機構の全体像を明らかにするうえで優れた実験動物といえる。また、ホヤでは PEM のように母性に局在し生殖細胞系列に濃縮される mRNA は Postplasmic/PEM mRNA と呼ばれ、現在マボヤで 14 個同定されているが、そのうち生殖細胞系列の形成に関わることが報告されているものは PEM 以外に存在せず機能未知のものが多い。

生殖細胞系列が形成される過程は、上述の「生殖質局在型」とマウスに代表される「誘導型」に大別される。「生殖質局在型」では、生殖細胞系列の形成は卵内に偏って存在する母性局在因子に依存し、これら因子とこれらを含む特徴的な細胞質である生殖質が卵割に伴って特定の割球にのみ受け継がれることで起こる。一方「誘導型」では、生殖細胞系列形成に関わる母性局在因子・生殖質は存在せず、発生過程のより遅い時期に細胞間相互作用により胚のある場所に誘導される。進化的な見地からは、「誘導型」が祖先型で、「生殖質局在型」がそれぞれの系統で独立に獲得された派生型であると考えられている。

我々の上述の転写抑制因子としての PEM とその機能の発見は、同時に、「生殖質局在型」を示すハエ・線虫・マボヤにおいて転写抑制を制御する母性局在因子が、pTEFb に結合し RNA ポリメラーゼ II のリン酸化を抑制するという共通の機能を持つにも関わらず、お互い

は個々の系統で独立に進化した進化的に新しい因子であるということを示した。これは「生殖質局在型」が派生型であることを支持し、したがって、近縁種における PEM の機能や、PEM を持たずホヤとは網レベルで異なるオタマボヤでの転写抑制機構を明らかにできれば、「誘導型」から「生殖質局在型」の変遷過程で何が起こったのかその一端を理解できることが期待されていた。

2. 研究の目的

ホヤ・オタマボヤ等の尾索動物胚を用いた生殖細胞系列での転写制御機構に焦点を当てた発生学および比較発生学的な解析を通して、発生初期における生殖細胞系列形成機構とその進化について明らかにすることを目的とした。具体的には、近年我々が同定したホヤにユニークな母性局在転写抑制因子 PEM を足掛かりにして、1) PEM を含めたホヤ母性局在因子 (Postplasmic/PEM mRNA) 群による生殖細胞系列での転写制御機構の体系的な理解、2) 体細胞運命を抑える転写抑制状態から生殖細胞特異的遺伝子発現へ切り替わる機構の解明、3) PEM による転写抑制機構が進化の過程でどう獲得されたのかについての理解、の3つの課題に取り組むこととした。

3. 研究の方法

本研究では、Postplasmic/PEM mRNA である POPK-1 と ZF-1 を中心に、転写制御機構に関わると予想されるその他の因子も含めて、それらの機能について、顕微注入を含めた胚操作、遺伝子操作(機能阻害、強制発現、ドメイン解析)、抗体染色等を組み合わせて明らかにし、マボヤ初期胚での生殖細胞系列における転写制御機構を体系的に理解する。また、ホヤ複数種において PEM による転写抑制機構を分子レベルで比較解析すると同時に、オタマボヤでは新たな生殖細胞系列における転写抑制因子の単離を試み、尾索動物での転写抑制機構の進化過程の理解に迫る。具体的には、

(1) これまでに得られた予備の結果に基づく仮説を、結果の例数を増やす、および別のアプローチで検証することでより確実なものにする。すなわち、イ) POPK-1 が転写抑制因子 PEM の mRNA の生殖質への適切な局在を介して十分量の PEM タンパク質を生殖細胞系列に供給する役割を担うかどうか、ロ) 発生に伴う PEM のタンパク量減少が、転写抑制の解除および生殖細胞系列での胚性遺伝子発現に必要十分であるかどうか、ハ) ZF-1 がこの PEM タンパク質の減少に関わるかどうか、を確かめる。

(2) マボヤとは異なるホヤ種であるユウレイボヤを用いて、マボヤ PEM 解析時同様、ユウレイボヤ PEM の機能阻害・強制発現・Co-IP・RNA ポリメラーゼリン酸化抗体染色等を駆使し、転写抑制機構を分子レベルで解析

する。特に、マボヤとユウレイボヤで抑制機構が異なるか否かに着目し、異なった場合には、マボヤのドメインをユウレイボヤの Pem に導入する等のスワッピング解析により、ユウレイボヤ Pem が両種のホヤ胚内でマボヤ様の抑制機構を獲得できるか調べ、配列の変化がどう機能に影響するか明らかにする。

(3) 尾索動物亜門では系統的に basal な位置に存在し、ゲノム上に Pem が存在しないオタマボヤを実験材料として用いて、初期胚生殖細胞系列に母性局在因子が存在するか否か、転写が抑制されているか否かを確かめる。また、既に確立されている RNAi スクリーニング法を用いて、始原生殖細胞での転写抑制制御因子の同定を行うことができる否かを検討する。

4. 研究成果

尾索動物胚を用いた生殖細胞系列での転写制御機構に焦点を当てた発生学および比較発生学的解析を通して、発生初期における生殖細胞系列形成機構とその進化について明らかにすることを目的とした本研究における成果は以下の通りである。

発生学的解析においては、マボヤ初期胚において、生殖細胞系列に局在・受け継がれる母性局在因子 Pem と Popk-1 と Zf-1 の 3 因子の機能について明らかにし、論文を発表した。すなわち、1) ホヤの生殖質形成に関わる Popk-1 が、転写抑制因子 Pem の転写物の生殖質への局在量および核内 Pem タンパク質量を適切なものとする事で、卵割期に観察される生殖細胞系列でのグローバルな転写抑制を間接的に制御すること、2) Pem のタンパク質量が発生に伴って徐々に減少することで、生殖細胞系列での生殖細胞関連遺伝子の胚性遺伝子発現の開始に寄与すること、3) RNA 結合タンパク質である Zf-1 が Pem タンパク質を減少させること、を明らかにした。

以上より、以下の 2 点において意義ある成果を出すことができた。1) 「生殖質局在型」により始原生殖細胞が作られる新口動物においては、生殖細胞系列での転写制御を担う因子はツメガエルの Nanos1 以外の知見がなかったが、本研究により、Pem に加えて新たに 2 種類の母性局在因子 (Popk-1 と Zf-1) を同定することができた。2) このことと、Pem・Popk-1・Zf-1 による Pem を中心とした一連の流れを持った転写調節機構のモデルを提唱できたことにより、これまでショウジョウバエ・線虫 (共に前口動物・生殖質局在型)・マウス (新口動物・誘導型) の各モデル動物を使った研究をもとに議論されていた動物胚の生殖細胞系列での転写調節機構に、新たな知見を加えることができ、動物全体を通しての議論を進める素地を作ることができた。

一方で、胚性遺伝子発現を正に促進する転写因子の同定や、転写抑制が解除された以降も引き続き体細胞遺伝子の発現については

抑制される仕組みなど、生殖細胞系列における転写調節機構を体系的に理解するために必要な現象について、本研究からはさらに理解を深めることができなかった。しかし、後者に関しては、生殖細胞系列において胚性遺伝子発現開始直前から、H3K27me3 のレベルが上昇することを見出した。この時期、生殖細胞系列では H3K4me3 のレベルも高く、このような抑制と活性マーカーが同在する Poised chromatin 状態が、胚性遺伝子発現開始以降の生殖細胞系列と体細胞系列の分離に関わる可能性が示唆され、予備的な結果ではあるが、H3K27me3 の阻害剤処理胚において生殖細胞系列で筋肉アクチンが異所的に発現することを見出している。

比較発生学的解析においては、ユウレイボヤの Pem の機能障害による結果が得られず、ユウレイボヤにおける Pem による転写抑制機構を分子レベルで詳細に明らかにすることができなかった。しかし、Pem 強制発現系の解析の結果、マボヤ Pem と同様に、ユウレイボヤでも Pem は体細胞遺伝子に対して転写抑制活性を持つが、この活性に必要なドメインは、マボヤ Pem 内で既に同定されている同等のドメインとは別領域に存在することが明らかになった。これは、ホヤ綱の動物種間でさえも、転写抑制機構に多様性を示すことを示唆する興味深い結果となった。

さらに、同じ尾索動物でありながら、Pem をそのゲノム上に持たないワカレオタマボヤ (オタマボヤ綱) の転写抑制機構を明らかにするために解析を行った結果、Vasa タンパク質がワカレオタマボヤ初期胚の生殖細胞系列に局在することを明らかにした。このことは、Pem のないワカレオタマボヤにおいても、おそらく母性局在因子により生殖細胞系列の形成が制御されていることを示している。また、生殖細胞系列において転写抑制が起こっているか否かを調べた結果、生殖細胞系列が完全に生殖細胞のみを作るようになる 32 細胞期になってはじめて、転写抑制を示唆する RNA polymerase II のリン酸化の消失が観察されることがわかった。このことは、ワカレオタマボヤにおいても、生殖細胞系列においてグローバルな転写抑制が起こっていることを示唆する。本研究では、ワカレオタマボヤに関しては、以上のような基礎的な情報を得るに留まってしまったが、本研究で明らかにした 32 細胞期での始原生殖細胞でのリン酸化の有無を指標にすることで、RNAi スクリーニングによる転写抑制因子の同定を進めることが可能となったといえる。

< 引用文献 >

- 1 Nakamura and Seydoux, 2008, Development 135, 3817-3827.
- 2 Kumano et al., 2011, Curr. Biol. 21, 1308-1313
- 3 Nakamura et al., 2005, Development 132, 4731-4742.

4 Extavour, 2007, Integr. Comp. Biol. 47, 770-785.

5 Extavour and Akam, 2003, Development 130, 5869-5884.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1 Miyaoku, K., Nakamoto, A., Nishida, H. and Kumano, G. (2018). Control of Pem protein level by localized maternal factors for transcriptional regulation in the germline of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. PLoS One, 13:e0196500. doi: 10.1371/journal.pone.0196500. 査読あり

2 Kodama, H., Miyata, Y., Kuwajima, M., Izuchi, R., Kobayashi, A., Gyoja, F., Onuma, A.T., Kumano, G. and Nishida, H. (2016). Redundant Mechanisms Are Involved in Suppression of Default Cell Fates During Embryonic Mesenchyme and Notochord Induction in Ascidians. Dev. Biol. 416, 162-172. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.05.033. 査読あり

3 Kumano, G. (2015). Evolution of germline segregation processes in animal development. Dev. Growth and Differ. 57, 324-332. doi: 10.1111/dgd.12211. 査読あり

[学会発表](計14件)

1 中本章貴、熊野岳、脊索動物ホヤ幼生の尾が形作られる過程における上皮形態形成機構の解析。日本動物学会第88回富山大会、富山、2017年9月21~23日。

2 藤木聡世、中本章貴、熊野岳、エダアシクラゲ触手の分岐パターン。日本動物学会平成29年度東北支部大会、浅虫、2017年7月29日。

3 Kumano, G., Miyaoku, K., Zheng, T., Nakamoto, A., Nishino, A. Regulation of germline gene expression in simple chordate embryos. International Research Symposium of Germ Cell Development in vivo and in vitro, Fukuoka, July 26-28, 2017.

4 Zheng, T., Nakamoto, A., Nishino, A. and Kumano, G. Evolutionary and developmental analysis of germline formation in simple chordate embryos. International Research Symposium of Germ Cell Development in vivo and in vitro, Fukuoka, July 26-28, 2017.

5 Zheng, T., Nakamoto, A., Nishino, A. and Kumano, G. Evolutionary and developmental analysis of germline formation in simple chordate embryos. The 9th International Tunicate Meeting, New York, USA, July 17-21, 2017.

6 Kumano, G. and Nakamoto, A. Mechanism of tail shaping morphogenesis in the embryo of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. The Joint Meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of the Zoological Society of Japan, Okinawa, November 14-19, 2016.

7 Nakamoto, A. and Kumano, G. Analyses of epithelial morphogenesis during tail formation in the embryos of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. The Joint Meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of the Zoological Society of Japan, Okinawa, November 14-19, 2016.

8 Fujiki A., Nakamoto, A. and Kumano, G. Characterization of tentacle branching morphogenesis in the jellyfish *Cladonema pacificum*. The Joint Meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of the Zoological Society of Japan, Okinawa, November 14-19, 2016.

9 熊野岳、脊椎動物への道 - 珍味なホヤの生物学 - 。特別講演、第39回日本高血圧学会総会、仙台、2016年9月30日~10月2日。

10 宮奥香理、中本章貴、西田宏記、熊野岳、マボヤ胚生殖細胞系列における転写制御機構の解析。日本動物学会平成28年度東北支部大会、福島、2016年7月23日。

11 熊野岳、原索動物の尾の形成過程にみる新しい形づくりの原理の解明。山田科学振興財団2016年度研究交歓会、品川、2016年5月28~29日。

12 Kumano, G. and Nakamoto, A. Mechanisms of the "KUBIRE" formation in the neurula embryo of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. 8th International Tunicate Meeting, Aomori. July 13-17, 2015.

13 Nakamoto, A. and Kumano, G. Analyses of the mechanisms of epithelial morphogenesis during the tail formation in the embryos of ascidian *Halocynthia roretzi*. 8th International Tunicate Meeting, Aomori. July 13-17, 2015.

14 Miyaoku, K., Nakamoto, A., Nishida, H. and Kumano, G. Regulation of germline gene expression during ascidian embryogenesis. 8th International Tunicate Meeting, Amori. July 13-17, 2015.

〔図書〕(計2件)

1 Kumano, G. Microinjection of exogenous DNA into eggs of *Halocynthia roretzi*. In Sasakura Y. (ed) Transgenic Ascidians. Springer, Heidelberg. p25-35. 2018.

2 Kumano, G. Early embryonic axis formation in a simple chordate ascidian. In Kobayashi, K., Kitano, T., Iwao, Y. and Kondo, M. (ed) Reproductive and Developmental Strategies. Springer, Heidelberg, in press. 2018.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

アウトリーチ活動等

1 岩手県立福岡高等学校にて大学模擬講義(2017年)

2 弘前大学教員免許更新講習講師(2016年)

3 宮城県高等学校理科研究会生物部会第50回「教材生物ワークショップ」講演(2016年)

4 気仙沼市立松岩小学校「研究授業とワークショップ」～ホヤの生殖細胞と受精卵の観察～(2015年)

ホームページ等

http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/asamushi/kumano_lab/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

熊野 岳 (KUMANO, Gaku)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：80372605

(2)連携研究者

中本 章貴 (NAKAMOTO, Ayaki)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：40738100