

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18539

研究課題名(和文) 転写因子と協調して生殖細胞分化を制御する機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism which regulates germ cell development in cooperation with transcription factors

研究代表者

村上 和弘 (Murakami, Kazuhiro)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：60455368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我が国を含めた先進国における出生率の低下は早急に対処すべき問題であるのに対し、根本的な解決策となりうる生体外における生殖細胞誘導の研究は、端緒に就いたばかりである。

本研究では、転写因子と協調して生殖細胞分化を制御する機構を解明するため、始原生殖細胞様細胞(PGCLC)誘導技術と免疫沈降法・質量分析法を組み合わせた大規模で網羅的な解析を行った。さらに、CRISPR/Cas9技術を用いて候補因子の欠損および、転写因子の結合するゲノム領域の欠失を引き起こし、PGCLC誘導過程で機能検証実験を行った。

その結果、生殖細胞の発生過程に必須な転写因子間の相互作用や、エピゲノムの詳細が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The decline of birth rate in developed countries including Japan is one of urgent issues. But the research on In Vitro germ cell induction which could be a fundamental solution to the problem has been just started.

In this study, I combined the Primordial Germ Cell-Like Cell (PGCLC) induction technique and the immunoprecipitation - mass spectrometry analysis to perform extensive analyses and tried to understand the mechanism which regulate germ cell development in cooperation with transcription factors. Furthermore, by using the CRISPR/Cas9 technique, I disrupted candidate genes and genomic regions which were bound by transcription factors and performed verification experiments in the context of PGCLC.

As a result, the details of the interaction among transcription factors and epigenome which are essential for the germ cell development has been clarified.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：始原生殖細胞 胚性幹細胞 転写因子

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国においては晩婚化や高齢出産を要因とする少子化が喫緊の課題であり、その一つの背景として卵子・精子の不可逆的な老化による出産リスクの増加が指摘されている。この問題に対して、もし生体外において安全で若々しい卵子・精子をいつでも・効率良く作ることができれば、革新的な解決策となりうる。このような背景のもと、申請者は、体を構成するいかなる細胞にもなれる多能性幹細胞を用いて、卵子・精子の元となる始原生殖細胞の発生機序の解明と生体外誘導技術の確立を目指してきた。

生殖細胞は次世代にゲノムを継承し、受精により完全な個体を形成する能力を獲得する唯一の細胞系譜であり、その初期形成過程である始原生殖細胞においては、体細胞型の遺伝子発現の抑制および生殖細胞特有の遺伝子群の発現、エピゲノムの大規模なリプログラミングがおこる。しかし、生体内における細胞数の少なさから、それらの現象を制御する詳細なメカニズムは未だ明らかにされてはいない。

この問題に対して、申請者は、無限に増殖可能な多能性幹細胞であるマウス胚性幹細胞(mESC)から誘導した前駆細胞に、特定の転写因子を発現させる事で、生体外において効率良く始原生殖細胞様細胞(PGCLC)を作製する手法を確立した(Magnúsdóttir E., Murakami K., *Nature Cell Biology*, 2013)。このことにより、大規模で網羅的な解析を行う基盤がはじめて整いつつある。さらに、この手法を用いて、生殖細胞発生に必須な遺伝子間の相互作用や、転写因子の発現がエピゲノムに及ぼす影響、生殖細胞形成過程におけるエピゲノム変化の詳細を明らかにできる。

一方で、我々が発見したPGCLCを誘導する転写因子のいくつかは、腫瘍においても発現することが知られている。そのため、生体外において真に安全な生殖細胞誘導技術を確立するためには、これらの転写因子がPGCLCを誘導する機構をより詳細に解析する必要があった。

2. 研究の目的

これまでに申請者は、自ら開発した材料・実験系を用いて、転写因子がお互いに協調し合い、特定の前駆細胞から効率良く始原生殖細胞様細胞(PGCLC)を誘導する事を明らかにしている。しかし、これらの転写因子と協調して、時期特異的に生殖細胞分化を制御する機構の詳細は未だ明らかにされていない。

また、安全な生殖細胞誘導技術を確立するためには、これらの転写因子がどのように生殖細胞特有の遺伝子群の発現を制御し、エピゲノムのリプログラミングを伴い、PGCLCを誘導するのか、また、なぜ特定の前駆細胞からのみPGCLCを誘導するのかについてさらに深く理解する必要がある。

本研究の目的は、生体外において初期生殖細胞発生を模倣するPGCLCをモデルとして、転写因子の相互作用とそれに伴うエピゲノム変化を解析する事で、生殖細胞運命を誘導する詳細な機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究では、申請者の確立した転写因子の発現によるPGCLC誘導技術と、免疫沈降法と質量分析法を組み合わせた大規模で網羅的な解析を試みた。一方で、候補因子のノックアウト、転写因子の結合するゲノム領域の転写活性測定およびCRISPR/Cas9技術を用いた欠失実験などの機能検証実験を行い、転写因子と協調して生殖細胞分化を制御する機構の解析を行った。

(1) 免疫沈降法-質量分析法を用いた時期特異的な相互作用因子の同定

テトラサイクリンの添加により末端に3xFlag タグが融合したそれぞれの転写因子を発現誘導できるマウス胚性幹細胞(mESC)を樹立した。それらのmESCよりPGCLC前駆細胞を誘導し、テトラサイクリン添加24時間後の初期PGCLCを回収してFlag タグに対する抗体で免疫沈降を行い、質量分析法により相互作用因子の網羅的同定を試みた。

(2) 相互作用因子の時期特異的な発現誘導およびノックアウト

相互作用する転写因子について、PGCLC誘導能への影響を検証した。具体的には、促進/阻害候補因子をmESCと前駆細胞において強制発現もしくはノックアウトし、PGCLC誘導効率への影響を見積もることで、候補因子の機能を検証した。

(3) 下流遺伝子の制御機構の解析

Flag タグもしくは各転写因子に対する抗体を用いて、時期特異的に免疫沈降-シークエンシングを行い、PGCLC誘導過程における転写因子のゲノム上の結合領域を明らかにした。また、遺伝子発現データ、エンハンサー・プロモーター領域を示すクロマチンデータと照らし合わせ、転写因子の制御する下流遺伝子とその制御に必須なゲノム領域の同定を試みた。

(4) 転写因子の制御を受ける下流遺伝子群の同定

転写因子を時期特異的に発現させ、遺伝子発現解析を行った。また、エンハンサー・プロモーターを示すヒストン修飾(H3K4me1、H3K4me3、H3K27me3、H3K27ac等)のChIP-seqデータおよびPGCLCにおける遺伝子発現データと照らし合わせることで、転写因子が直接制御するエンハンサー・プロモーター領域とその制御を受ける下流遺伝子の同定を試みた。

(5) 転写因子の制御を受けるゲノム領域の同定

(4)で同定したゲノム領域が、PGCLC 誘導過程において実際に転写因子により制御されているかを確認するために、ルシフェラーゼアッセイや新規のゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 技術により該当ゲノム領域の制御様式の確認を試みた。

(6) エピジェネティックバリアの検証;

mESC において G9a, Glp, Dnmts などの抑制性修飾の責任酵素をノックアウトし、さまざまな段階の細胞から PGCLC 誘導を試みることで、エピジェネティックバリアの有無を検証した。

4. 研究成果

(1) 時期特異的な相互作用因子の同定

N 末端、C 末端に 3xFlag タグが融合した候補転写因子 PGCLC 誘導過程で発現し、免疫沈降-質量分析を行い、相互作用因子の同定を試みた。結果として、独立した実験を複数回行ったが再現性のある結果は得られなかった。細胞数および細胞可溶化条件など実験条件のさらなる検討が必要と思われる。

一方で、強制発現およびノックダウン、経時的な RT-PCR より、転写因子 *Nanog*, *Sox2*, *Prdm1*, *Tfap2c*, *Prdm14* は、お互いに協調し合い、誘導 2 日目の前駆細胞から PGCLC を誘導する事が明らかとなった。

(2) 相互作用因子の時期特異的な発現誘導およびノックアウト

PGCLC 誘導過程において、誘導 2 日目の PGCLC 前駆細胞において、時期特異的に *Nanog* もしくは *Prdm1/Tfap2c/Prdm14* を強制発現させる事で、PGCLC が誘導できる事が明らかとなった。一方で、mESC および誘導 1 日目の PGCLC 前駆細胞でこれらの転写因子を発現させても、PGCLC は誘導できない事が明らかとなった。また、*Nanog* と相互作用する *Sox2* が、PGCLC 誘導を阻害することが明らかとなった。一方で、PGCLC が誘導された後には、*Sox2* と *Nanog* は強調して PGCLC 増殖を促進することが示唆された。

(3) 下流遺伝子の制御機構の解析

mESC、PGCLC 前駆細胞において ChIP-seq を行うことで、各細胞において遺伝子発現を制御するエピジェネティック修飾 (H3K4m1, H3K27ac, H3K9me2・3, DNAm) のゲノム上の詳細な修飾領域を明らかにすることができた。

得られた結果から、PGCLC 誘導過程において、それぞれの修飾がゲノム上の位置を変えていく様子が明らかとなった。また、*Prdm14* は、エピゲノム変化を誘導する事が示唆された。

(4) 下流遺伝子の制御機構の解析

転写因子に対する抗体を用いて、PGCLC 誘導過程において免疫沈降を行い、シークエンスを行うことで初期 PGCLC におけるゲノム上の転写因子局在領域を明らかにした。特に *Nanog* に関しては、詳細なゲノム上の局在領域を明らかにすることができた。

それらのデータを、エンハンサー・プロモーターを示すゲノムデータおよび遺伝子発現データと照らし合わせることで、転写因子が PGCLC 誘導過程において制御する下流遺伝子候補を明らかにすることができた。

(5) 転写因子により領域特異的な活性状態の解析

転写因子の結合するエンハンサー領域に着目し、これらのゲノム領域をルシフェラーゼベクターにクローニングし、PGCLC 誘導過程において、転写因子を発現させ、ルシフェラーゼの活性を確認した。

Nanog は、*Prdm1*, *Tfap2c*, *Prdm14* の発現制御領域に結合し、PGCLC の誘導に必要なそれらの転写因子の発現を誘導することが明らかとなった。さらに、*Nanog* の発現と数種のサイトカインを組み合わせることで、ほぼすべての前駆細胞を PGCLC へと誘導できる事が明らかとなった。

(6) エピジェネティックバリアの検証;

新規のゲノム編集技術である Crispr/cas9 を用いて、ESC で抑制性エピジェネティック修飾の責任遺伝子である *G9a*, *Glp*, *Dnmts* ノックアウトを試みたが、ノックアウトクローンの樹立には至らなかった。今後は、導入条件などを検討する必要がある。

PGCLC の誘導過程は、生体内の始原生殖細胞の発生過程を良く模倣しているため、本研究計画により得られた知見は、生体内におけるさらなる解析の足がかりとなった。

本研究計画で明らかになった生殖細胞分化の制御機構は、他の動物種でも保存されている可能性が高く、希少動物の保護、優秀な家畜の繁殖などへの貢献も期待できる。さらに、ヒトを含めた霊長類研究へ発展できる可能性を秘めているため、これらの知見を積み重ねていくことで、将来的には、安全で若々しい卵子・精子をいつでも・効率良く誘導する技術の基盤を築き、少子化問題への革新的な解決策を提示したい。

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 1 件)

① Murakami K., (他 9 名、1 番目)

“NANOG alone induces germ cells in primed epiblast *in vitro* by activation of enhancers”

Nature

査読 有, 529, 2016, 403-407
DOI; 10.1038/nature16480

〔学会発表〕(計 2 件)

① Kazuhiro Murakami

“ *Nanog* alone induces germ cells in primed epiblast *in vitro* by activation of enhancers ”

第 14 回 幹細胞シンポジウム

2016 年 05 月 20 日-21 日

淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県・淡路市)

Kazuhiro Murakami

“ *Nanog* induces germ cell fate in competent epiblast cells *in vitro* ”

第 38 回 日本分子生物学会年会

2015 年 12 月 1 日-4 日

神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

〔その他〕

村上和弘

新着論文レビュー

“ ES 細胞から生殖細胞へ新手法 ”

http://www.hokudai.ac.jp/news/160112_es_pr.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 和弘 (Murakami Kazuhiro)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号: 60455368

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし