

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19008

研究課題名(和文) 始原生殖細胞エピゲノムリプログラミング分子機構の包括的解析

研究課題名(英文) Global analysis of the molecular basis of epigenetic reprogramming in primordial germ cells

研究代表者

中木 文雄 (NAKAKI, Fumio)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60737120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウス生殖細胞系譜の起源である始原生殖細胞では、その運命決定後、エピジェネティック修飾が大きく変化するエピジェネティックリプログラミングが生じる。この過程の分子機構を解明するために、機能的に検証された体外培養系を用いて、3種類の転写因子(BLIMP1、PRDM14、TFAP2C)の動態解析をゲノムワイドレベルで実施した。その結果、BLIMP1およびPRDM14が、生殖細胞プログラムの活性化に主導的な役割を果たし、TFAP2Cが生殖細胞プログラムにおける転写活性化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Primordial germ cells, the origin of germline cells, undergo epigenetic reprogramming in which their epigenetic modifications dramatically change just after their specification in mice. To elucidate the molecular basis of it, the roles of three transcription factors, BLIMP1, PRDM14, and TFAP2C were analyzed on a genome-wide scale. By utilizing an in vitro culture system that is functionally validated, ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation followed by high-throughput DNA sequencing) and transcriptome analyses were conducted. These analyses suggested that both of BLIMP1 and PRDM14 played a pivotal role in the activation of germline program, and TFAP2C contributed to activation of transcription.

研究分野：分子生物学

キーワード：始原生殖細胞 胚性幹細胞(ES細胞) 転写因子 ChIP-seq 発生・再生

1. 研究開始当初の背景

(1) 生殖細胞系譜の運命決定とエピゲノムリプログラミング

哺乳類では、生殖細胞系譜が卵、精子という配偶子へと分化し、これらが受精することによって、次世代の個体が誕生する。受精卵のように、一個体へと自律的に発生・成長する能力は全能性と呼ばれる。次世代に遺伝情報を伝達し、種の維持に直接的に寄与する生殖細胞系譜は、その発生に際して潜在的に全能性を発揮しうる状態であることが必要である。そのため、生殖細胞系譜は、他の体細胞にはみられない特徴的な発生・分化過程を経ることが知られている。例えば、ショウジョウバエや線虫においては、受精卵の細胞質に依存して生殖細胞系譜が受精後早期に運命決定される。哺乳類では着床後に始原生殖細胞 (Primordial germ cells; PGCs) が分化誘導され、その発生過程で、体細胞にはみられない、潜在的な多能性の再獲得、体細胞系譜への分化抑制、エピゲノムリプログラミングが生じることが知られている (文献①)。

特に、エピゲノムリプログラミングは、エピジェネティック修飾が大きく変化する PGCs 特有の現象である。具体的な変化として、全ゲノムにわたる DNA 脱メチル化、ヒストン修飾の再編成、ゲノムインプリンティングの消去、X 染色体の再活性化が挙げられる (文献①)。近年、iPSCs (induced-pluripotent stem cells) の誘導やダイレクトリプログラミング法に代表されるように、細胞の分化可塑性が広く認識され、リプログラミング機構解明の重要性が高まっている。PGCs におけるリプログラミング機構の知見は、次世代に遺伝情報を伝える基盤としての生物学的意義のみならず、人工的リプログラミング手法の発展にも貢献するものである。しかし、発生初期の PGCs は数が非常に少なく、その詳細な分子機構を解析することが困難であった。

(2) PGCs を誘導する体外培養系の確立と発展

2011 年にマウス胚性幹細胞 (embryonic stem cells; ESCs) や iPSCs といった多能性幹細胞を起点として、エピブラスト様細胞 (EpiBLAST stem cells; EpiLCs) を経て、サイトカインを用いて PGCLCs を誘導する培養系が開発された。遺伝子発現とエピゲノムの解析から、誘導されたマウス PGC 様細胞 (PGC like cells; PGCLCs) は、受精後 9.5 日頃の PGCs に近いと推定された。さらに、核型 XY の細胞を直接精細管に移植する、もしくは核型 XX の細胞を生殖巣の体細胞と混合培養して卵巣に移植することにより、それぞれ機能的な精子または卵母細胞へと分化することが証明された (文献②、③)。

研究代表者はこの体外培養系を活用して、

PGCs の運命決定に重要な転写因子の機能解析を行った。その結果、マウス PGC 運命決定に必須の転写因子である *Blimp1*、*Prdm14*、*Tfap2c* を、EpiLCs に強制発現させることによって、PGC 様細胞が誘導可能であることが明らかになった。誘導された細胞は、精細管移植法により機能的な精子へ分化することが確認されたため、この細胞を Transcription-factor-induced PGCLCs (TF-PGCLCs) と命名した (文献④)。これにより、EpiLCs における 3 遺伝子の標的遺伝子、特に転写因子群やエピゲノム制御因子を探索することで、PGCs 発生過程の分子基盤を明らかにすることが可能となった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、機能的に検証された培養系を利用して、PGC 運命決定を制御する転写因子群の動態解析をゲノムワイドレベルで行うことにより、PGC 運命決定およびエピゲノムリプログラミングの分子機構を包括的に明らかにすることである。

3. 研究の方法

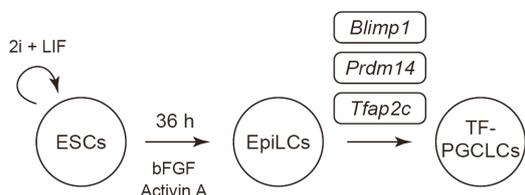
(1) ゲノムワイドレベルでの解析を目的とした ESCs の樹立

次世代シーケンサーを用いて転写因子の動態解析を行うために、予備実験を行い、免疫沈降効率の高いエピトープタグを選定した。PGC 運命決定を制御する転写因子である *BLIMP1*、*PRDM14*、*TFAP2C* にそれぞれ異なるエピトープタグを付与し、これらをドキシサイクリン依存性のプロモーター下で発現させるプラスミドベクターを作製した。また、これらの外来遺伝子の発現をモニタリングするために、外来遺伝子の下流に *IRES* (Internal ribosome entry site) をはさんで蛍光レポーターを挿入した。これらの新たに作製したベクターを、以前の研究で用いた *BVSCR26rtTA* ESCs に導入した (文献④)。以上により、ドキシサイクリンの添加によって、免疫沈降可能な 3 つの転写因子を強制発現可能であり、かつレポーター遺伝子を持つ ESCs を樹立した。

(2) TF-PGCLCs の誘導

TF-PGCLCs の誘導は、これまでの研究に基づいて以下の通り行った (文献④)。(1)で樹立したマウス ESCs を *MEK* 阻害剤および *GSK3* 阻害剤 (2i) と白血病阻止因子 (*LIF*) を用いて維持培養した。誘導に際して、培地から 2i + *LIF* を除き、2 種類のサイトカイン (*bFGF* + *Activin A*) を加え、36 時間培養し、EpiLCs へと分化させた。ここで培地にドキシサイクリンを添加し、*Blimp1*、*Prdm14*、*Tfap2c*

の3遺伝子を発現させ、凝集培養させることにより、TF-PGCLCsを誘導した(図1)。今回新たに樹立したESCsにおいても、高効率でTF-PGCLCsを誘導可能であった。さらに、*Prdm14* 遺伝子のみならず(文献④)、*Blimp1* 遺伝子のみを強制発現した場合にも、TF-PGCLCsが誘導可能であることが明らかになった。



(図1) 本研究で用いた培養系の概要

(3) RNA3-seq 法による誘導過程のトランスクリプトーム解析

TF-PGCLCsの誘導機構を詳細に解析するために、誘導開始時点(EpiLCs)から12時間ごとに細胞を回収し、次世代シーケンサーを用いてトランスクリプトームデータを取得した。3種類の転写因子を同時に発現し、高効率にTF-PGCLCsを誘導可能な細胞株だけでなく、各転写因子のみを発現する細胞株においても同様の解析を実施した。これらのトランスクリプトーム解析は、SC3-seq法(次世代シーケンサーを用いて単一細胞のトランスクリプトームデータを取得する手法)を応用したRNA3-seq法を用いて行った(文献⑤)。得られたシーケンシングデータは、既報の通りゲノム上にマッピングし、各遺伝子の発現値を計算した(文献⑤)。

(4) ChIP-seq法によるゲノムワイドなBLIMP1、PRDM14、TFAP2C 標的結合領域の同定

TF-PGCLC誘導初期における、BLIMP1、PRDM14、TFAP2Cのゲノム上の分布を明らかにするために、EpiLCsにドキシサイクリンを加えて12時間後の時点でサンプルの回収を行った。回収した約 1×10^7 個の細胞に対し、付与したエピトープタグを用いてクロマチン免疫沈降を行った。得られたDNA断片(標的結合領域を含む)の塩基配列を、次世代シーケンサーを用いてゲノムワイドに決定した(ChIP-seq法)。

得られたシーケンシングデータから、既存のバイオインフォマティクスツールを用いてシグナルピーク領域を同定するとともに、データの可視化を行った。これらの標的結合領域のデータから、各転写因子の標的結合領域の特徴、各転写因子相互の関連性や、結合領域周囲の遺伝子の特徴について解析を行った。特に、転写因子およびエピジェネティック修飾因子を探索し、エピゲノムプログラミングがいかにか統御されているかを解析

した。

これらの解析に加え、各転写因子とエピジェネティック修飾との関連を解析するために、EpiLCs、PGCLCsなどの関連細胞種におけるヒストン修飾データ(文献⑥)との比較を行った。

4. 研究成果

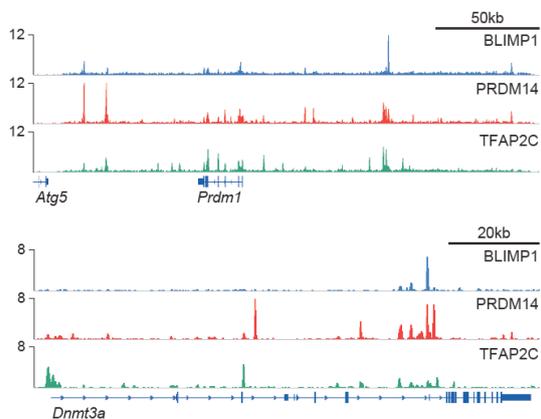
(1) 研究結果の概要

① TF-PGCLCのトランスクリプトームにおける各転写因子の寄与

経時的にトランスクリプトーム解析を行った結果、前回の報告と一致して、*Tfp2c* 遺伝子のみでは、生殖細胞プログラムが活性化しないことが判明した。このことから、*Blimp1* 遺伝子および *Prdm14* 遺伝子が生殖細胞プログラムの活性化に中心的役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、*Blimp1* または *Prdm14* のみを発現させた場合にも、強制発現後24時間のトランスクリプトームは大きく異なっており、TF-PGCLCsの誘導において、これらの転写因子には固有の役割があることが判明した。

② ChIP-seq法によるゲノムワイドな結合領域の同定と各転写因子の差異

BLIMP1、PRDM14、TFAP2Cの3遺伝子についてChIP-seq法を行った結果、標的結合領域を示すシグナルを十分得ることができた(図2)。これらのシグナルピークについて、その特徴を解析したところ、転写開始点周囲に多くのシグナルピークが集中しており、BLIMP1、PRDM14では全シグナルピークの約10%、TFAP2Cでは20%以上を占めていた。また、これら3種類のシグナルピーク全てが重複して存在する領域、すなわち、3つの転写因子が協調的に作用する可能性のある領域を、ゲノム上に1,000箇所以上同定した。



(図2) ChIP-seq法により得られたデータの一例。Blimp1 (*Prdm1*)遺伝子周囲およびDnmt3a遺伝子周囲を示す

③ エピジェネティック修飾因子と転写因子群との関連

Dnmt3a, *Dnmt3b*, *Uhrfl* といった DNA メチル化を担う主要因子の遺伝子近傍に、BLIMP1 や PRDM14 の標的結合領域が認められた (図 2)。①のトランスクリプトーム解析から、これらの遺伝子は、TF-PGCLC 誘導過程で発現が低下することが判明しており、BLIMP1 や PRDM14 が直接的に各遺伝子の転写調節に寄与して DNA メチル化関連因子の転写を抑制することにより、最終的に PGCs における脱メチル化に寄与していることが示唆された。

④ ヒストン修飾と転写因子群との関連
所属研究室で得られたヒストン修飾と各転写因子の結合領域との関連を調べたところ、TFAP2C の結合領域の周囲に、(サイトカインで誘導した) PGCLCs における H3K4me3 および H3K27ac が多く認められた。これらのヒストン修飾はそれぞれ活性化したプロモーター領域、活性化したエンハンサー領域と関連しており、TFAP2C が遺伝子発現の活性化と関連していることが示唆された。

(2) 本研究成果の位置付けと意義

本研究は、機能的に検証された培養系を用いて行った点が大きな特徴である。転写因子の標的結合領域は、細胞の種類によって異なることが知られているため、PGC 運命決定について論じるには、機能的に対応した細胞で実験を実施する必要がある。これまでにもこれら 3 つの転写因子について、その標的結合領域をゲノムワイドに調べた報告はあるものの、PGC 運命決定に対応した細胞におけるデータはなかった。本研究により、PGC 運命決定における 3 つの転写因子による制御の様式が初めて観察された。

(3) 今後の展望

現時点でのデータでは、ゲノム上の標的結合領域と、制御される遺伝子とを正確に関連づけることが困難であり、特に転写開始点から離れた標的結合領域を解釈するためには、ヒストン修飾や立体構造などのゲノムの機能的データを検討する必要があると考えられる。また、霊長類においては、マウスと異なる転写因子の組み合わせにより生殖細胞プログラムが活性化されることが明らかとなりつつあり、マウスで得られた知見と比較することにより、哺乳類における生殖細胞プログラムの活性化に必要な転写因子群の機能に対する理解が深まるものと考えられる。

参考文献

- ① Saitou M. *et al. Development.* 139:15-31 (2011), Review.
- ② Hayashi K. *et al. Cell.* 146:519-532 (2011).

- ③ Hayashi K. *et al. Science.* 338:971-975 (2012).
- ④ Nakaki F. *et al. Nature.* 501:222-226 (2013).
- ⑤ Nakamura T. *et al. Nucleic Acids Research.* 43:e60 (2015).
- ⑥ Kurimoto K. *et al. Cell Stem Cell.* 16:517-32 (2015).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Fumio Nakaki, Mitinori Saitou
The molecular basis of induction of mouse germ-cell fate by transcription factors *in vitro*
ポスター発表 第39回日本分子生物学会年会
- ② Fumio Nakaki, Mitinori Saitou
The molecular basis of induction of mouse germ-cell fate by transcription factors *in vitro*
Poster presentation, The 17th edition of the international conference on systems biology.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

- ①京都大学大学院医学研究科 機能微細形態学分野
(<http://anat.cell.med.kyoto-u.ac.jp/index.html>)
- ②Researcher ID
(<http://www.researcherid.com/rid/B-8284-2015>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中木 文雄 (NAKAKI, Fumio)
京都大学大学院医学研究科・助教
研究者番号：60737120

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし