

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22710197

研究課題名（和文） 体系的 RNAi による ES 細胞から始原生殖細胞への分化に関わる遺伝子群の探索

研究課題名（英文） RNAi screening for genes involved in differentiation of embryonic stem cells into primordial germ cells.

研究代表者

前田 郁麻 (MAEDA IKUMA)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：20376560

研究成果の概要（和文）：

RNAi スクリーニングにより Max 遺伝子を ES 細胞における生殖系列関連遺伝子群の抑制因子として見いだした。トランスクリプトーム解析により、Max の機能を抑圧した ES 細胞では生殖細胞特異的な遺伝子群の選択的かつ網羅的な発現解除が起きていることが明らかになった。Max はヒストンメチルトランスフェラーゼと相互作用し、生殖細胞特異的遺伝子群のプロモーター領域に結合していた。さらに、Max の機能阻害によりそれらの領域でヒストンのメチル化状態は低下していた。

研究成果の概要（英文）：

We identified Max as a repressor of germ-cell-related genes in embryonic stem cells (ESCs) via RNAi screen. Transcriptome analysis revealed that Max knockdown (KD) in ESCs resulted in selective, global derepression of germ-cell-specific genes. Max interacted with histone H3K9 methyltransferases and associated with the promoter regions of germ-cell-specific genes in ESCs. In addition, Max-KD resulted in a decrease in histone H3K9 dimethylation at those promoter regions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・システムゲノム科学

キーワード：発生分化

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類の生殖細胞発生と ES 細胞

・ マウスの受精卵は内部細胞塊と呼ばれる多能性の細胞集団を生み出す。その後その細胞集団はエピブラストと呼ばれる別の多能

性細胞に変化し、そこから配偶子のもととなる始原生殖細胞が出現する。一方、ES 細胞は内部細胞塊から細胞を取り出して in vitro で培養することによって樹立された多能性幹細胞で、この細胞を分化誘導すると自発的

に始原生殖細胞様の細胞が得られる。一方、胚から取り出した始原生殖細胞を特定の条件下で培養すると EG 細胞と呼ばれる ES 細胞とほとんど同じ多能性幹細胞を得ることができ、ES 細胞と始原生殖細胞はかなり性質が近いといえることができる。

ES 細胞と始原生殖細胞の違い

・ しかしながら両者には大きな違いがある。ES 細胞は胚盤胞に戻すと個体発生に寄与することができるが始原生殖細胞ではそのようなことはできないのに対し、始原生殖細胞は配偶子を作り出すことができるが ES 細胞は直接配偶子を生み出すことはできない。これらの二つの細胞は比較的簡単に互いに入れ替わることが可能であるのに、その性質に大きな差があるのは興味深い。そこで、本研究では ES 細胞から始原生殖細胞への分化誘導系に標的を絞って、これら二つの細胞の関心に迫っていくことを考えた。

機能阻害すると ES 細胞が始原生殖細胞へと変化する遺伝子の RNAi スクリーニングによる探索

・ ES 細胞は通常の条件下で培養しているときは ES 細胞としてのアイデンティティを保ちつつ始原生殖細胞へと分化しないようにしている遺伝子が働いていると考えられる。この遺伝子を RNAi など機能阻害すれば ES 細胞から始原生殖細胞へと容易に変化させることができると予想される。そこでこのような働きをする遺伝子群を網羅的に明らかにしていけば、ES 細胞と始原生殖細胞の違いを決定づけている機構に迫ることができると考え、ゲノムワイドに RNAi スクリーニングを行うことを考えた。そのためにまず小規模でのパイロットスクリーニングを行ったところ、5つの候補となる遺伝子を得ら

れた。

2. 研究の目的

・ 本研究では、スクリーニングで得られた 5 遺伝子のうち、Max という遺伝子について特に詳しい解析を行うことを目的とした。具体的には、Max を RNAi により機能阻害した ES 細胞 (Max KD ES 細胞) の性質を解析し、in vivo の始原生殖細胞にどれだけ近づいているかを調べることで、Max の機能を阻害することにより ES 細胞が生殖細胞のような状態をとるメカニズムの解析を行った。

・ 以上のような解析により、ES 細胞と始原生殖細胞の違いをもたらしている分子ネットワークを明らかにし、ES 細胞とは何か？生殖細胞とは何か？という根源的な疑問に迫っていくことを本研究の最終的な目標とした。

3. 研究の方法

ES 細胞から始原生殖細胞への分化をモニタリングできる細胞

mouse vasa homolog (Vasa) はマウスにおいて生殖細胞特異的に発現する事が知られている遺伝子である。当研究室では Vasa のプロモーター下に RFP をつなげたコンストラクトを持つ ES 細胞、VR15 が樹立されている。Vasa は現在知られている限りでは最も生殖細胞への特異性が高いマーカーであり、VR15 を用いてトランスジェニックマウスを作ると始原生殖細胞特異的に RFP の発現が見られることが確認済みである。また、VR15 を培養条件下で分化させると、非常に出現頻度は低いものの RFP の蛍光を発する細胞が認められ、それらの細胞が内在性の Vasa タンパク質も発現していることも確認済みである。従って、RNAi により Vasa プロモーターが活性化するような遺伝子、すな

わち ES 細胞が始原生殖細胞へ分化するのを抑えているような遺伝子を、RFP の蛍光を指標にしてスクリーニングすることを可能とした (図 1, 2)。

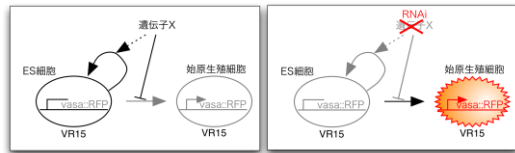


図 1 VR15 を用いた ES 細胞から始原生殖細胞への分化をモニタリングするシステム

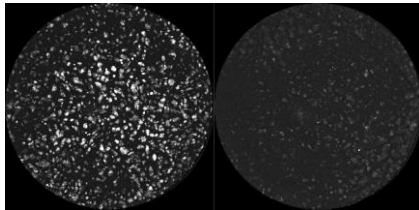


図 2 Max を knockdown し Vasa::RFP 陽性となった ES 細胞 (左) とコントロール ES 細胞

さらに、この細胞を用いれば、RFP の蛍光を用いて、FACS により Vasa 陽性細胞のみを分取することが可能である。このようにして分取した細胞を用いて分子生物学的な解析および生化学的な解析をおこなった。さらに、Vasa 陽性細胞を無精子症マウスへと移植し、実際に生体内において生殖細胞として機能できるかどうかを検証した。

4. 研究成果

・DNA マイクロアレイにより、Max KD ES 細胞のトランスクリプトーム解析を行ったところ、発現の上昇を見せた遺伝子群にはノックアウトマウスの解析により精子形成や減数分裂特異的に異常を示すことが知られている遺伝子が多く含まれていた。また、発現上昇を見せた遺伝子群の Gene Ontology (GO) 解析を行った結果、生殖細胞関連の GO が選択的に有意に濃縮されていることが分かった。さらに、マウス胚の始原生殖細胞のト

ランスクリプトームと比較を行った結果、未分化 ES 細胞に対して共通して発現上昇をみせる遺伝子群においてのみ、生殖細胞関連の GO が選択的に有意に濃縮されていることが分かった。このことから、Max は ES 細胞内で生殖系列関連遺伝子の発現を網羅的に抑えている可能性が示唆された。

・胚発生時に、始原生殖細胞は様々なエピジェネティックな変化を受けることが知られている。ヒストン修飾に関しては、転写に抑制的な修飾とされているヒストン H3K9 のメチル化が除去されることが知られている。実際に Max KD ES 細胞で同様の変化が起きているかを免疫染色とウェスタンブロットによって確認したところ、Vasa 陽性細胞においてメチル化ヒストン H3K9 が低下していることが分かった。そこで、Max が生殖系列関連の遺伝子の発現をヒストンメチル化を介して抑制するモデルを考えた。まず、免疫沈降実験により Max とヒストンメチルトランスフェラーゼとの相互作用を確認した。次に、クロマチン免疫沈降 (ChIP) により Max の生殖系列関連遺伝子群プロモーター領域に対する局在を調べたところ、それらの多くではっきりした Max タンパク質の濃縮を確認できた。さらに、Max KD ES 細胞ではそれらの領域におけるヒストン H3K9 のメチル化状態が低下していることも ChIP で確かめた。以上の結果から、Max は ES 細胞において生殖細胞特異的な遺伝子群のエピジェネティックなリプレッサーとして機能していることが予想された。

・Max KD ES 細胞をはじめ、4つの候補遺伝子を RNAi により機能阻害した ES 細胞が実際に生殖細胞として機能できるかどうかを確認するために、無精子症マウスに移植し、精子形成を起こせるかどうかを検証した。その結果、3つの遺伝子について減数分裂や

精子形成を確認できたものの、その頻度はきわめて低く、定着率も低かった。その原因は生殖細胞への変換が不十分であることが考えられたので、現在改善を進めている。

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)

[学会発表] (計1件)

Ikuma Maeda, Yuko Tokitake, Nathan Mise, Kuniya Abe, Toshiaki Noce, Yasuhisa Matsui
RNAi screening for genes involved in conversion of embryonic stem cells into primordial germ cells.

第34回日本分子生物学会年会

2011年12月13日

パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 郁麻 (MAEDA IKUMA)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：20376560

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし