

令和元年6月7日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14594

研究課題名(和文) デグロンシステムを利用した全能性幹細胞樹立の試み

研究課題名(英文) Attempt to establish totipotent stem cells using degron system

研究代表者

杉原 一司 (Sugihara, Kazushi)

京都大学・医学研究科・技術専門職員

研究者番号：10377418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子発現データベースより8細胞期から桑実胚期にかけて強く発現する遺伝子の候補を選定し、定量的RT-PCRを用いて初期胚での比較を行って5遺伝子に絞り込んだ。これらの遺伝子を1細胞期から発現させるために、エレクトロポレーション法を試みた。2本鎖DNAをエレクトロポレーションによって導入できたという報告はこれまでに1報のみで、追試された例がない。条件検討を独自に行い、安定的に10-20%程度の胚でマーカー遺伝子の発現が確認できる条件を決定した。また、8細胞期胚を浮遊培養によって無限増殖させられる条件を見出した結果、従来法よりもより初期胚に近い状態が作り出せる可能性が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子翻訳産物を薬剤などにより自由に発現消去できる方法は現在限られており、新しい方法の開発が望まれている。目的のタンパク質にデグロンタグを付加することで、特定の薬剤により目的タンパク質を転写制御よりも素早く分解できる方法が実用化されれば、タンパク質の機能解析に大きく資することができる。また初期胚の8細胞期はES細胞よりもより幹細胞に近い全能性を持つと考えられており、8細胞期胚の性状を持ったまま増殖させられる条件を見つめることができれば、全能性の解明に資することができる。我々は候補遺伝子の特定と導入法の開発までたどり着くことができたが、この成果を用いて全能性幹細胞を確立したいと考えている。

研究成果の概要(英文)：From the gene expression database, we selected candidate genes that were strongly expressed from the 8-cell stage to the morula stage, and confirmed 5 genes using early embryos and quantitative RT-PCR. In order to develop a gene transfer system for expressing these genes from one cell stage, we tried electroporation. So far, only one report has been reported that double-stranded DNA could be introduced into fertilized eggs by electroporation, and there has been no case to follow up. Condition examination was conducted independently, and the condition where expression of the marker gene could be confirmed stably in about 10-20% embryos were determined. In addition, we found a condition that allows 8-cell stage embryos to grow infinitely by suspension culture. Using these, it is expected that the condition closer to the early embryo can be created than the conventional method.

研究分野：発生工学

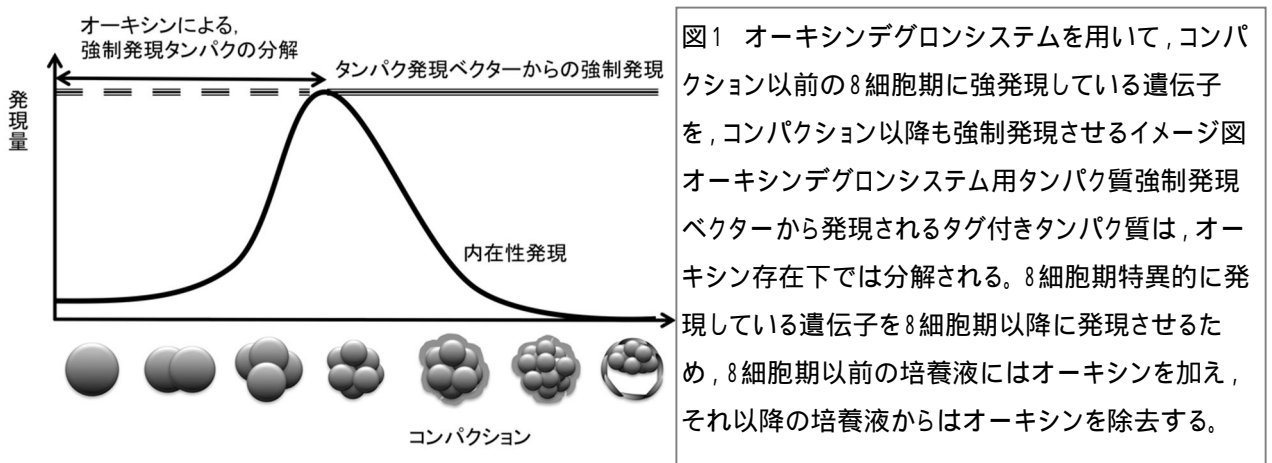
キーワード：デグロン マウス ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マウス個体の発生は様々な細胞への分化過程を含むが、最初の分化は 8 細胞期後期に起きるコンパクションをきっかけとして生じると考えられている(Sozen et al. Dev Biol 2014)。コンパクションが起きると胚の外側の細胞はタイトジャンクションやギャップジャンクションにより結合し、胚の内部が外部より遮断される。同時に細胞極性分子の分布に偏りが現れ、将来内部細胞塊(ICM)に分化する内側の細胞と栄養外胚葉(TB)に分化する外側の細胞へと分化が進行する(Tao et al. Div Biol 2012)。近年、8 細胞期胚以前に細胞の発生運命はある程度決定されているという報告がある(Torres-Padilla et al. Nature 2007, Zernicka-Goetz et al. Nat Rev Genet 2009)。しかしながら、我々が相同組み換えによる遺伝子ノックアウトマウスを作製してきた(Yoshihara, Sugihara et al. JBC 2010)経験や、他のグループからの報告から(Gertsenstein et al. PLoS ONE 2010)、100%キメラマウスの出現頻度は 8 細胞期胚使用時に高くなることがわかった。この結果は、8 細胞期胚までの細胞の運命決定はまだ完全ではなく、どの細胞も胚体外組織に分化しうることを示している。特に、胚の内側及び外側を決定するコンパクション以降に細胞の分化が進行すると考えられることから、コンパクション以前に強く発現する遺伝子をコンパクション以降のステージにおいても強発現させることで、未分化かつ増殖を続ける細胞が得られるのではないかと着想するに至った。また、タンパク質を速やかに on/off できるオーキシングロンシステム(Nishimura et al. Nat Method 2009)を用いれば、8 細胞期以降のステージのみで外来性タンパク質を強発現させることが可能と考えた。

2. 研究の目的



コンパクション以前とコンパクション以降の 8 細胞期胚における遺伝子発現を解析し、コンパクション以前の 8 細胞期で強発現する遺伝子をコンパクション以降も強発現させ続けることにより、8 細胞期様細胞株、すなわち全能性幹細胞株の作製を目指す。これを実現するために、細胞毒性が低く、オーキシンの添加によってタンパク質を速やかに on/off することができるオーキシングロンシステム(Nishimura et al. Nat Method 2009)を用いれば、初期胚においてタンパク質を時期特異的に可逆的に発現させることが可能と考えた。生体において、オーキシングロンシステムを使用した例は、当研究以前には報告されておらず、in vitro のみならず、in vivo における、タンパク質発現量制御機構の新規システムの開発にも繋げる。

3. 研究の方法

8 細胞期に特異的に発現している遺伝子を in silico で同定し、実際に 8 細胞期のコンパクシ

ン前後の遺伝子発現を比較することで 8 細胞期の全能性マーカー候補遺伝子とする。初期胚において候補遺伝子がどのような時期にどのくらいの量が発現しているかを解析する。C57BL/6 マウスの 1, 2, 4, 8 細胞期胚, 桑実胚, 胚盤胞期胚より total RNA を抽出し, 定量的 RT-PCR で調べる。

ゲノム編集を用いて初期胚の候補遺伝子にデグロンタグをノックインし、目的の胚発生ステージにおいて薬剤誘導性にタグ配列を持つタンパク質を分解あるいは発現させることにより、胚発生に及ぼす影響を評価する。

4. 研究成果

1. 生体におけるデグロンシステムの開発

マウス初期胚の状態を維持できるような遺伝子を検索することを目的として、マウス初期胚において、外来遺伝子を時期特異的に強制発現させるシステムの構築を行った。受精後 1 日目までは発現せず、2 日目より速やかに外来遺伝子を強制発現させるためにデグロンシステムを用いた系の構築を試みた。当初、オーキシンを用いた AID デグロンシステムを用いる予定であったが、ヒトおよびマウス培養細胞で発現させたところ、期待通りの発現制御が困難であることがわかった。そこで、別のデグロンシステム A の検討を行った。デグロンシステム A は、デグロンタグ T を標的タンパク質と結合した形で発現させると、試薬 X を加えることによって標的タンパク質がプロテアソームに移行し分解されるシステムである。マウス ES 細胞, マウス胚繊維芽細胞, 293T 細胞, HeLa 細胞においてデグロンシステム A を用いた場合に期待どおりの制御が可能であった。次に、デグロンシステム A をマウス受精卵に導入する条件の検討を行なった。マウス初期胚に一過性にデグロンシステムベクターを導入したところ、AID システムを用いた場合には、培養細胞と同様に、細胞毒性が強く胚が致死となる、または発生が停止する現象が認められた。そこで、デグロンシステム A を検討したところ、10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でデグロンシステム A を構築するためのプラスミドインジェクションを行っても細胞が死滅することはなかったので、デグロンシステム A を用いてマウス初期胚でのタンパク質発現およびタンパク質除去を行うことにした。デグロンシステムが機能しているかどうかのモニターは、蛍光タンパク質 mCherry または EGFP にタンパク質が除去される目印となるデグロンタグ T を付加したタンパク質 (mCherry-T または EGFP-T) の蛍光強度を蛍光顕微鏡下で観察することで行った。デグロンシステム A は AID システムに比較して毒性は低いと考えられたが、デグロンシステム A を用いた場合でも、mCherry-T または EGFP-T を発現させた受精卵は、mCherry または EGFP を発現させた受精卵より発生率が悪かったため、デグロンタグ T に一定の毒性がある可能性が示唆された。そこで、さらに低濃度でのインジェクションを行うこととしたが、本研究期間内にトランスジェニック胚を安定して得る条件を決定することができなかった。

また、初期胚の内在性ゲノムに発現マーカーを効率的に導入するためのベクターを構築した。ES 細胞やマウス胎仔繊維芽細胞、骨髄細胞などへの導入が可能であったことから、様々な細胞に簡便に発現マーカーを導入する系の立ち上げに成功した。この方法で受精卵に導入することで、8 細胞期胚に強発現している遺伝子をモニターすることにより、8 細胞期とそれ以外の細胞の区別がつけられると考えられたので、受精卵への導入を試みた。このベクターを用いて遺伝子導入を行うためには、二本鎖 DNA の導入が必須となる。これまでに受精卵への二本鎖 DNA の導入はマイクロインジェクションによって行われてきたが、より簡便な方法の確立を目指して、エレクトロポレーションによる導入を試みた。エレクトロポレーションが成功しているかどうかの指標として、プラスミド pCAG-EGFP を使用して、様々な条件を試みた結果、10-

20%の ICR 受精卵で EGFP が陽性となる条件を決定することができた。しかしながら、ゲノム編集やトランスジェニックには成功しなかった。

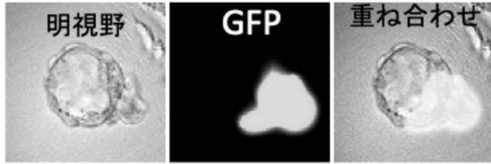


図2 1 細胞期受精卵にプラスミドpMaxGFPを導入し、3日間培養した結果、GFP陽性細胞を含む胚盤胞が得られた。

2. 初期胚において強発現している遺伝子の同定

マウス初期胚において8細胞期に特異的に発現している遺伝子を導入しようと考え、公的データベースの検索および解析を行い、4-8細胞期に発現が上昇し、桑実胚期に発現が減少する19遺伝子を抽出した。また、この時期の転写に関連すると考えられる18遺伝子を抽出した。次に、これらの遺伝子のうち、8細胞期前後に発現量が大きく変化すると考えられる遺伝子の、マウス初期胚における発現変化を定量的RT-PCRを用いて解析した。C57BL/6Jマウスより1細胞期、2細胞期、4細胞期、8細胞期、桑実胚、胚盤胞期胚を採取してRNAを精製した。qRT-PCR法によって、初期胚における遺伝子発現量を定量した。発現量補正遺伝子についても検討し、リボソーム関連遺伝子で補正をすることにした。候補遺伝子の発現量変化を解析した結果、現在のところ5遺伝子が8細胞期から桑実胚期にかけて強く発現することがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/research/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：浅野雅秀
ローマ字氏名：Asano Masahide
所属研究機関名：京都大学
部局名：医学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：50251450

(2)研究分担者

研究分担者氏名：成瀬智恵
ローマ字氏名：Naruse Chie
所属研究機関名：京都大学
部局名：医学研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：30372486

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。