

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14698

研究課題名(和文)哺乳類の全能性分子基盤における糖鎖修飾の役割

研究課題名(英文)Role of glycosylation in the molecular basis of totipotency in mammals

研究代表者

束田 裕一(TSUKADA, Yuichi)

九州大学・稲盛フロンティア研究センター・教授

研究者番号：90444801

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文): 全能性は単独の細胞が自律的に発生を開始して個体を形成する能力であり、哺乳類では着床前初期胚にのみその能力が備わっているが、その分子基盤は不明である。一方、生物の体内には多様な糖鎖が存在し、組織や細胞が持つ固有の機能の発揮に深く関わっていることが示唆されているが、その生理的役割・機能は未解明の部分が多い。本研究では、全能性の分子基盤における糖鎖修飾の機能・生物学的意義を明らかにすることを目指し、全能性の消失と関連する4細胞期胚特異的糖鎖修飾およびその制御因子の同定に成功し、同定した4細胞期胚特異的糖鎖修飾がマウス着床前初期胚発生において重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文): Totipotency is the ability of an isolated cell to produce a fertile, adult individuals. It has been considered that only isolated blastomeres of preimplantation embryos possess totipotency among various types of cells in the body of mammals. However, the molecular basis of totipotency is unclear. In this study, we successfully identified a glycosylation that is specific for 4-cell stage mouse preimplantation embryos and revealed that an identified glycosylation plays important roles in mouse preimplantation development.

研究分野：生命科学

キーワード：全能性 糖鎖修飾

1. 研究開始当初の背景

全能性 (totipotency) とは、多細胞生物一個体を形成することができる細胞の持つ能力であり、哺乳類では受精卵から桑実胚に至る前の着床前初期胚にその能力が備わっている (図 1)。よく混同される能力に ES 細胞や iPS 細胞が持つ多能性 (pluripotency) がある。多能性は多細胞生物の個体を構成する全ての細胞種に分化できる能力であるが、単独では一個体を形成することは出来ない。全能性細胞は雌の輸卵管や子宮に移植すると発生した個体を得られるのに対し、多能性細胞は移植しても発生した個体は得られないのである。哺乳類細胞における多能性の分子基盤は ES 細胞や iPS 細胞といった幹細胞が樹立されていることもあり、研究が進んでいる。しかし、全能性の分子基盤については、転写制御やクロマチン構造制御を中心に研究が進められているものの、ほとんど解明が進んでいない。

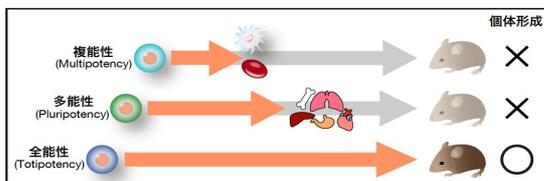


図 1: 細胞の全能性

一方、生命活動に極めて重要な役割を果たす生体高分子物質 (鎖) は生命鎖と呼ばれ、第一の生命鎖は核酸、第二の生命鎖はタンパク質、そして第三の生命鎖が糖鎖である。生物の体内には多様な糖鎖が存在し、組織や細胞が持つ固有の機能の発現に深く関わっていることが示唆され、その生理的役割の解明が期待されている。しかしながら、核酸やタンパク質に比べ糖鎖は非常に多様で解析が困難であり、機械的な合成技術もあまり確立されていないことから、descriptive な研究成果の報告が多く生理的役割・機能は未解明の部分が多い。研究代表者らは、マウスにおいて卵と着床前初期胚における糖鎖修飾プロファイル調べ、4細胞期胚のタンパク質が特異的な糖鎖修飾状態であることを見出した (図 2)。

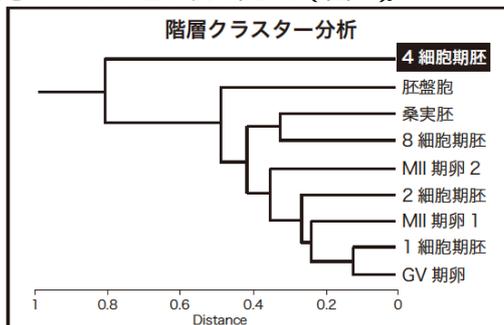


図 2: 4細胞期特異的な糖鎖修飾

マウスでは 4細胞期胚までが全能性を有し、その後失われることから、4細胞期胚特異的

なタンパク質の糖鎖修飾状態が全能性の分子基盤に深く関与する可能性が高い。

2. 研究の目的

ES細胞や iPS細胞が持つ多能性は個体を構成する全ての細胞種に分化できるが、自律的な個体形成はできない。一方、全能性は自律的な個体形成ができる細胞の能力であり、哺乳類では受精卵から桑実胚に至る前の着床前初期胚にのみその能力が備わっている。しかし、全能性の分子基盤は多能性に比べ解明が進んでいない。研究代表者らはマウス着床前初期胚における糖鎖修飾プロファイル調べ、4細胞期胚が特異的な糖鎖修飾状態であることを見出した。マウスでは4細胞期胚までが全能性を有し、その後失われることから、4細胞期胚特異的な糖鎖修飾状態が全能性の分子基盤に深く関与する可能性が高い。そこで本研究では、全能性の消失と関連する4細胞期胚特異的な糖鎖修飾が全能性の分子基盤において果たす役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 4細胞期特異的な糖鎖修飾の局在解析

4細胞期特異的な糖鎖修飾を認識する蛍光標識したレクチン (糖鎖に結合活性を示す抗体以外のタンパク質) を用いた胚の蛍光染色により、マウス着床前初期胚における糖鎖修飾の局在を調べた。

(2) マウス着床前初期胚トランスクリプトームを用いた4細胞期特異的な糖鎖修飾の責任分子探索

卵母細胞 (GV期、MII期)、初期胚 (1、2、4、8細胞期胚、桑実胚、胚盤胞期胚) の RNA-seq 解析により、これらのトランスクリプトームを明らかにし、その情報解析から4細胞期胚特異的な糖鎖の合成に関わる候補酵素を選定した。

(3) ノックアウト着床前初期胚の作製方法の確立

これまで胚性遺伝子の機能欠損は主に卵母細胞や受精卵への siRNA のインジェクションによるノックダウンが用いられてきたが、実験操作および機能欠損の効果を踏まえると汎用性が高いとは言えない状況である。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いて、100% の効率でマウス着床前初期胚において標的遺伝子をノックアウトする方法を確立した。

(4) 4細胞期特異的な糖鎖修飾の責任分子の同定

マウス着床前初期胚におけるトランスクリプトームの情報解析により選定した糖鎖の合成に関わる候補酵素について、CRISPR/Cas9 システムを用いて候補酵素のノックアウトをマウス受精卵において行い、遺伝子の欠損により4細胞期特異的な糖鎖修飾

が減少する糖鎖合成酵素を責任分子として同定した。

(5) 4 細胞期特異的な糖鎖修飾の生理的意義の解明

4 細胞期特異的な糖鎖修飾の責任分子であることが示唆された糖鎖合成酵素を CRISPR/Cas9 システムを用いて欠損させ、着床前初期胚発生への影響を観察した。

4. 研究成果

(1) 4 細胞期特異的な糖鎖修飾の局在解析

4 細胞期特異的な糖鎖修飾を認識するレクチンを用いて、マウス着床前初期胚における糖鎖修飾の局在を調べたところ、透明体と胚体の両方に存在していることを明らかにした。さらに、胚体では 2 細胞期までは細胞膜の内側に局在しているが、4 細胞期で細胞質内に移動することを明らかにした。

(2) マウス着床前初期胚トランスクリプトームを用いた 4 細胞期特異的な糖鎖修飾の責任分子探索

まず、既知の知見から 4 細胞期胚特異的な糖鎖の合成に関与する酵素を選定した。次に、卵母細胞 (GV 期、MII 期)、初期胚 (1、2、4、8 細胞期胚、桑実胚、胚盤胞期胚) のトランスクリプトームを明らかにし、4 細胞期胚特異的な糖鎖の合成と遺伝子発現パターンが関連する酵素を候補因子として選定した。

(3) ノックアウト着床前初期胚の作製方法の確立

これまで胚性遺伝子の機能欠損には、主に卵母細胞や受精卵への siRNA のインジェクションによるノックダウンが用いられてきた。研究代表者らも同様の方法で胚性遺伝子の機能欠損を試みたが、実験操作および機能欠損の効果を踏まえると、汎用性が高いとは言えないことが明らかとなった。そこで、これまでに報告されている CRISPR/Cas9 システムを用いた効果的なノックアウト法 [引用文献] を組み合わせ、そのシステムをマウス受精卵にエレクトロポレーションにより導入 [引用文献] することで、100% のマウス胚で標的遺伝子をノックアウトする方法を確立した。

(4) 4 細胞期特異的な糖鎖修飾の責任分子の同定

マウス着床前初期胚におけるトランスクリプトームの情報解析により選定した糖鎖の合成に関わる候補酵素を、研究代表者らが確立した CRISPR/Cas9 システムを用いてマウス受精卵においてノックアウトし、遺伝子の欠損により 4 細胞期特異的な糖鎖修飾が減少する糖鎖合成酵素を同定することに成功した。

(5) 4 細胞期特異的な糖鎖修飾の生理的意義の

解明

4 細胞期特異的な糖鎖修飾の責任分子であることが示唆された糖鎖合成酵素を CRISPR/Cas9 システムを用いて欠損させ、着床前初期胚発生への影響を観察したところ、発生異常および遅延が観察され、4 細胞期特異的な糖鎖修飾が胚発生に重要な役割を果たしていることが示唆された。

多能性の分子基盤は ES 細胞や iPS 細胞に代表される様々な幹細胞が単離または人工的に樹立されていることもあり、研究が進んでいるものの、全能性の分子基盤は解明があまり進んでいない。現在、全能性の分子基盤については、転写制御やクロマチン構造制御を中心に研究が進められているのに対し、本研究では全能性の分子基盤の解明に、全能性の消失と関連する糖鎖修飾の機能解析により取り組み、糖鎖修飾が着床前初期胚発生に重要な役割を果たしていることを明らかにした。今後も全能性の分子基盤解明を目指す研究を推進する予定であるが、そのためには転写制御やクロマチン構造制御の研究からのアプローチでは不十分であると考えており、本研究を進展させた糖鎖修飾からのアプローチによる進展が期待できる。

<引用文献>

- Aida T., Chiyo K., Usami T., Ishikubo H., Imahashi R., Wada Y., Tanaka K.F., Sakuma T., Yamamoto T., and Tanaka K.: Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice. *Genome Biol.*, 16 (2015) doi: 10.1186/s13059-015-0653-x.
- Sunagawa GA., Sumiyama K., Ukai-Tadenuma M., Perrin D., Fujishima H., Ukai H., Nishimura O., Shi S., Ohno R.I., Narumi R., Shimizu Y., Tone D., Ode K.L., Kuraku S., and Ueda H.R.: Mammalian Reverse Genetics without Crossing Reveals Nr3a as a Short-Sleeper Gene. *Cell Rep.*, 14 (2016) 662-677.
- Hashimoto M., Yamashita Y., and Takemoto T.: Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse. *Dev. Biol.*, 418 (2016) 1-9.

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 4 件)

- Y. Nakajima, M. Gotoh, and Y. Tsukada, Developmental potential of single blastomere, World Congress of

Reproductive Biology 2017, 2017

M. Maemura, Y. Nakajima, Y. Ohkawa,
and Y. Tsukada, Developmental
potential of single blastomere
derived from pre-implantation embryo
in mouse, Consortium of Biological
Science 2017, 2017

束田裕一、マウス着床前初期胚に存在す
る全能性細胞の評価、さきがけ「エピジ
ェネティクスの制御と生命機能」第 1
回終了領域研究会、2016 年

中島友紀、束田裕一、マウス着床前初期
胚が有する全能性の評価、第 39 回日本
分子生物学会、2016 年

〔図書〕(計 1 件)

束田裕一(分担執筆)、羊土社、実験医学、
2017、2785-2789

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.tsukada-lab.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

束田 裕一 (TSUKADA, Yuichi)
九州大学・稲盛フロンティア研究センター・
教授
研究者番号：90444801