

平成22年5月24日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20770170
 研究課題名 (和文)
 多能性関連分子 Oct 3 / 4 が制御するマウス始原生殖細胞の分化決定システムの解明
 研究課題名 (英文)
 Elucidation of systems for mouse PGC specification regulated by pluripotent-associated gene Oct3/4
 研究代表者 岡村 大治 (OKAMURA DAIJI)
 東北大学・加齢医学研究所・助教
 研究者番号：80393263

研究成果の概要 (和文) : 分化決定期に始原生殖細胞で発現を開始する分子をスクリーニングした結果、Rest 遺伝子が見出された。Rest 遺伝子欠損胚を解析を行った結果、Rest 欠損胚では発生初期 (移動期) における始原生殖細胞の数が、正常胚と比較して、有意に減少していることを見出した。分化決定後の始原生殖細胞の増殖には影響が認められず、移動期において、アポトーシスによる細胞死が引き起こされていることが原因であることが分かった。

研究成果の概要 (英文) ; We had screened the genes were first detected their expression in just specified primordial germ cells, that resulted in identification of Rest/NRSF gene. So we generated knock-out mice for Rest gene. The results showed that the number of primordial germ cells at migrating stage in Rest mutant embryos significantly decreased, compared with that in wild embryos, it caused by apoptotic cell death, but not defect of proliferation rate of primordial germ cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：生殖細胞、始原生殖細胞、遺伝子欠損マウス、多能性、転写抑制

1. 研究開始当初の背景

唯一生殖細胞だけが持つ「全能性獲得の分子機構」については、ほとんど理解されていない。その中であって、多能性関連分子である Oct3/4 が、胚発生過程で生殖系列特異的にその発現が維持されるという事実は、生殖細胞

における全能性獲得の分子機構を考える上で、非常に興味深い現象である。最近の我々の研究から、始原生殖細胞の前駆細胞が分化決定を受ける際に、Oct3/4 が前駆細胞内で必須な役割を担っていることを突き止めたが、具体的な機能を理解するには至っていない

った。一方、始原生殖細胞への**分化決定を担う制御因子群**を同定すべく、分化決定直後の始原生殖細胞と、その前駆細胞とで発現遺伝子の比較を行ったところ、分化決定期に始原生殖細胞で発現を開始する分子として、**Rest** 遺伝子が同定された。興味深いことに、**Oct3/4** によって直接発現制御を受けることが明らかになっている分子であった。

多能性関連分子である Oct3/4 や Nanog は、移動期の始原生殖細胞において、その生存に必須な役割を担っていることが明らかとなっており、生殖細胞における多能性関連分子は、その発現のみならず、機能的にも重要であることが分かっている。しかし現在までに「全能性獲得(リプログラミング)」における役割については全く分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、**多能性関連分子 Oct3/4 が制御するマウス始原生殖細胞の分化決定システムの解明**を目的とする。同定された Rest 遺伝子の始原生殖細胞の分化決定における機能解析を通して、**多能性関連分子 Oct3/4 の生殖細胞での機能的役割**を探る。

これまでに我々は、始原生殖細胞において、その分化決定後に特異的に発現を開始する分子を探索することで、始原生殖細胞が周りの体細胞と一線を画し、後の生殖細胞だけで引き起こされる「全能性獲得(リプログラミング)」につながる基幹分子機構の解明を試みた。分化決定直後の始原生殖細胞と、その前駆細胞とで発現遺伝子の比較を行ったところ、分化決定期に始原生殖細胞で特異的に発現を開始する分子として、転写抑制因子である Rest/NRSF 遺伝子が同定された。興味深い事に、Rest 遺伝子は多能性維持に関わる分子とのつながりが強く示唆される分子であった。

Rest (RE1-silencing transcription factor) は、ES 細胞において Oct3/4 による直接的な発現制御を受けていることが明らかとなっており、またその発現制御領域には、Oct3/4 と Nanog の結合モチーフを持つ。Rest は生体内において、クロマチンリモデリングファクターや酵素群を発現制御領域にリクルートする「hub 因子」としての役割を担っており、またヒトやマウスのゲノム上に、2,000カ所もの Rest 結合配列が見出されており、神経特異的な遺伝子のみならず、グローバルな転写抑制に機能している可能性が示唆されている。

3. 研究の方法

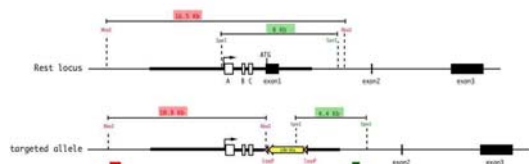
Rest 遺伝子の遺伝子欠損マウスを作製し、その欠失胚における始原生殖細胞への影響などを、正常胚と比較しながら解析する。

4. 研究成果

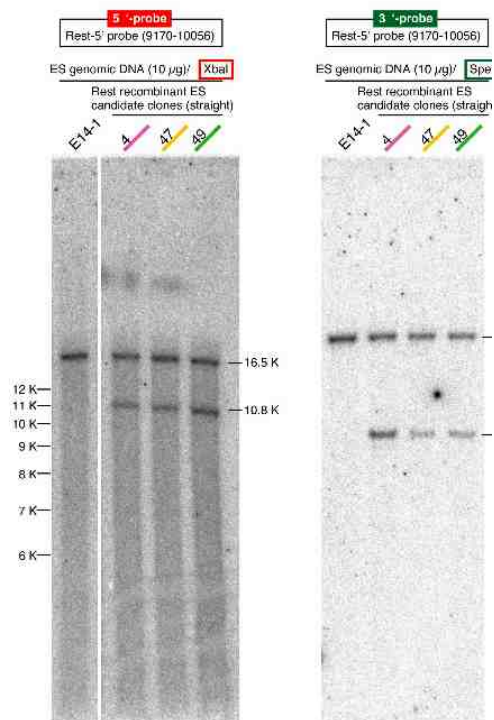
今回我々は、Rest 遺伝子が分化決定を受けた直後から発生の後期に至るまで、始原生殖細胞

において強い発現を示すことを明らかにした。また Rest 遺伝子欠失マウスを作製し、発生期における始原生殖細胞への影響を解析したところ、Rest 遺伝子欠失胚では正常胚と比較して、移動期中期以降の始原生殖細胞の数が有意に減少していることを見出した。そして、その原因がアポトーシスによる細胞死であることが明らかになった。

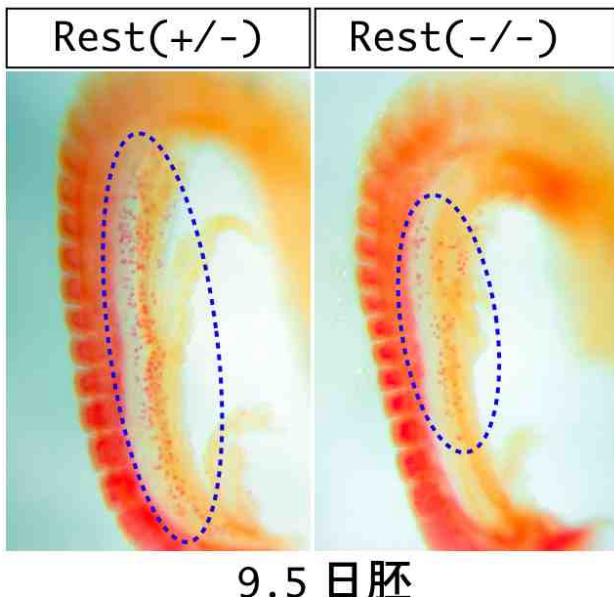
(1) Rest 遺伝子相同組み換えデザイン



(2) Rest 遺伝子相同組み換え ES 細胞を同定した際のサザンハイブリダイゼーション図

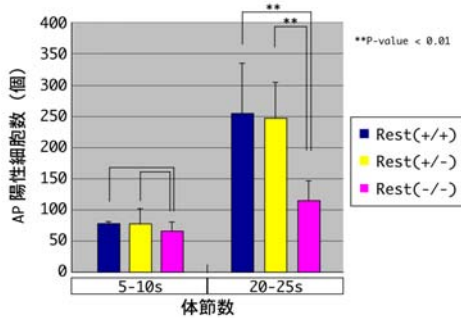


(3) Rest 遺伝子欠失胚におけるアルカリフォスファターゼ染色像 (9.5 日胚)

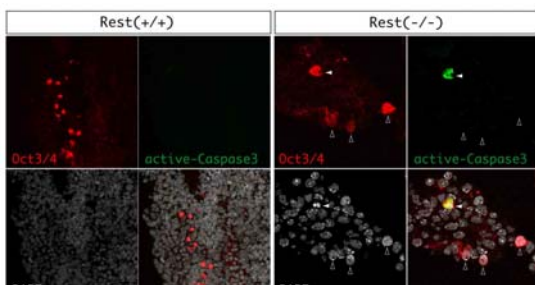


9.5 日胚

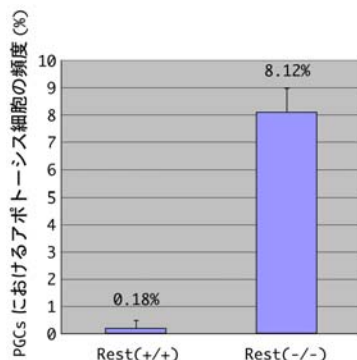
(4) Rest 遺伝子欠失胚での PGC 数の減少



(5) Rest 遺伝子欠失胚の始原生殖細胞におけるアポトーシスによる細胞死

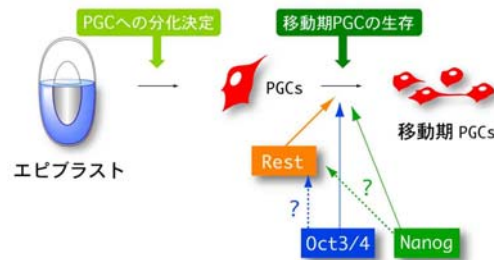


(6) 始原生殖細胞におけるアポトーシス細胞の Rest 遺伝型間による出現頻度差



分化決定後の始原生殖細胞の増殖には影響が認められず、移動期において、アポトーシスによる細胞死が引き起こされていることが原因であることが分かった。

(7) 移動期始原生殖細胞における Rest 機能モデル



Rest 遺伝子欠失胚では、移動期中期以降の PGCs の数が有意に減少しており、その原因は、アポトーシスによる細胞死であることを見出した。Rest 遺伝子は ES 細胞内において、Oct3/4 による直接的な発現制御を受けており、またその発現制御領域には、Oct3/4 と Nanog の結合モチーフを持つ。その Oct3/4 や Nanog もまた、アポトーシスを抑制することによる移動期 PGCs の生存に、必須な役割を担っていることから、Rest との遺伝的な関連性が示唆される。またヒトやマウスのゲノム上に、2,000 カ所もの Rest 結合配列が見出されており、神経特異的な遺伝子やアポトーシス関連分子のみならず、グローバルな転写抑制に機能している可能性が考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. D. Okamura, Y. Tokitake, H. Niwa and Y. Matsui.

「Requirement of Oct3/4 function for germ cell specification.」

Dev Biol. 2008 May;317(2):576-584. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. Okamura et al., *Frontiers in Developmental Biology*, September 13-17, 2008, Giens, Southern France
「Requirement of Oct3/4 function for germ cell specification.」

2. 岡村大治、その他、
「多能性関連分子が制御するマウス始原生殖細胞の分化決定システムの解明」
シンポジウム「仙台・動物発生コロキウム」、
2010年1月22日、仙台・東北大学

[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:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 大治 (OKAMURA DAIJI)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号: 80393263

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし