

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号： 14301  
 研究種目： 若手研究(S)  
 研究期間： 2009～2013  
 課題番号： 21677003  
 研究課題名(和文) 多彩な細胞系譜の運命決定・恒常性を制御する転写因子 B  
 l i m p 1 の統合的機能解明  
 研究課題名(英文) **Unveiling the mechanism of action of Blimp1, a transcriptional  
 regulator that governs fates and homeostasis of diverse cell lineage**  
 研究代表者 齋藤 通紀 (SAITOU, Mitinori)  
 京都大学・大学院医学研究科・教授  
 研究者番号： 80373306  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 76,100 千円、(間接経費) 22,830 千円

研究成果の概要(和文)：本研究では、少数細胞のエピゲノム解析法の樹立、試験管内生殖細胞誘導法の確立、生殖細胞系列における薬剤依存的遺伝子破壊マウスの樹立を行い、生殖細胞系列の決定過程に必須の役割を果たす BLIMP1 の作用機序の解析とその過程に伴うエピゲノム変化の動態を解析した。また発生過程の小腸上皮など様々な BLIMP1 発現細胞における BLIMP1 の作用機序を探索し、多彩な細胞系譜における BLIMP1 の作用機序を統合的に解析しつつある。

研究成果の概要(英文)：This study identified the mechanism of action of BLIMP1 and the epigenome dynamics for germ cell specification and development, with the establishment of a ChIP-seq method from a small number of cells, of in vitro primordial germ cell induction method, and of a drug-inducible gene-knockout strain during germ cell development. This study also explored the mechanism of action of BLIMP1 in various cell types including developing intestinal epithelial cells where BLIMP1 is expressed, and is uncovering BLIMP1 function in an integrated fashion.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：発生・分化、遺伝子、ゲノム、シグナル伝達、再生医学

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の運命決定・機能維持機構の解明は、生命科学の中で最も重要な課題の一つであり、多能性幹細胞や組織幹細胞を起点に医学的有用細胞を調整する際に不可欠な基盤情報を提示する。細胞の運命及び機能はそれぞれの細胞に特異的な転写因子群とそれらの結合部位を規定するエピゲノム状態(クロマチンの後成的修飾状態)により制御される。ところが実際の生体における細胞の運命決定・機能維持過程においてこの両者を高い解像度で解明した研究は極めて少ない。これは、実際の生体における細胞運命決定や機能維持が少数の細胞を起点にして起こる現象で、これまで少数の細胞においてこの両者を定量的に解析する技術が存在しなかったことに起因する。

### 2. 研究の目的

少数細胞(-1000)のエピゲノム状態を Chromatin immunoprecipitation-DNA Sequence 法(ChIP-seq)により定量的に測定する技術を開発し、その技術を用いて、始原生殖細胞(Primordial germ cells: PGCs)を含む多彩な細胞の運命決定・恒常性維持に必須の働きをする転写因子 BLIMP1 の作用発現機序を生殖細胞系列と B 細胞系列などをモデルに解明、それにより細胞の運命決定・機能維持を可能とする遺伝学的・後成遺伝学的・細胞生物学的機序を統合的に理解することを目的とする。

### 3. 研究の方法

少数細胞からの ChIP-seq 法の開発においては、多量の細胞( $10^7$ 個)から既存の方法にて ChIP-seq を行った実験結果と、少数細胞から ChIP を行い得られた DNA を増幅し sequence を行った結果を定量的に比較する。

*EGFP-Blimp1* 及び *BT-Blimp1* ノックインマウス及び胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cells: ESCs) を樹立し、BLIMP1 のゲノムワイドな結合部位を同定する基盤とする。

ESCs から試験管内で生殖細胞形成過程を再現する系を確立し、生殖細胞形成過程に伴うヒストン修飾、DNA メチル化の動態を解析する基盤とする。

薬剤依存的に生殖系列特異的遺伝子組み換えを可能とするマウス、*Stella-MCM* マウスを樹立し、生殖系列の増殖・機能維持における BLIMP1 の機能を解明する。

形質細胞や視細胞、小腸上皮など生殖再細胞系譜以外における BLIMP1 のゲノムワイドな結合部位を同定し、異なる細胞系譜の機能維持における BLIMP1 の作用機序を解明する。

#### 4. 研究成果

タグ (EGFP) を標的とした少数細胞からの高効率 ChIP 法のプロトコル確立を目指した。ChIP プロトコルを改善し、反応溶液の体積の縮小、単一の反応チューブの使用、担体やキャリアの最適化による非特異的吸着の最小化と反応効率の向上を行った。また免疫沈降されたゲノム DNA 断片の、独自に考案したプライマーペアによる網羅的かつ高精度な増幅を試みた。

その結果、 $10^7$  細胞から ChIP したものを希釈して得られる  $10^4$  細胞相当の DNA、 $10^4 \sim 10^5$  細胞から直接 ChIP して得られる DNA を高い定量性 (Q-PCR さらに *massively parallel sequence* により比較・検証) で増幅出来る方法論の開発に成功した。

本法により BLIMP1 のゲノムワイドな結合部位を多彩な細胞系譜で決定するため、*EGFP-Blimp1* 及び *BT-Blimp1* ホモノックインマウス、ホモノックイン ESCs を樹立した。*EGFP-Blimp1* ノックインマウスは、生殖細胞系譜や発生過程の小腸上皮、網膜視細胞などで EGFP-BLIMP1 を正しく発現することを確認した。

PGCs は非常に少数の細胞 (~20-40 個) として決定されるので、PGC 決定過程における BLIMP1 の結合部位及びエピゲノム変化を生体内の材料を用いて ChIP-seq により決定するのは本研究により開発した方法論を用いても非常に困難であると考えられた。そこで、試験管内で生殖細胞形成過程を再現する系の開発に取り組んだ。その結果、ESCs を出発点として、エピブラスト様細胞 (Epiblast-like cells: EpiLCs) を誘導し、さらに PGC 様細胞 (PGC-like cells: PGCLCs) を誘導することに成功した。EpiLCs から PGCLCs が形成される過程の遺伝子発現変化は、エピブラストから PGCs が形成され

る過程の遺伝子発現変化と高い定量性で合致し、また PGCLCs は PGCs に似たエピゲノム状態を獲得した。重要なことに、PGCLCs を、生殖細胞を有さない *W/W<sup>o</sup>* マウスの新生仔精巣に移植すると、健全な精子に分化し、それら精子は健全な子孫に貢献した。また、メス ESCs から誘導したメス PGCLCs を胎児卵巣由来の体細胞と凝集培養し (再構成卵巣)、それらをヌードマウスの卵巣皮膜下に移植すると、PGCLCs は成熟卵子に分化し、それら卵子は試験管内成熟、試験管内受精を経て、健全な子孫に貢献した。精子・卵子分化能を有する PGCLCs は複数の ESCs、さらには iPSCs から誘導可能であり、本研究により、エピブラストから PGCs 形成に至る過程が初めて試験管内で再現されたことになった (Hayashi et al., *Cell*, 146, 519-532, 2011; *Science*, 338, 971-975, 2012)。さらに、本誘導法を用いることで、PGCs の誘導に十分な機能を発揮する転写因子として、BLIMP1, PRDM14, TFAP2C を同定することに成功し、PGCs が形成される際に BLIMP1 がその転写に及ぼす直接の影響を解明した (Nakaki et al., *Nature*, 501, 222-226, 2013)。さらに、PGCs において *Blimp1* や *Prdm14* の発現を誘導する因子として T を同定した (Aramaki et al., *Dev. Cell*, 27, 516-529, 2013)。

開発した ChIP-seq 法、試験管内 PGCLC 誘導法を用いて、PGCLC 誘導過程に伴う BLIMP1 及び T のゲノムワイドな結合部位の同定とエピゲノム変化 [転写に正負の影響を与えることが知られている様々なヒストン修飾 (H3K4me3, H3K27ac, H3K27me3, H3K9me2)] の解析を行った。その結果、PGC(LC) 形成過程に伴う BLIMP1 及び T の結合部位、ヒストン修飾変化の変化を明らかにすることに成功し、現在、論文作成中である。

*Blimp1* の PGC 形成以降の機能を解明するため、第一に PGC 特異的に高効率でコンディショナルノックアウトを誘導出来るマウス系統の樹立を推進した。生殖系列特異的遺伝子 *Stella/Pgc7* のプロモーター下に、改変されたエストロゲン受容体 (MER) と Cre recombinase を融合させた MER-Cre-MER (MCM) を発現するトランスジェニックマウスを作成した。本マウスでは *Stella* が発現される初期胚、PGCs、発育過程の卵母細胞で MCM が発現し、投与する Tamoxifen 依存的に MCM が核内に移行し、floxed region を excise out する。実際に本マウスを用いると、初期胚、PGCs、発育過程の卵母細胞で、非常に特異的に、高効率 (-80%) で、Tamoxifen 依存的に遺伝

子組み換えが誘導されることが示された (Hirota et al., *Biology of Reproduction*, 85, 367-377, 2011)。

本マウスと *Blimp1* コンディショナルノックアウトマウス (Alexander Tarakhovsky 博士より分与) を交配し、発生 9.5 日目 (E9.5) 及び E11.5 で Tamoxifen を投与することで、*Blimp1* の生殖系列の増殖・機能維持における役割を検証した。その結果、BLIMP1 が PGC 形成後もその発生過程で重要な役割を果たすことを示すデータを得た。具体的には、E9.5 にて *Blimp1* をノックアウトすると、雌雄ともに E12.5 までに PGCs はアポトーシスにより死滅し、E11.5 にてノックアウトすると、オスでは E14.5、メスでは E17.5 までに生殖細胞数の減少が起きることが明らかとなった。現在 *Blimp1* ノックアウトにより誘導される転写制御異常を解析中である。

さらに生体内の様々な細胞系譜における BLIMP1 のゲノムワイドな結合部位を同定するため、*EGFP-Blimp1* ホモノックインマウスから PGCs、発生過程の小腸上皮、網膜視細胞、形質細胞を単離し、それら細胞群の遺伝子発現と BLIMP1 結合部位の解析を推進中である。

これらの成果を総合的に解析し、細胞の運命決定・機能維持過程における BLIMP1 の役割を統合的に理解する。

#### 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 35 件)

Aramaki, S., Hayashi, K., Kurimoto, K., Ohta, H., Yabuta, Y., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., Kato, Y., Shirahige, K., and Saitou, M. A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants, *Developmental Cell*, 27, 516-529, (2013).

DOI: 10.1016/j.devcel.2013.11.001

Nakaki, F., Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Yabuta, Y., and Saitou, M. Induction of the mouse germ cell fate by transcription factors in vitro. *Nature*, 501, 222-226, (2013).

DOI: 10.1038/nature12417

Yamaji, M., Ueda, J., Hayashi, K., Ohta, H., Yabuta, Y., Kurimoto, K., Nakato, R., Shirahige, K., and Saitou, M. PRDM14 ensures naïve pluripotency through dual regulation of signaling and epigenetic pathways in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 12, 368-382, (2013).

DOI: 10.1016/j.stem.2012.12.012

Kagiwada, S., Kurimoto, K., Hirota, T., Yamaji, M., and Saitou, M. Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *The EMBO Journal*, 32, 340-353, (2013).

DOI: 10.1038/emboj.2012.331

Hayashi, K., Ogushi, S., Kurimoto, K., Shimamoto, S., Ohta, H., and Saitou, M. Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science*, 338, 971-975, (2012).

DOI: 10.1126/science.1226889

Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., and Saitou, M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, 146, 519-532, (2011).

DOI: 10.1016/j.cell.2011.06.052

Hirota, T., Ohta, H., Shigeta, M., Niwa, H., and Saitou, M. Drug-inducible gene recombination by the *Dppa3-MER Cre MER* transgene in the developmental cycle of the germ cell lineage in mice, *Biology of Reproduction*, 85, 367-377, (2011).

DOI: 10.1095/biolreprod.110.090662

Yabuta, Y., Ohta, H., Abe, T., Kurimoro, K., Chuma, S., and Saitou, M. TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly and spermiogenesis in mice. *The Journal of Cell Biology*, 192, 781-795, (2011).

DOI: 10.1083/jcb.201009043

Yamaji, M., Tanaka, T., Shigeta, M., Chuma, S., Saga, Y., and Saitou, M. Functional reconstruction of Nanos3 expression in the germ cell lineage by a novel transgenic reporter reveals distinct subcellular localizations of Nanos3. *Reproduction*, 139, 381-393, (2010).

DOI: 10.1530/REP-09-0373

Ohinata, Y., Ohta, H., Shigeta, M., Yamanaka, K., Wakayama, T., and Saitou, M. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell*, 137, 571-584, (2009).

DOI: 10.1016/j.cell.2009.03.014

[学会発表] (計 79 件)

Saitou, M. Mechanism and reconstitution in vitro of germ cell development in mice. Gordon Research Conference “Reprogramming Cell Fate” Houston, USA  
平成 26 年 3 月 3 日

Saitou, M. Mechanism and reconstitution in vitro of germ cell development in mice. SSR 2013 Annual Meeting Montréal, Canada  
平成 25 年 7 月 25 日

Saitou, M. Mechanism and reconstitution in vitro of germ cell development in mice. ISSCR 11<sup>th</sup> Annual Meeting Boston, USA  
平成 25 年 6 月 15 日

Saitou, M. Mechanism and reconstitution in vitro of germ cell specification in mice. EMBO/EMBL “From Functional Genomics to Systems Biology” meeting Heidelberg, Germany  
平成 24 年 11 月 18 日

Saitou, M. Mechanism and reconstitution in vitro of germ cell specification in mice. EMBO/EMBL Symposium Heidelberg, Germany  
平成 24 年 10 月 16 日

Saitou, M. Mechanism and reconstitution in vitro of germ cell specification in mice. The 4th EMBO meeting Nice, France  
平成 24 年 9 月 25 日

Saitou, M. Towards in vitro reconstitution of mammalian germ cell development. ISSCR 10<sup>th</sup> Annual Meeting 横浜  
平成 24 年 6 月 14 日

Saitou, M. Mechanism and reconstitution in vitro of germ cell specification in mice Stem Cells in Development and Disease Max-Delbrück-Center, Berlin-Buch, Germany  
平成 23 年 9 月 12 日

Saitou, M. Germ cell specification in mice in vivo and in vitro. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA

平成 22 年 10 月 5 日

Saitou, M. Germ cell specification in vivo and in vitro. ISSCR 8<sup>th</sup> Annual Meeting San Francisco, USA  
平成 22 年 6 月 18 日

〔図書〕 (計 4 件)

Hayashi, K., and Saitou, M. Stepwise differentiation from naïve state pluripotent stem cells to functional primordial germ cells through an epiblast-like state. *Methods in Molecular Biology*, 1074, 175-183, (2013).  
DOI:

Saitou, M., and Yamaji, M. Primordial germ cells in mice. *CSH Perspectives in Biology*, 4, (2012).  
DOI:

Kurimoto, K., and Saitou, M. A global single-cell cDNA amplification method for quantitative microarray analysis. *Methods in Molecular Biology*, 687, 91-111, (2011).  
DOI:

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称 : METHOD OF INDUCING DIFFERENTIATION FROM PLURIPOTENT STEM CELLS TO GERM CELLS  
発明者 : 斎藤通紀、中木文雄  
権利者 : 国立大学法人京都大学  
種類 : 特許  
番号 : 61/771, 619  
出願年月日 : 2013 年 3 月 1 日  
国内外の別 : 国外 (米国)

名称 : METHOD OF INDUCING DIFFERENTIATION FROM PLURIPOTENT STEM CELLS TO GERM CELLS  
発明者 : 斎藤通紀、林克彦  
権利者 : 国立大学法人京都大学  
種類 : 特許  
番号 : 61/373, 563  
出願年月日 : 2010 年 8 月 13 日  
国内外の別 : 国外 (米国)

○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

[http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/doctoral\\_course/r-003/](http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/doctoral_course/r-003/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

斎藤 通紀 (SAITOU, Mitinori)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：80373306

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：