

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H05755

研究課題名（和文）核の再プログラム化のin vitro再構成

研究課題名（英文）Reconstitution of totipotent nuclei in a test tube

研究代表者

新富 圭史（Shintomi, Keishi）

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員

研究者番号：60462694

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 72,430,000円

研究成果の概要（和文）：動物の受精卵では、核ゲノムの制御様式が初期胚特異的なものへと変換され、あらゆる細胞に分化する準備が整う。本研究では、卵細胞質由来のタンパク質が、どのようにして核の再プログラム化を促進するのかを検討した。まず、カエル卵抽出液を用いた無細胞系を改変して初期胚での転写活性化や体細胞移植胚での核の動態を再現することにより、それぞれの過程において中心的な役割を果たすタンパク質の役割を明らかにした。さらに、精製タンパク質を用いて、核の再プログラム化に不可欠な素過程を試験管内で再構成するための技術基盤を確立した。これらの結果は、全能性獲得過程の生化学的理解を大きく前進させるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のゲノム科学的手法の飛躍的な進展により、核の再プログラム化に伴うエピゲノム変化への理解は飛躍的に進んだ一方で、再プログラム化を実行する卵由来のタンパク質の同定やその機能解析は大きく遅れている。また、体細胞核移植によるクローン作出が実用化されているにもかかわらず、その成功率は依然として低いままである。本研究で得られた成果は、これらの未解決の課題に対して、生化学的視点から解答をもたらすものである。

研究成果の概要（英文）：In a fertilized egg of animals, the regulatory mode of the gamete genome is converted to an early embryo-specific one, thus allowing differentiation into various cells in the whole body. In this study, we have examined mechanistically how factors derived from egg cytoplasm promote nuclear reprogramming. Our attempt to modify cell-free assays of frog egg extracts revealed the role of proteins essential for zygotic genome activation and somatic cell nuclear transfer. We also established the protocols for in vitro reconstitution of these processes using purified factors. In sum, these results undoubtedly broaden our biochemical understanding of the process of totipotency acquisition.

研究分野：生化学

キーワード：受精 核移植 染色体 カエル卵抽出液 再構成

1. 研究開始当初の背景

受精によって発生が開始すると、長期間にわたって細胞周期を停止していた精子由来のゲノム DNA は複製され、卵子由来のゲノムと融合したのち、卵割に伴って娘細胞(割球)へと分配される。さらに、接合体ゲノムでは転写が開始され、あらゆる組織へと分化するための準備が整う。このように全能性が獲得されるためには、卵由来因子の作用によって、核クロマチンの制御様式を初期胚に特徴的なものへと転換する過程(以降、「核の再プログラム化」と呼ぶ)が必要である。興味深いことに、除核卵に体細胞核を移植した胚(いわゆるクローン胚)が個体へ発生できることから、再プログラム化を誘起する活性はおもに「卵の細胞質」に存在すると考えられる(Jullien et al, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011)。

近年のゲノム科学的手法の飛躍的な進展により、核の再プログラム化に伴うエピゲノム変化への理解は飛躍的に進んだ。その一方で、卵細胞質由来のどのタンパク質がエピゲノム変化に中心的な役割を果たすのか、それらの機能がどのように制御されているのか、などの多くの疑問が残されていた。また、体細胞核移植がクローン動物を作るための唯一の方法として多用されているにもかかわらず、クローンの正常発生を保障する分子メカニズムは完全に理解されていなかった。こうした背景から、再プログラム化の素過程を忠実に再現し、精緻な生化学的操作が施せる実験系の開発が、当該研究分野における喫緊の課題となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、「カエル卵抽出液を用いた無細胞系」や「精製タンパク質を用いた再構成系」など、研究代表者が独自に発展させてきた *in vitro* 実験系を駆使して、従来の解析方法では顧みられることのなかった核の再プログラム化の生化学的背景の理解を試みた。具体的には、(1) 体細胞核移植の際にドナー核で DNA 複製が再開される過程、(2) 受精後の初期胚の核で転写が開始される過程、それぞれに必要な因子の同定を目指した。また、これらの研究の成果に基づき、(3) 精製タンパク質を使って上記の過程を試験管内で再構成することにも挑戦した。また、「核を作って調べる」というユニークな研究戦略を通じて、核の再プログラム化の分子メカニズムを徹底的に理解することで、「全能性プログラム」研究領域の発展に貢献することも目指した。

3. 研究の方法

研究代表者(新富圭史、理研)は、カエル卵抽出液の無細胞系を用いて、分裂期染色体動態の研究分野をリードする論文を発表してきた(Shintomi et al, *Science*, 2017 など)。その発展的成果として、精製タンパク質のみを用いて染色体を再構成することにも成功している(Shintomi et al, *Nat Cell Biol*, 2015)。また、研究協力者(大隅圭太、名古屋大)らは、初期胚での転写開始を再現できる卵抽出液の開発を進めていた。こうした唯一無二の研究体制を活かし、以下の方法を用いて、研究を推進した。

(1) 核移植胚のドナー核における DNA 複製再開メカニズムの解明: カエル卵抽出液を用いて休止細胞の核を細胞増殖に適応させ、DNA 複製を再開させる方法を確立した。この実験系から複製誘起の前提条件のひとつである、分裂期染色体構築に重要な役割を果たすタンパク質を卵抽出液から除去、あるいは、変異体に置換することによって、それぞれ因子の機能を詳細に解析した。

(2) 初期胚における転写開始メカニズムの解明: 胚性ゲノム活性化(初期胚における接合体ゲノムからの転写開始)に相当する過程を再現できる新規卵抽出液の開発を進めた。この無細胞系で、さまざまなかく乱操作を組み合わせることで、転写が誘起されるための必要条件を絞り込んだ。

(3)精製タンパク質を用いた核の再プログラム化の再構成:核の再プログラム化に関わる一連の過程のうち、ドナー核から分裂期染色体が作られる過程(クローン作製の前提条件)を可能な限り少ない種類の精製タンパク質を使って再構成するための基盤技術を構築した。

4. 研究成果

(1) 核移植胚のドナー核における DNA 複製再開メカニズムの解明

① 核移植におけるドナー核の再プログラム化を再現する実験系の確立: マウスで核移植クローン作成するには、分裂期のレシピエント細胞(厳密には、減数第二分裂中期に停止した未受精卵)にドナー核を顕微注入する必要がある。一方で、間期のレシピエントを用いると発生異常を生じることが知られていた(Egli et al, *Nature*, 2007 など)。この事実に着目し、細胞周期を自由に制御できるカエル卵抽出液を使って、各移植後ドナー核で起こる現象の再現を試みた。まず、ドナー核のモデルとしてカエル赤血球核を単離し、分裂期に停止したカエル卵抽出液に加えたところ、核膜崩壊と染色体構築が観察された、その後、細胞周期を間期に進めると、核が再形成され DNA 複製も検出された。一方で、赤血球核を間期核に加えても複製が検出されなかった。すなわち、核移植後にドナー核の DNA 複製能力が回復されることを、この無細胞系を用いて再現できることが確認された。

② 核の再プログラム化に重要な因子の機能解析: 上記の結果は、分裂期に起こるドナー核の構造変化が再プログラム化に重要であることを強く示唆する。とくに、分裂期卵抽出液では核から染色体への大規模な構造変化が観察される。その前後でクロマチン結合タンパク質がどのように変化するか、クロマチン結合タンパク質の質量分析によって検討した。その結果、もとの赤血球核には存在しない、コンデンシン I と II、トポイソメラーゼ II (トポ II)、H1.8 (初期胚特異的なリンカーヒストンバリエント) が、新たに染色体に結合することが判明した。そのうち、コンデンシン I とトポ II は染色体構築に必須であるため、DNA 複製能の回復に中心的な役割を担うことが強く示唆された。そこで、分裂期におけるトポ II の機能解析を進めたこと、意外なことに、トポ II が同一染色体内で DNA の絡まりを作ることによって染色体構築に貢献していることが判明した。(Shintomi & Hirano, *Nat Commun*, 2021、図 1)。また、この実験系で H1.8 除いた場合には染色体の個別化が促進されるのに対し、過剰量の H1.8 を添加すると個別化が阻害され、染色体のクラスター化が観察された。さらに興味深いことには、クロマチンリモデラーである ATPase (ISWI) を除いた時にも、染色体クラスター化が起きた。上記の結果から、マイクロメートルサイズの染色体の高次構造が、わずか 10 nm のヌクレオソームの動的性質によって調節される可能性が強く示唆された。

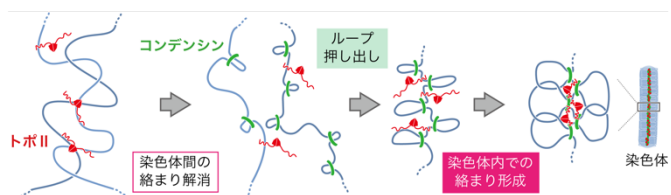


図 1. 染色体構築におけるトポ II の役割

(2) 初期胚における転写開始メカニズムの解明

動物の未受精卵や受精後間もない胚では、転写が起らないことが知られている。例えば、アフリカツメガエルでは、12 回の同調的な卵割を終えたステージ(中期胞胚)まで転写が起らない(Newport & Kirschner, *Cell*, 1982)。そのため、未受精卵から調製した「従来型」の卵抽出液に精子核を加えても、核形成や DNA 複製が起こるものの、転写産物はまったく検出されない。転写開始メカニズムを生化学的に解析するため、研究協力者の大隅(名古屋大)は、受精模倣する賦活刺激を与えてから一定時間経過したカエルの卵から調製した「賦活卵抽出液」を考案した。この賦活卵抽出液に精子核を加えると、

間期核と分裂期染色体が、数十分間隔で交互に観察され、細胞周期の自律的な進行が確認された。さらに、重要なことに、賦活卵抽出液に UTP アナログ (5-EU) を加えると、間期核内に EU の輝点 (すなわち、転写産物の蓄積) が観察された (図 2)。また、賦活刺激後の様々なタイミングで賦活卵抽出液を調製し、転写活性の比較を行った。その結果、賦活後 5 時間には、すでに十分な量の転写に必要なタンパク質が蓄積されていることを突き止めた。賦活後 5 時間とは、中期胞胚よりも早いステージであった。さらに賦活卵抽出液での細胞周期進行をかく乱する実験により、中期胞胚以前の胚では、細胞周期が短く分裂期に転写が中断されてしまうため、転写産物の蓄積されないことが判明した。これらの結果は、胚性ゲノム活性化 (転写開始) には、従来から提唱されてきた、エピゲノム変化、核-細胞質比の制御だけでなく、細胞周期の初期胚型 (分裂期と S 期のみ) から体細胞型 (G1 期と G2 期の出現、S 期の延長) への転換が重要であることを示唆するものである。

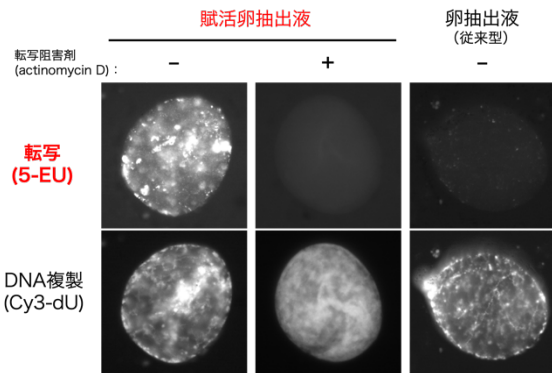


図 2. 賦活卵抽出液における転写

(3) 精製タンパク質を用いた核の再プログラム化の再構成

① 組替えタンパク質の調製法の確立: 核移植においては、ドナー核を分裂期染色体へと変化させることが DNA 複製の回復に必須な準備段階である。また、上述の通り、カエル赤血球核と卵抽出液を組み合わせることによって、核移植後の核の再プログラム化の過程を部分的に再現できることがわかった。そこで、卵抽出液の代わりに可能な限り少ない種類の精製タンパク質を使って、赤血球核から染色体への構造変換を再構成する方法の確立を目指した。まず材料の調製法を検討した。具体的には、染色体構築に不可欠なコンデンシン I (5 つのサブユニットからなるタンパク質複合体) とトポ II、また、核膜崩壊や染色体構築を促進するキナーゼ CDK (サイクリン B と Cdk1 の複合体) のリコンビナントタンパク質を作製した。単一ウイルスベクターに複数の cDNA を導入する方法を用いて、複数のサブユニットから構成されるタンパク質複合体を安定的に調製するなど、技術的にも大きな進展があった。

② 組替えタンパク質を用いた機能解析: 上記の方法で調製されたリコンビナントタンパク質の機能検定を行った。CDK がコンデンシン I の大規模な (複数のサブユニットの複数のアミノ酸残基に対する) リン酸化を触媒し (Shintomi et al, *PLOS One*, 2024)、リン酸化されたコンデンシン I をつかって染色体を再構成できることが示された (図 3)。すなわち、核の再プログラム化の再構成に向けて十分な材料の調製がほぼ完了したと言える。さらに、驚くべきことに、コンデンシン I とトポ II を共存させると、ATP 依存的に DNA に結び目が導入できることも判明した (京大、西山朋子教授との共同研究、発表準備中)。この意外な結果は、「染色体内で DNA がどのように折りたたまれているか」という、細胞生物学における積年の疑問の解決につながると期待される。

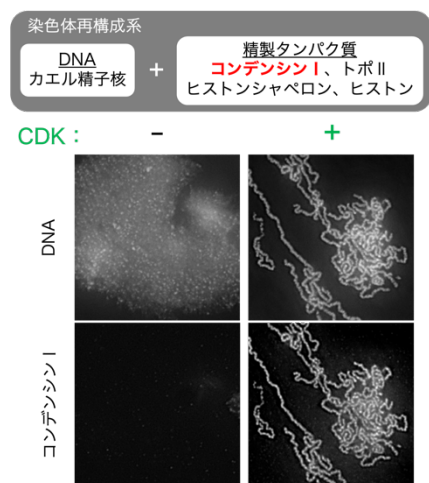


図 3. コンデンシン I の CDK による活性化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Shintomi Keishi, Masahara-Negishi Yuki, Shima Masami, Tane Shoji, Hirano Tatsuya	4. 巻 19
2. 論文標題 Recombinant cyclin B-Cdk1-Suc1 capable of multi-site mitotic phosphorylation in vitro	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0299003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Makoto M., Kinoshita Kazuhisa, Shintomi Keishi, Aizawa Yuuki, Hirano Tatsuya	4. 巻 35
2. 論文標題 Regulation of condensin II by self-suppression and release mechanisms	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E23-10-0392	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sun Mingxuan, Amiri Hossein, Tong Alexander B., Shintomi Keishi, Hirano Tatsuya, Bustamante Carlos, Heald Rebecca	4. 巻 120
2. 論文標題 Monitoring the compaction of single DNA molecules in <i>Xenopus</i> egg extract in real time	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2221309120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2221309120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tane Shoji, Shintomi Keishi, Kinoshita Kazuhisa, Tsubota Yuko, Yoshida Makoto M, Nishiyama Tomoko, Hirano Tatsuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Cell cycle-specific loading of condensin I is regulated by the N-terminal tail of its kleisin subunit	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e84694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.84694	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukuda Yuko, Shintomi Keishi, Yamaguchi Kosuke, Fujiwara Yasuhiro, Okada Yuki	4. 巻 2577
2. 論文標題 Solubilization of Mouse Sperm Chromatin for Sequencing Analyses Using a Chaperon Protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 161 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2724-2_11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Makoto M, Kinoshita Kazuhisa, Aizawa Yuuki, Tane Shoji, Yamashita Daisuke, Shintomi Keishi, Hirano Tatsuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Molecular dissection of condensin II-mediated chromosome assembly using in vitro assays	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e78984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.78984	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shintomi Keishi	4. 巻 6
2. 論文標題 Making Mitotic Chromosomes in a Test Tube	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Epigenomes	6. 最初と最後の頁 20 ~ 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/epigenomes6030020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita Kazuhisa, Tsubota Yuko, Tane Shoji, Aizawa Yuuki, Sakata Ryota, Takeuchi Kozo, Shintomi Keishi, Nishiyama Tomoko, Hirano Tatsuya	4. 巻 221
2. 論文標題 A loop extrusion-independent mechanism contributes to condensin I-mediated chromosome shaping	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202109016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202109016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keishi Shintomi and Tatsuya Hirano	4. 巻 -
2. 論文標題 Guiding functions of the C-terminal domain of topoisomerase II advance mitotic chromosome assembly	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23205-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計13件(うち招待講演 11件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Keishi Shintomi
2. 発表標題 An unexpected role of nucleosomes in mitotic chromosome assembly
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新富 圭史
2. 発表標題 全能性獲得過程を試験管内で再現する
3. 学会等名 新学術領域「全能性プログラム」公開シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新富圭史
2. 発表標題 染色体をつくる：物理化学的的特性の理解を目指して
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keishi Shintomi
2. 発表標題 Biochemical dissection of nuclear reprogramming on somatic cell nuclear transfer
3. 学会等名 The International Symposium "Totipotency and Germ Cell Development" ((招待講演) (国際学会))
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新富圭史
2. 発表標題 カエル卵を使って見えてきた染色体の構築メカニズム
3. 学会等名 第93回日本動物学会大会 サテライトシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新富圭史
2. 発表標題 細胞周期の再構成は可能か？
3. 学会等名 細胞分裂研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新富圭史
2. 発表標題 カエル卵抽出液を使った体細胞核の再プログラム化
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新富圭史
2. 発表標題 カエル卵抽出液をつかって染色体構築におけるヌクレオソームの役割に迫る
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keishi Shintomi
2. 発表標題 Reprogramming somatic cell nuclei in Xenopus egg extracts
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keishi Shintomi and Tatsuya Hirano
2. 発表標題 Topoisomerase IIa utilizes its C-terminal domain to work in crowded environments of mitotic chromosome assembly
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keishi Shintomi
2. 発表標題 Reprogramming somatic cell nuclei in Xenopus egg extracts
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keishi Shintomi and Tatsuya Hirano
2. 発表標題 Topoisomerase IIa utilizes its C-terminal domain to work in crowded environments of mitotic chromosome assembly
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keishi Shintomi and Tatsuya Hirano
2. 発表標題 Making a chromosome from scratch: a powerful approach to dissecting mitotic functions of topoisomerase II
3. 学会等名 EMBO Workshop: DNA topology and topoisomerases in genome dynamics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Research Map https://researchmap.jp/k_shintomi/presentations/38977698 研究成果に関するプレスリリース https://www.riken.jp/press/2021/20210518_4/index.html

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	大隅 圭太 (Ohsumi Keita)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	平野 達也 (Hirano Tatsuya)		
研究協力者	正原 由紀 (Masahara-Negishi Yuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	UC Berkeley			
英国	MRC London Institute of Medical Sciences			