

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06447

研究課題名(和文) 始原生殖細胞運命決定を司るカスケード上流因子の制御機構

研究課題名(英文) Identification of upstream signaling pathway responsible for primordial germ cell specification

研究代表者

岡村 永一 (OKAMURA, Eiichi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：30755913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス着床後胚において始原生殖細胞は、胚体外外胚葉から分泌されるBmp4シグナルによって一部のエピプラスト細胞が運命決定されて出現する。Bmp4下流のシグナル伝達経路は比較的良く解析されているものの、上流カスケード、即ち、胚体外外胚葉におけるBmp4遺伝子発現のメカニズムはほとんど明らかになっていなかった。本研究では、Bmp4遺伝子が核内受容体型転写因子Esrrbの直接的標的因子であることを見出した。また、新規に樹立した遺伝子改変マウスの解析から、EsrrbによるBmp4遺伝子発現制御の破綻は、着床後胚における始原生殖細胞の形成不全をもたらし、成獣期の妊孕性の低下に繋がることを示した。

研究成果の概要(英文)：It is well known that Bmp4 signaling from extraembryonic ectoderm (ExE) is required for primordial germ cell (PGC) specification in the embryo proper. However, the mechanisms to regulate Bmp4 gene expression in ExE has not been well characterized. In this study, I demonstrated that an orphan nuclear receptor Esrrb (estrogen related receptor beta) directly regulates Bmp4 gene expression in the ExE. Deletion of Esrrb-bound Bmp4 enhancer region resulted in decreasing of Bmp4 secretion from ExE and reduction of PGC number in mid-gestation embryos. Thus, it was clearly demonstrated that Esrrb is one of the critical upstream factors regulating PGC specification through regulation of Bmp4 signaling.

研究分野：発生生物学

キーワード：Esrrb Bmp4 始原生殖細胞 栄養膜幹細胞 胚体外外胚葉

## 1. 研究開始当初の背景

個体を構成する全ての細胞の中で、生殖細胞は、唯一、親から子へと遺伝情報を伝達し次世代を生み出す極めて重要な役割を担う。マウスの場合、生殖細胞の元になる始原生殖細胞は、受精後約6日目に出現することが知られている。この時期のマウス胚は、主にエピプラスト(将来の胚本体)、胚体外外胚葉(同胎盤)、臓側内胚葉(同卵黄嚢)と呼ばれる3組織から構成される。先行研究によって、エピプラスト内における始原生殖細胞の運命決定には、胚体外外胚葉から分泌されるBmp4を起点としたシグナル伝達経路が必須であることが明らかになっている。しかしながら、Bmp4下流のシグナル伝達カスケードについては比較的理解が進んでいる一方で、上流のカスケード、即ち、胚体外外胚葉におけるBmp4遺伝子制御のメカニズムはほとんど明らかになっていない。

オファン核内受容体型転写因子 Esrrb (Estrogen related receptor beta) は、胚性幹(Embryonic stem: ES)細胞の多能性マーカーの1つとして広く認識されている。一方で、ノックアウトマウスの解析からは、Esrrbは胚体の発生には必須ではなく、むしろ胎盤形成に重要な役割を果たすことが示されている。研究代表者は先行研究において、Esrrbの胎盤形成における機能を解明するため、胚体外外胚葉由来の栄養膜幹(Trophoblast Stem: TS)細胞を用いて、ゲノムワイドな機能解析を行なった。その結果、Esrrbは胚体外外胚葉の発生に必須な転写因子であるElf5やSox2の上流因子として機能することを見出した。さらに興味深いことに、EsrrbはBmp4の上流因子としても機能する可能性を見出した。実際に、Esrrb遺伝子ホモ欠損マウスにおいては、胚体外外胚葉におけるBmp4発現が有意に減少していることも確認された。これらの結果より、EsrrbはBmp4遺伝子発現制御を介し、始原生殖細胞形成のカスケード上流因子としての機能を果たす可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、Esrrbが始原生殖細胞の運命決定を司るカスケード上流因子としての機能を果たすか個別レベル検証し、また、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) クロマチン免疫沈降(ChIP)-seq解析によるEsrrbの直接的転写制御遺伝子の探索

TS細胞を材料とし、抗Esrrb抗体、及び、エンハンサーの指標となるH3K27ac抗体を用いてChIP-seq解析を行なった。先行研究で実施したEsrrb阻害剤投与TS細胞のRNA-seq解析の結果と合わせ、BETA (Binding and Expression Target Analysis)プログラムを用いたバイオフィンフォマテックス解析を行

なった。

### (2) ルシフェラーゼレポーターアッセイによるエンハンサー活性の評価

最小プロモーターとルシフェラーゼ遺伝子を保持するベクターに、エンハンサー候補領域のDNA断片を連結したプラスミドを構築した。これをトランスフェクション法によってTS細胞に導入した。24時間後に細胞溶解液を調製し、ルミノメーターによって発光強度を測定した。

### (3) Bmp4エンハンサーノックアウトTS細胞株の作製

エンハンサー領域の上流、及び、下流を特異的に標的とする2種類のgRNA配列を、CRISPR directソフトウェアによって探索した。これらのgRNA配列を、gRNAとCas9遺伝子の共発現ベクターであるpx459プラスミドへ常法により挿入した。これら2種類のプラスミドをトランスフェクション法によってTS細胞へ同時に導入し、ピューロマイシンで24時間薬剤選別後、シングルコロニーアイソレーションを行なって細胞株を樹立した。各細胞株からDNAを抽出し、PCR法によって目的の領域が欠損している株を選別した。

### (4) Bmp4エンハンサーノックアウトマウスの作製

体外受精法によって得たC57BL/6Jマウスの受精卵に対し、*in vitro* transcription法によって合成したCas9 mRNAとgRNAをエレクトロポレーション法によって導入した。約24時間培養後、2細胞期胚を仮親の卵管へ移植した。得られた産仔の尾からDNAを抽出し、目的領域が欠損した個体をPCR法によって選別、系統化した。

### (5) 免疫染色法による始原生殖細胞の可視化

自然交配、または、体外受精によって得られた妊娠7.75日目の雌マウスの子宮から胚を回収した。4%ホルムアルデヒド液にて固定後、抗AP2抗体を用いて免疫染色を行なった。共焦点蛍光顕微鏡によって標識された始原生殖細胞の数をカウントした。観察後、胚からDNAを抽出し、PCR法によって遺伝子型を決定した。

## 4. 研究成果

### (1) TS細胞を用いたEsrrb結合性Bmp4エンハンサーの同定

BETAプログラムを用いたバイオフィンフォマテックス解析から、Bmp4遺伝子はEsrrbの直接的標的遺伝子であることが強く示唆された。また、Bmp4遺伝子周辺にEsrrbが結合し、かつエンハンサーマークであるヒストンH3K27acが局在する領域を2カ所同定した。そこで、TS細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイによって、エンハンサー活性を

検証したところ、1つの断片について強力なエンハンサー活性が認められた。同領域のDNA配列から Esrrb 結合モチーフを完全に欠失した変異型断片は、エンハンサー活性が完全に失われた。これらの結果から、同領域が Esrrb によって活性化されるエンハンサーである可能性が強く示唆された。

次に、内在性遺伝子座におけるエンハンサー機能を検証するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて TS 細胞内で同エンハンサー領域を欠失させた。ホモに欠失が生じた細胞株は樹立出来なかったものの、ヘテロ欠失株において Bmp4 遺伝子発現を解析したところ、顕著な発現低下が認められた。従って、TS 細胞内の内在性遺伝子座においても同領域が Bmp4 の強力なエンハンサーとして機能することが示された。

## (2) Esrrb 結合性 Bmp4 遺伝子エンハンサーの生体内機能解析

同定した Esrrb 結合性 Bmp4 エンハンサーの生体内機能を検証するため、CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトマウス系統を樹立した。ヘテロノックアウトマウス同士の交配によって誕生した仔の遺伝型はほぼ 1:2:1 とメンデル比に従って分離されたことから、同エンハンサーは個体の生存には必須ではないことが示された。しかしながら、ホモノックアウトマウス雄を野生型雌マウスと交配したところ、明らかな妊孕性の低下が認められ、一部の個体については完全に不妊であった。そこで、精巣重量を測定したところ、野生型マウスと比較して明らかな重量の低下が認められた(図1)。不妊症状を呈した個体の精巣および精巣上体尾部の組織切片を作製したところ、精子細胞が全く存在しない乏精子症の所見が認められ、これが不妊の原因であることが示唆された。

次に、成獣で認められた配偶子形成不全が、始原生殖細胞の分化異常に起因するか検証した。まず、E6.5 日胚の Bmp4 遺伝子発現を調べたところ、エンハンサーノックアウトマウスでは、野生型と比較して有意な発現低下が認められた。次に、蛍光免疫染色法によって始原生殖細胞数をカウントしたところ、エンハンサーノックアウトマウスでは有意に数が検証していることが明らかになった(図2)。同様の始原生殖細胞数の低下は、Esrrb ホモノックアウトマウスでも認められた。

以上の結果から、胚体外外胚葉において Esrrb は Bmp4 遺伝子発現を直接的に制御する上流因子として機能し、始原生殖細胞の運命決定に重要な役割を担うことが明らかになった(図3)。

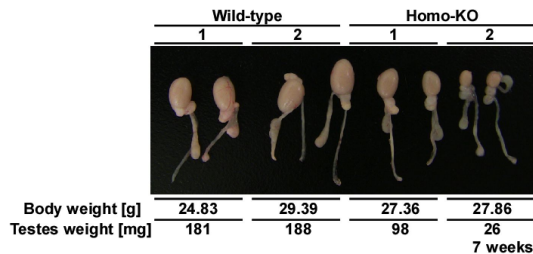


図1: Esrrb 結合性 Bmp4 エンハンサーノックアウトマウスの精巣および精巣上体

野生型マウスと比較して、ホモノックアウトマウスの精巣重量は有意に低下していた。

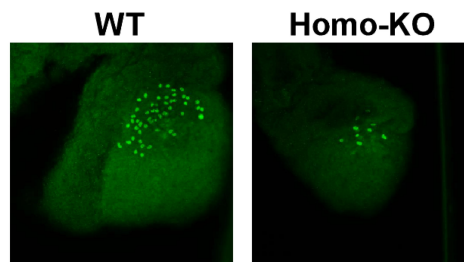


図2: 蛍光免疫染色法による Esrrb 結合性 Bmp4 エンハンサーノックアウトマウスの始原生殖細胞の可視化

野生型マウスと比較して、ホモノックアウトマウスでは、始原生殖細胞数が有意に減少していた。

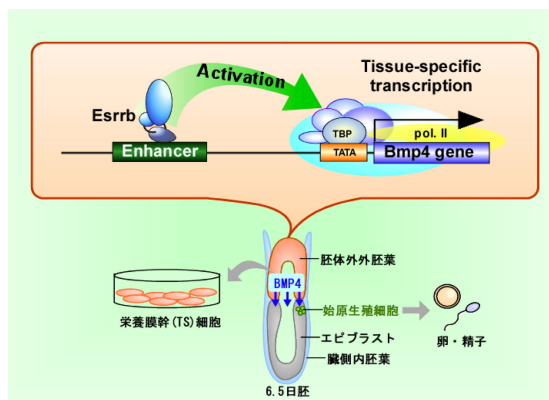


図3: 本研究で明らかになった Esrrb による Bmp4 遺伝子発現制御機構のモデル図

## 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)

Hitomi Matsuzaki, Eiichi Okamura, Takuya Takahashi, Aki Ushiki, Toshinobu Nakamura, Toru Nakano, Kenichiro Hata, Akiyoshi Fukamizu and Keiji Tanimoto  
*De novo* DNA methylation through 5' -segment of the *H19* ICR maintains its imprint during early embryogenesis.  
*Development* 142, 3833-3844 (2015) (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

岡村永一 他 転写因子 Esrrb と Cdx2 による栄養膜幹(TS)細胞特異的遺伝子発現制

御 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回  
日本生化学会大会 合同大会 2015 年 12 月  
03 日 神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

〔その他〕

ホームページ等

徳島大学大学院医歯薬学研究部

動物資源研究部門

<http://cms.db.tokushima-u.ac.jp/DAV/organization/10998/>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡村 永一 (OKAMURA, Eiichi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：30755913