

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17594

研究課題名(和文)生殖細胞への運命決定を制御するヒストン修飾調節因子の網羅的同定と機能解明

研究課題名(英文)Comprehensive identification and functional elucidation of regulators of histone modifications that regulate germ cell fate

研究代表者

望月 研太郎 (Mochizuki, Kentaro)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：20633499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生物は生殖細胞とそれ以外の体細胞とから構成される。ヒトを含む哺乳動物では、生殖細胞が唯一、精子または卵子を形成した後に、受精を経て世代の継承を保証する。生殖細胞の異常は不妊や子孫が持つ様々な疾患の原因となる。本研究では、遺伝子のスイッチのON/OFFに重要な核タンパク質であるヒストンに対するアセチル化・メチル化・リン酸化を担う約200の修飾酵素の中から、始原生殖細胞の出現に役割を持つヒストン修飾酵素を網羅的に同定することに成功した。特に、脱メチル化酵素が体細胞への分化に働く遺伝子群を発現抑制すること、メチル化酵素がシグナル経路を担保することで、始原生殖細胞の出現に寄与することを詳細に示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、始原生殖細胞の出現を促進するヒストン修飾、ならびに抑制するヒストン修飾がフルセットで明らかになり、分子ネットワークの全体像に切り込む突破口が見えてきた。また、始原生殖細胞の出現は生殖細胞の発生分化の初発段階に位置することから、そこで機能するヒストン修飾は、後の段階のヒストン修飾のパターン確立に関わり、精子/卵子形成、受精、次世代個体の発生にも大きな役割を担う可能性が高い。本研究成果は、そのようなヒストン修飾を明らかにしたことから、生殖細胞の発生分化の理解に大きく貢献できる。

研究成果の概要(英文)：An organism is composed of germ cells and somatic cells. In mammals, including humans, germ cells only ensure the succession of generations through fertilization, after forming a sperm or egg. Germ cell abnormalities can cause infertility and a variety of diseases that offspring carry. In this research, we succeeded in comprehensively identifying histone modification enzymes that play a role in the emergence of primordial germ cells from among about 200 enzymes that are responsible for acetylation, methylation, and phosphorylation of histones, which are nuclear proteins that are important for gene switching on and off. In particular, we demonstrated in detail that a demethylase represses the expression of a set of genes responsible for differentiation into somatic cells and that a methyltransferase contributes to the emergence of primordial germ cells by guaranteeing signaling pathways.

研究分野：発生生物学、エピジェネティクス

キーワード：始原生殖細胞 ヒストン修飾

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物は生殖細胞と体細胞とから構成される。ヒトを含む哺乳動物では、生殖細胞が唯一、精子または卵子を形成した後に、受精を経て世代の継承を保証する。生殖細胞の異常は不妊や子孫が持つ様々な先天性疾患の原因となる。マウスの生殖細胞は、胚発生初期の胎齢 6.5 日頃に全身の細胞の源となる多能性細胞エピプラストの一部から、BMP4 や WNT3 のシグナル伝達によって、始原生殖細胞 (PGC) として分化運命決定を受ける。PGC 分化運命決定に際して、WNT3 シグナル伝達が転写制御因子である T を発現促進し、さらにこの T が転写制御因子 Blimp1 および Prdm14 を直接的に発現促進する。また、Blimp1、Prdm14 に Tfap2c を加えた 3 因子の転写制御カスケードが、下流の PGC 特異的遺伝子群を発現促進し、逆に体細胞分化に働く遺伝子 (体細胞遺伝子) 群を発現抑制して、PGC 分化運命決定に機能する。ところで、Blimp1 および Prdm14 はヒストンメチル基転移酵素と類似したドメインを持つが、2 つの転写制御因子が実際にヒストンメチル化を調節するかどうかは確認されていなかった。また、例えば、上述の T および 3 因子の発現促進に働くエピジェネティック修飾や、3 因子の転写制御カスケードによる体細胞遺伝子群の発現抑制に関わるエピジェネティック修飾を含め、PGC 分化運命決定を制御するエピジェネティック修飾は依然として不明であった。

2. 研究の目的

以下 3 項目により、PGC 分化運命決定を制御するヒストン修飾とその調節因子を明らかにすることを旨とした。

- I. PGC 様細胞培養モデル系において、ヒストン修飾調節因子に対する RNAi スクリーニングを行い、PGC 分化運命決定を促進する制御因子候補、ならびに抑制する制御因子候補を絞り込む。
- II. 制御因子候補が *in vivo* の PGC 分化運命決定で機能を持つかどうかを確かめるため、それぞれの KO 胚における PGC 形成を調べて、以降解析する制御因子候補を決定する。
- III. 制御因子候補が調節するヒストン修飾がどのような遺伝子を発現制御するかを調べる。

3. 研究の方法

I. 始原生殖細胞 (PGC) 様細胞誘導系でヒストン修飾調節因子に対する RNAi (RNA 干渉) スクリーニングを行った。

マウス胚性幹 (ES) 細胞を出発点として、エピプラスト様細胞を誘導し、さらに BMP4 等のサイトカインを添加した培地で PGC 様細胞を誘導する培養系は、初期胚における PGC 分化運命決定を極めて忠実に再現する。この系では、PGC 特異的遺伝子 Blimp1、Stella の発現制御領域に蛍光タンパク質遺伝子を挿入したレポーター導入遺伝子 (Blimp1-Venus, Stella-CFP; BVSC) を持つ ES 細胞を用いることで、PGC 様細胞を Venus と CFP の蛍光陽性細胞として識別・分取できる。

96 穴培養プレートにて PGC 様細胞を誘導する際に、リポフェクションによって siRNA を導入して各ヒストン修飾調節因子をノックダウン (KD) した。通常の PGC 様細胞誘導が完了する導入 4 日後に細胞イメージアナライザー (Cellomics ArrayScan) を用いて蛍光陽性細胞の領域の割合を定量した。KD することでコントロールに比べて、蛍光陽性細胞の領域が有意に減少するヒストン修飾調節因子は PGC 分化運命決定を促進する制御因子候補とし、蛍光陽性細胞の領域が有意に増大するヒストン修飾調節因子は PGC 分化運命決定を抑制する制御因子候補とした。

II. PGC 分化運命決定の制御因子候補ノックアウト (KO) 胚における PGC 形成状態を確認した。

制御因子候補の遺伝子座中の切断すべき DNA 配列を標的としたガイド RNA、および Cas9 スクレーパーゼ組換えタンパク質を、エレクトロポレーションによって Blimp1-RFP トランスジェニックマウスの受精卵に導入した。この受精卵では、標的領域の切断に伴う塩基の置換や欠損が両アレルで起こり、制御因子候補が KO された。KO 受精卵を仮親マウスの卵管へ移植後、胎齢 7.5 日で胚を取り出して、RFP 蛍光陽性の PGC 形成の有無を共焦点顕微鏡撮像で確かめた。なお、解析する発生段階以前に致死が認められた場合には、条件的 KO に切り換えて対応した。対象遺伝子の flox マウスを、PGC 形成の解析には Sox2-Cre (エピプラストで Cre を発現する) マウスと交配して、条件的 KO 胚を得た。

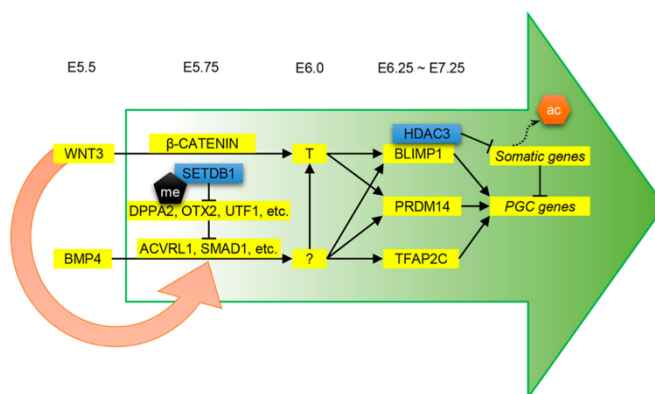
III. PGC 分化運命決定の制御因子候補がどのような遺伝子を発現制御するかを *in vitro* で精査した。

PGC 様細胞を誘導する過程で PGC 分化運命決定の制御因子候補をノックダウン (KD) した。誘導 4 日後に、蛍光陰性細胞を回収、あるいは蛍光陽性細胞が誘導された場合にはそれをセルソーティングで分取して、以降の解析を進めた。まず、RNA-seq を行い、対照群の PGC 様細胞と比較した。前述のシグナル伝達経路や 3 因子転写制御カスケードで働く分子、PGC 特異的遺伝子群や体細胞遺伝子群の発現変動が見られるかを調べて、PGC としての正常性を確かめた。また、ChIP-qPCR でそれらの発現変動が当該ヒストン修飾の変化によるかを確認した。

4. 研究成果

主要なヒストン修飾であるアセチル化 (ac)・メチル化 (me)・リン酸化 (ph) を担う約 200 の酵素遺伝子を網羅的にスクリーニング結果、例えば、ヒストン H3 リジン 9 の 3 価メチル化

(H3K9me3) 修飾を担う Setdb1 を、またはヒストン H4 の脱アセチル化を担う Hdac3 をノックダウン (KD) すると PGC 様細胞が減少した。各ノックアウト (KO) 胚を観察したところ、in vitro モデルとよく対応して、Hdac3 KO 胚および Setdb1 KO 胚で PGC がほとんど全く形成されなかった。このようなヒストン修飾酵素を合計 6 遺伝子同定した。特に、Hdac3 および Setdb1 に着目し、in vitro モデルを用いた解析で作用機序の詳細を明らかにして、HDAC3 酵素 (H4 脱アセチル化修飾) が体細胞系譜への分化に働く遺伝子群を網羅的に発現抑制すること [Mochizuki et al., Cell Reports, 2018]、SETDB1 酵素 (H3K9me3 修飾) がエピプラストの BMP シグナル伝達を阻害するような遺伝子群を抑制すること [Mochizuki et al., Development, 2018] で、PGC 分化運命決定に寄与することを見出した (図を参照)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mochizuki Kentaro, Hayashi Yohei, Sekinaka Tamotsu, Otsuka Kei, Ito-Matsuoka Yumi, Kobayashi Misato, Oki Shinya, Takehara Asuka, Kono Tomohiro, Osumi Noriko, Matsui Yasuhisa	4. 巻 24
2. 論文標題 Repression of somatic genes by selective recruitment of HDAC3 by BLIMP1 is essential for mouse primordial germ cell fate determination	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2682 ~ 2693.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.108	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 Mochizuki Kentaro, Tando Yukio, Sekinaka Tamotsu, Otsuka Kei, Hayashi Yohei, Kobayashi Misato, Kamio Asuka, Ito-Matsuoka Yumi, Takehara Asuka, Kono Tomohiro, Osumi Noriko, Matsui Yasuhisa	4. 巻 145
2. 論文標題 SETDB1 is essential for mouse primordial germ cell fate determination by ensuring BMP signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1242/dev.164160	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mochizuki Kentaro, Hayashi Yohei, Sekinaka Tamotsu, Otsuka Kei, Ito-Matsuoka Yumi, Kobayashi Misato, Oki Shinya, Takehara Asuka, Kono Tomohiro, Osumi Noriko, Lorincz Matthew, Matsui Yasuhisa
2. 発表標題 Repression of somatic genes by selective recruitment of HDAC3 by BLIMP1 is essential for mouse primordial germ cell fate determination
3. 学会等名 The 5th Canadian Conference on Epigenetics（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kentaro Mochizuki, Hisato Kobayashi, Yumi Matsuoka, Tomohiro Kono, Noriko Osumi, Yasuhisa Matsui
2. 発表標題 Hdac3 recruitment on somatic developmental genes by Blimp1 and their repression is essential for mouse primordial germ cell fate determination
3. 学会等名 日本発生生物学学会 第50回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----