

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19383

研究課題名（和文）細胞の全能性獲得に関連するクロマチン構造の定性的解析

研究課題名（英文）Qualitative analyses of totipotency-related chromatin structure

研究代表者

岡田 由紀（Okada, Yuki）

東京大学・定量生命科学研究所・教授

研究者番号：60546430

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では初期胚におけるクロマチン構造変換と全能性獲得が密接にかかわっているという近年の知見に基づき、全能性獲得に関与するクロマチン因子を探索し、その機能を明らかにすることを目的とした。In silicoスクリーニングによって10個の候補因子を抽出し、その中で前核において核アクチン様の局在を示す候補因子Aと、過剰発現が初期胚発生停止を誘導する候補因子Bを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の全能性獲得や高効率リプログラミングに関与する新規候補因子を同定した本研究成果は、今後その効果の確認と分子メカニズムの解明を通して、初期胚発生メカニズムの理解や再生医療に有用な知見を提供し得ると期待される。

研究成果の概要（英文）：Based on the recent knowledge that chromatin structural transformation and totipotency acquisition in early embryos are closely related, this study aimed to explore the chromatin factors involved in totipotency acquisition and to clarify their functions. In silico screening identified 10 candidate factors, including candidate factor A, which showed nuclear actin-like localization in the pronucleus, and candidate factor B, in which the overexpression induced early embryonic arrest.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：初期胚発生 クロマチン構造

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、グローバルなクロマチン構造変化が、細胞の性質や運命決定に密接に関与することが明らかになりつつある。特に受精直後の初期胚発生においては、エピゲノム情報の初期化とも言うべき大規模なクロマチンの変化が雌雄の核において起こる。さらに2012年に、ES細胞の一部が受精卵(2細胞期胚)に類似した性質を持つ細胞に「ゆらく」現象が報告され、これにおいてもヒストンシャペロンを介したゲノムワイドなクロマチンの変化が密接に関与することが複数の先行研究によって示された。すなわち、多能性(ES細胞)と全能性(2細胞期胚)の境界が、ゲノム全体のクロマチン構造の違いによって規定される可能性が強く示唆された。

2. 研究の目的

上記の背景を鑑み、本研究課題では、全能性細胞と多能性細胞との境界に関与するクロマチンを探索し、ES細胞から2細胞期胚様細胞の出現頻度に与える影響と、その生理機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

我々はES細胞-2細胞期様細胞間の揺らぎを生細胞でモニターできる2CLCレポーターを作成し、ES細胞に導入したものを既に樹立していた。そこでこの細胞を用いてsiRNAライブラリのスクリーニングを行い、2CLCの出現頻度に影響を与える因子を同定する予定であった。しかし研究期間開始後に、国内外で同様のアプローチを行っている研究室が複数あることが判明した。さらに国外のグループからは論文発表もなされたことから、研究目的は保ちつつもアプローチを変更し、我々が以前に独自に行ったものを含めた受精前後のトランスクリプトームデータから *in silico* スクリーニングによって候補因子を抽出した。抽出された候補因子のcDNAをサブクローニングし、タグを付加して1細胞期胚に過剰発現し、その局在を観察した。さらにこれら因子の過剰発現や、RNAi法による発現阻害を行い、初期胚発生に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) *In silico* スクリーニングによる候補因子の抽出

複数の体細胞と生殖細胞(精巣、卵巣、卵子)のトランスクリプトームデータから、GV卵で特異的に高発現する遺伝子を抽出し、さらにその中から、機能が十分に探索されておらず、受精後の1~2細胞期胚においてもmRNA発現が持続するものを12個抽出した。

(2) 候補因子の受精卵における局在の解析

これらのcDNAを発現ベクターにサブクローニングし、タグを付加してmRNAとして発現させ、これを1細胞期受精卵に注入してタンパク質の局在を検討した。その結果、12個中10個が核局在を示した。これらの中には、先行研究で初期胚の転写調節に重要な機能を持つことが示されている因子と相互作用すると考えられるものが2個含まれており、我々の *in silico* スクリーニングの妥当性を示すものであった。これ以外の8個のうち1個(因子Aとする)は、受精卵では体細胞とは異なるスライシングバリエーションとして発現しており、近年リプログラミングとの関連性が示されている核アクチン様の局在を示した(図1)。

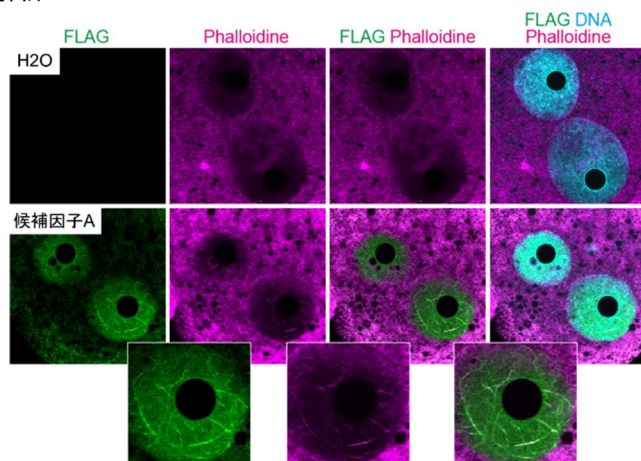


図1 候補因子Aは特徴的な核内局在を示す

(3) 候補因子の初期胚発生における機能の探索

次にこれら10個の中で、強い核局在を示した6因子について、cDNAの過剰発現あるいはsiRNAの受精卵注入を行い、初期胚発生における影響を検討した。siRNA注入についてはいずれの因子においても、発生に大きな影響を与えなかったが、これは6因子全てが未受精卵で既に十分量の蛋白質を発現しており、RNAiで新規の転写を抑制しても全体の蛋白質量を抑制できなかった可能性が高いと考えられた。一方過剰発現系では、6因子中1因子(因子Bとする)について、4細胞期までの胚発生停止が観察された(図2)。

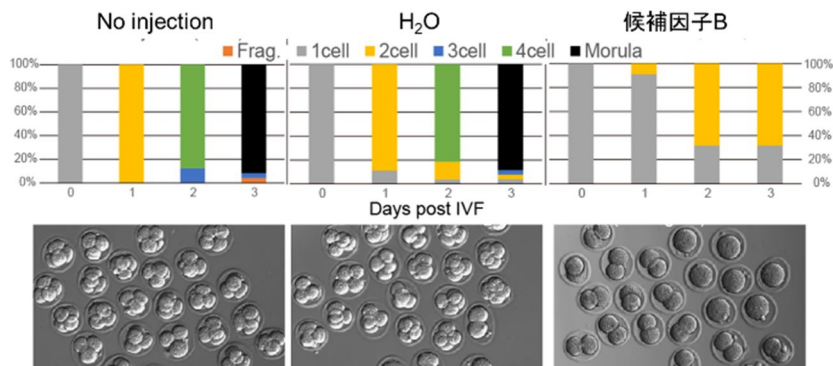


図2 候補因子Bの過剰発現は胚発生停止をきたす

近年核アクチンとリプログラミングの関係が注目を集めていることから、最終的に因子 A に焦点を当てた。1細胞期における siRNA 注入では胚発生に与える影響の観察が難しいことから、CRISPR/Cas9 を用いて KO マウスの樹立を試みた。しかし因子 A がコードされている領域には、A とアミノ酸配列で 80% 以上の相同性を示す遺伝子が、約 400 kb に渡って複数コードされており、特に機能ドメインと予想される部分のアミノ酸配列は同一であった。従って、因子 A 単独の KO は他の遺伝子によって機能的に相補される可能性が高く、この 400 kb 領域を全て欠損した KO の樹立が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----