

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18H02613

研究課題名（和文）哺乳類始原生殖細胞におけるクロマチン高次構造と核内動態変化の分子的理解

研究課題名（英文）Chromatin dynamics during primordial germ cell development in mammals

研究代表者

横林 しほり（Yokobayashi, Shihori）

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点講師

研究者番号：20615736

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類の生殖細胞発生の起源となる始原生殖細胞では、ゲノムワイドなDNAメチル化変化を伴うエピゲノム再編成が起きる。本研究では、マウス多能性幹細胞から始原生殖細胞への試験管内分化系と精子幹細胞培養系を用いて、エピゲノム、クロマチン高次構造、核ダイナミクス変化を包括的に解析した。その結果、始原生殖細胞では生殖細胞系列に特徴的なクロマチン高次状態変化が誘導され、その特徴は精子幹細胞まで継続的に維持されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖細胞は次世代に受け継がれる唯一の細胞系譜である。この継承を可能とするためにどのようなプログラムが生殖細胞発生過程に組み込まれているのか理解することは、発生研究分野の重要課題である。しかし、その希少性から、生体内試料を用いた解析手法には限界がある。本研究では、生殖細胞発生過程でおきる核クロマチン変化を理解するため、マウス試験管内再構成系を種々のクロマチン関連解析に適用することにより、生体内試料では非常に困難な包括的解析を高精度に行った。本研究で得られた知見および取得したデータは、今後の生殖細胞研究の発展に大いに貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Primordial germ cells are the origin of mammalian germ cell lineage and undergo epigenomic reprogramming, including genome-wide DNA de-methylation. In this study, using mouse in vitro reconstitution systems, we comprehensively analyzed the epigenome, chromatin higher-order structure, and nuclear dynamics states on mouse pluripotent stem cells, epiblast-like cells, primordial germ cell-like cells, and spermatogonial stem cells. Our study revealed that primordial germ cells acquire characteristic higher-order chromatin states, and the chromatin changes are continuously maintained in spermatogonial stem cells.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：始原生殖細胞 哺乳類 エピゲノム クロマチン高次構造 多能性幹細胞 in vitro誘導系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の生殖細胞の発生は、着床後胚における始原生殖細胞 (primordial germ cells, PGC) の出現により始まる。運命決定された PGC では、エピゲノム再編成、即ちゲノムワイドなメチル化 DNA (mCpG) の減少およびヒストン修飾の変化が誘導され、インプリントの消去や不活性 X 染色体の活性化 (雌個体) が起きる。興味深いことに、この時期の PGC では核径が増加することがマウス、カニクイザルおよびヒトで観察されている。加えて、ヘテロクロマチン領域の核膜周辺への再配置 (マウス) や、顕著な核小体の出現 (ヒト、カニクイザル) が PGC において観察されている。このことから、哺乳類の PGC では、エピゲノム再編成に伴い、クロマチンの高次構造および核内立体配置がダイナミックに変化していることが予想される。しかし、その詳細な分子機序や、その後の生殖細胞産生 (卵子や精子への分化過程) に果たす役割は明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、始原生殖細胞の発生期に起きるゲノムワイドなエピゲノム変化 (エピゲノム再編成) が生殖細胞発生に果たす機能を理解するため、エピゲノム再編成とそれに関わる高次クロマチン動態の詳細な分子機序を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

始原生殖細胞の発生は胎仔期初期に開始する。そのため、生体内試料を用いたゲノムワイドな解析は、その存在の稀少性から困難であった。研究代表者の所属研究室では、マウス多能性幹細胞 (胚性幹細胞、embryonic stem cells, ESCs; 人口多能性幹細胞、induced pluripotent stem cells, iPSCs) から始原生殖細胞様細胞 (PGC-like cells, PGCs) を試験管内誘導する系を 2011 年に報告した (Hayashi et al., 2011)。この系では、まず、マウス ESCs を、fibronectin 上で Activin A および basic fibroblast growth factor (bFGF) 添加培地で 2 日間培養することにより、エpiプラスト様細胞 (epiblast-like cells, EpiLCs) を誘導する。この EpiLCs を回収し、bone morphogenetic protein 4 (BMP4) を含むサイトカインを添加した培地内で浮遊凝集塊培養を行うことにより、PGCLC レポーター (Blimp1-mVenus, BV; Stella-eCFP, SC) 陽性細胞が出現する。これまでの解析から、6 日間培養後の PGCLCs は生体内胎生 9.5 日胚の PGC に相当すると考えられている。さらに、4 日目の PGCLCs を FACS により単離し M220 フィーダー細胞上に播種し 7 日間培養すると、PGCLCs が約 50 倍程度まで増殖し、ゲノムワイドな DNA メチル化レベルが胎生 13.5 日胚の PGC 相当にまで低下することが観察され (Ohta et al., 2017)。この培養 PGCLCs (culture PGCLC, cPGCLCs) では生体内 PGC で生じるエピゲノム再編成過程が再現されていると考えられる。さらに、篠原隆司博士らによって、新生仔雄マウスの精原細胞を由来とする精子幹細胞 (germline stem cells, GSCs) 培養系 (Kanatsu-Shinohara et al., 2003) が報告されている。

以上より、本研究では、初期胚から PGC におけるクロマチン変化のモデル系としてマウス試験管内再構成系を用い、ESCs、EpiLCs、PGCLCs および cPGCLCs の各細胞種の解析を行った。さらに、PGCs から前精原細胞、さらに精原細胞への分化に伴うクロマチン変化を理解するため、GSCs をモデル系として用いた。これらの細胞種を収集し、クロマチン解析 (ChIP-seq 解析、ATAC-seq 解析) およびクロマチン相互作用解析 (Hi-C 解析) データを取得し、統合解析を行った。

4. 研究成果

(1) ChIP-seq、ATAC-seq、Hi-C データの取得

まず、ChIP 法を行い、ライブラリー調整およびシーケンスデータの取得を行った。使用する抗体や必要な細胞数は、ESCs を用いた予備実験を行い決定した。行った ChIP 実験の標的は下記のとおりである。ヒストンタンパク質翻訳後修飾: H3K4me1、H3K4me3、H3K9me2、H3K9me3、H3K27ac、H3K27me3、H3K36me2、H3K36me3 および H2AK119ub1; クロマチン・核タンパク質: CTCF (クロマチン高次構造・インシュレーター因子)、Rad21 (コヒーシオン複合体構成因子)、Rnf2 (ポリコム抑制複合体) および Lmnb1 (核ラミナ構成因子)。各免疫沈降反応には、500,000 から 5,000,000 細胞を用いた。ATACseq 法は、Buenrostro et al. (2013) および Corces et al. (2017) に従い、50,000 細胞を用いて行った。in situ Hi-C 法は、Rao et al. (2013) および Belaghal et al. (2017) に従い、2,500,000 細胞を用いて行った。

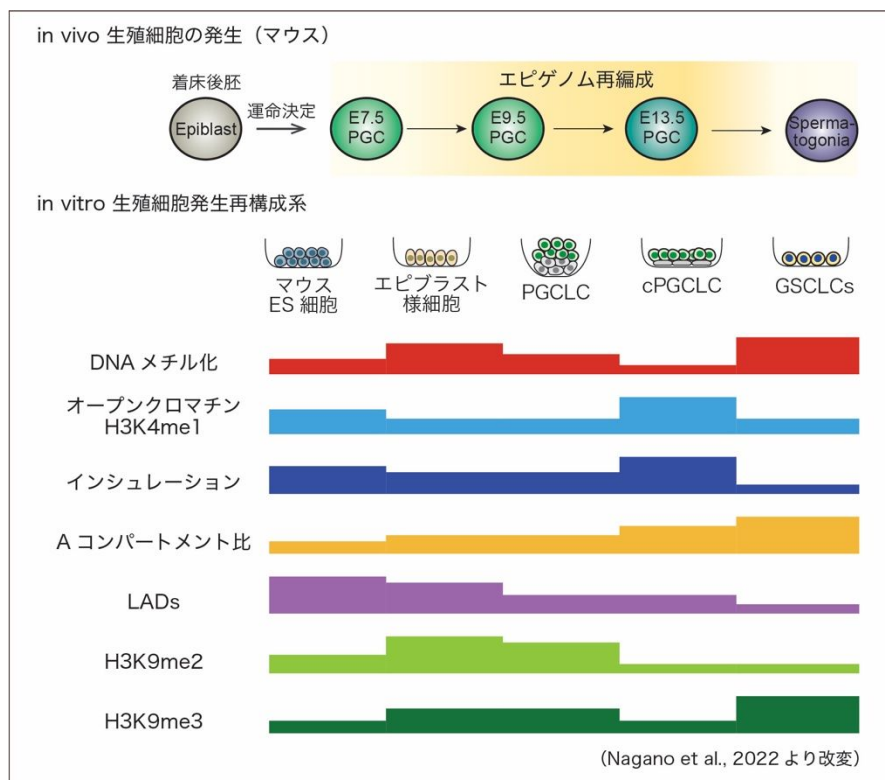
各サンプルについてライブラリー作製を行い、Illumina NextSeq 500/550 あるいは NovaSeq 6000 を用いてシーケンスを取得した。ChIP-seq および ATAC-seq ライブラリーサンプルについては約

40,000,000 リード、Hi-C ライブラリーサンプルについては約 500,000,000 リードの取得を行った。エピゲノム再編成過程では、クロマチンと相互作用する各ヒストン修飾量が変動することが知られているが、その多くは免疫染色像を基にしており、定量的な議論は困難であった。そこで、本研究では、質量分析法を用いたヒストン修飾基の定量比較解析を行い (Benjamin Garcia 博士と共同研究)、その結果を scale factor として用いて ChIP-seq データ解析を行った。

(2) ESCs から PGCLCs、GSCs への分化過程におけるエピゲノム・クロマチンダイナミクス解析
 まず、ATAC-seq および H3K4me1 に対する ChIP-seq の結果から、cPGCLC ではオープンクロマチン領域が最も増加していることが観察された。H3K4me1 は poised enhancer に特徴的なヒストン修飾である。cPGCLCs ではゲノムワイドな DNA メチル化レベルが 5% 程度まで低下することから、オープンクロマチン様な状態がより広がっていると考えられた。一方、転写活性の顕著な増加は cPGCLCs や生体内 PGCs では観察されない。転写活性には、promoter 領域と enhancer 領域のクロマチン相互作用が伴うことが知られている。そこで、Hi-C データをサンプル間で比較したところ、cPGCLCs では topologically associated domains (TADs) が最も多く存在することが観察された。TAD の領域はその境界領域に存在する CTCF などのインシュレーター作用により規定されていると考えられている。さらに、promoter/enhancer 相互作用度は cPGCLC ではより低下していることが観察された。以上より、cPGCLCs ではクロマチンのオープン化の一方、インシュレーター作用の増強により転写状態を安定に維持している可能性が示唆された。

雄性生殖細胞分化過程では、PGCs から前精原細胞、さらに精原細胞への分化に伴い、ゲノムワイドな de novo DNA メチル化が起き、メチル化レベルが上昇する。同様の解析を行ったところ、GSCs では cPGCLCs に比べオープンクロマチンが減少していた。さらに、CTCF 結合領域の減少も観察され、cPGCLCs とは対比的にインシュレーター作用が減少することで promoter/enhancer 相互作用を促進している可能性が示唆された。

一方、Hi-C データを用いたコンパートメント解析では、EpiLCs から PGCLCs、cPGCLCs、GSCs へと段階的に、転写活性領域・ユークロマチン領域を含む A コンパートメントの比率が一方向性に増加することが観察された。このことから、PGCLCs で一旦消去された後、GSCs では DNA メチル化の再獲得が起きることによってゲノムワイドなメチル化レベルが上昇するにも関わらず、巨視的 (Mb スケール) ではより転写されやすい状態へのクロマチン変化が起きていることが示唆された。このような GSCs で見られたクロマチン状態変化は、精原細胞の増殖分化や、その後の精母細胞、さらに精子細胞への分化過程に重要な役割を果たすことが予想される。



(3) ESCs から PGCLCs、GSCs への分化過程におけるクロマチン・核ダイナミクス解析
 クロマチン高次構造の形成や核内立体配置には、核構成体である核ラミナや核小体とクロマチン間の相互作用が重要な役割を果たすと考えられている。そこで、本研究では、Lamin B1 に対する ChIP-seq データを取得し、ラミナ相互作用ドメイン (lamina-associated domains、LADs) の解析を行った。その結果、ESCs から PGCLCs、GSCs では LADs 領域の段階的な減少が観察され

た。これまでに、抑制性ヒストン修飾 H3K9me2 および H3K9me3 は LADs と相関することが報告されている。cPGCLC では H3K9me2 および H3K9me3 の減少が観察された一方、GSCs では H3K9me2 は cPGCLC と同様に減少していたが H3K9me3 の増加が観察された。また、ESCs、EpiLCs、PGCLCs では LADs の濃縮は染色体の短腕側および長腕側の両方に観察されたのに対し、GSCs ではセントロメア（染色体の短腕端部分）付近を中心とした領域により LADs が濃縮して観察された。このことから、PGCLCs および GSCs への分化に伴い、染色体レベルの大規模なクロマチン再配置が起きていること、GSCs ではヘテロクロマチンがより限局的に形成されていることが示唆された。

(4) 今後の展望

本研究では、マウス試験管内生殖細胞再構成系を用いることにより、これまで生体内試料を用いては困難であった詳細な解析データを包括的に得ることに成功した。本研究により、PGCLCs および GSCs への分化過程において、ゲノムワイドな DNA メチル化レベルの変化(消去と再獲得)に連動して、オープンクロマチンやインシュレーション (TAD 形成) が変動することが示された。一方、巨視的なクロマチン動態に着目すると、PGCLCs から GSCs への分化過程においてユークロマチン領域の増加やヘテロクロマチン領域の限局性など、一方向性の変化が起きていることが示された。今後は、本研究で取得したデータを基盤とし、分子機序の理解に向けた機能解析や、ヒト・サル等、他の哺乳類始原生殖細胞で生じるエピゲノム再編成過程との比較解析を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagano Masahiro, Hu Bo, Yokobayashi Shihori et al.	4. 巻 41
2. 論文標題 Nucleome programming is required for the foundation of totipotency in mammalian germline development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	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） 10.15252/embj.2022110600	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 該当する
1. 著者名 Yokobayashi Shihori, Yabuta Yukihiro, Nakagawa Masato, Okita Keisuke, Hu Bo, Murase Yusuke, Nakamura Tomonori, Bourque Guillaume, Majewski Jacek, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 37
2. 論文標題 Inherent genomic properties underlie the epigenomic heterogeneity of human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109909 ~ 109909
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.109909	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 Yamashiro Chika, Sasaki Kotaro, Yokobayashi Shihori, Kojima Yoji, Saitou Mitinori	4. 巻 15
2. 論文標題 Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in culture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Protocols	6. 最初と最後の頁 1560 ~ 1583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41596-020-0297-5	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 Shihori Yokobayashi and Mitinori Saitou	4. 巻 1
2. 論文標題 Reconstitution of Germ Cell Development In Vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Biology of the Ovary	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-10-7941-2	査読の有無 無
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 Yamashiro Chika, Sasaki Kotaro, Yabuta Yukihiro, Kojima Yoji, Nakamura Tomonori, Okamoto Ikuhiro, Yokobayashi Shihori, Murase Yusuke, Ishikura Yukiko, Shirane Kenjiro, Sasaki Hiroyuki, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 362
2. 論文標題 Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 356 ~ 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aat1674	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9件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 横林しほり
2. 発表標題 ヒトiPS細胞株におけるエピゲノム多様性の基底をなすゲノム特性の同定
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 横林しほり
2. 発表標題 ヒト生殖細胞分化系構築を目指した多能性幹細胞の多様性解析
3. 学会等名 2022年度国立遺伝学研究所クロマチン研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長野真大
2. 発表標題 Nucleome programming is required for the foundation of totipotency in mammalian germline development
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masahiro Nagano
2. 発表標題 Nucleome programming for mammalian germ cell development.
3. 学会等名 EMBO Japan Virtual Lectures, Molecular basis of epigenetic inheritance and totipotency (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長野真大
2. 発表標題 Nucleome Programming for the Foundation of Totipotency in Mouse Germline Development
3. 学会等名 2022年遺伝研研究会、有性生殖における染色体・クロマチン・核動態に関する若手研究者の会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nagano M., Hu B., Yokobayashi S., Umemura F., Yamamura A., Ishikura Y., Yabuta Y., Ohta H., Saitou M.
2. 発表標題 Nucleome Programming for Mouse Germ Cell Development In Vitro.
3. 学会等名 ASHBi Retreat 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shihori Yokobayashi
2. 発表標題 Inherent Genomic Properties Underlie the Epigenetic Heterogeneity of Human Induced Pluripotent Stem Cells.
3. 学会等名 ASHBi Retreat 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shihori Yokobayashi
2. 発表標題 Epigenetic variations of human induced pluripotent stem cells and their implications in their propensity for germ cell development.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masahiro Nagano, Bo Hu, Shihori Yokobayashi, Akitoshi Yamamura, Yukiko Ishikura, Yukihiro Yabuta, Hiroshi Ohta, Mitinori Saitou
2. 発表標題 マウス始原生殖細胞発生過程におけるエピゲノム再編成に伴うクロマチン構造変化の解明
3. 学会等名 六甲医学研究会
4. 発表年 2019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

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			
カナダ	McGill University			
米国	University of Pennsylvania	University of Colorado Boulder	Washington University School of Medicine	
オーストリア	IMBA			