

令和 2 年 5 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14605

研究課題名（和文）卵細胞における全能性を構成する高次機能モジュールの解明と再構築

研究課題名（英文）Uncovering the transcriptional networks governing oogenesis

研究代表者

浜崎 伸彦（Hamazaki, Nobuhiko）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：10757008

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：卵母細胞は単一細胞からの個体発生が可能な唯一の細胞種である。しかし、卵母細胞を形作るメカニズムは謎に包まれてきた。そこで、本研究が挑戦した学問的問いは、「卵を卵たらしめる因子群は何か？」であった。申請者らは卵母細胞型のトランスクリプトームに切り替わる転換点を同定し、転換に必須の8因子を同定した。驚くべきことに、これらの遺伝子をES/iPS細胞で強制発現させると出生期前後相当の卵母細胞に5日で変換できることを発見した。これらの卵母細胞は減数分裂もエピゲノムリプログラミングも経ていないことから直接誘導卵母細胞（DIOs）と命名した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞に代表されるように、細胞を転写因子によって直接転換する方法はこれまでに様々な細胞種に応用され、医療応用に向けて研究開発が進んでいる。しかし何百種類以上ある細胞の中でもイレギュラーな存在である卵母細胞へと直接転換する方法はこれまでに樹立されてこなかった。今回申請者らはマウスES/iPS細胞に遺伝子導入を行い、卵母細胞へと直接転換する方法を確立した。この方法では数十日かかる卵母細胞発生ステージまでたった数日で到達した。本研究により、卵母細胞形成に必要な遺伝子セットが明らかになっただけでなく、将来的な臨床応用への障壁となりうる培養の長期化を打破しうるツールを得たと言えるだろう。

研究成果の概要（英文）：In the mammalian germ line, oocytes acquire a unique cell state with a characteristically large cytoplasm, yet the molecular mechanism triggering the acquisition is unknown. Here we defined a key transcriptional network that orchestrates the formation of oocytes in mice. Transcriptome analysis of the entire cycle of the germline revealed a huge transcriptional transition named maternal genome activation (MGA), where germ cells acquire the oocytic transcriptome. We identified eight transcription factors that were each essential for MGA. Strikingly, upon expression of these factors, pluripotent stem cells formed oocyte-like cells with a potency for fertilization by sperm. These directly induced oocyte-like cells were formed without passing through PGC specification, epigenetic reprogramming, or meiosis. This study illustrates the distinct molecular switch initiating oocyte formation, which is an essential process for the preparation of the totipotent state during germline development.

研究分野：生殖細胞

キーワード：卵母細胞 トランスクリプトーム MGA DIOs ダイレクトリプログラミング 減数分裂 エピゲノム
リプログラミング 遺伝子ネットワーク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は全能性を構築する過程の分子レベルでの解明である。全能性は単一細胞からの個体発生能として定義される、全ての多細胞生物の発生における根源的な能力である。有性生殖個体においては、全能性は生殖細胞、特に卵細胞に備えられる。しかし、120年以上、その分子実体は謎に包まれてきた。そこで、本研究が挑戦する学術的問いは、「卵を卵たらしめ、そして全能性を構成する因子群は何か？」である。

2. 研究の目的

本研究の目的は次の二つの大項目からなる。

1. 理解する: 全能性獲得を司る遺伝子群の同定と機能解明

- ・多能性—全能性転換期に出現する遺伝子ネットワークの抽出
- ・in vitro 卵培養系を用いた、ネットワーク構成因子のハイスループット機能解析

2. 再構築する: 全能性遺伝子導入による多能性細胞から全能性細胞への運命転換

- ・多能性幹細胞に導入し、全能性の再構成に挑戦

3. 研究の方法

1-1 時系列 RNA-seq による多能性—全能性転換時期の同定と遺伝子ネットワークの抽出

まずは原始卵胞卵から二次卵胞卵にかけての 5 日間の、どこが多能性—全能性の転換点かを詳しく調べる。そのために原始卵胞卵から、二次卵胞へと発生する過程を 24 時間ごとに、RNA-seq を行い、転写プロファイルが全能性型へと切り替わる時期を特定する。この転換期の前後で細胞を全能性型に切り替えるための因子が発現しているはずである。そこで、この全能性転換期に発現する遺伝子を抽出し、遺伝子発現パターンの相関値を基に遺伝子ネットワーク構造を推定する。

1-2 ネットワーク構成因子のノックアウトによる機能解明と機能モジュール同定

推定された遺伝子ネットワークの構成遺伝子の卵形成における機能をハイスループットに同定するために、CRISPR-Cas9 システムを用いて、各遺伝子のノックアウト ES 細胞ライブラリを作成する。ネットワーク構成因子のそれぞれのノックアウト ES 細胞株を用いて、in vitro 卵誘導を行い、並列的に二次卵胞卵まで分化誘導し、トランスクリプトームを評価する。

次に全能性転換に「必要」な遺伝子群が全能性転換に「十分」かを検討する。多能性型である ES 細胞に全能性ネットワーク構成遺伝子を導入し、全能性型への転換を試みる。全能性型への転換の指標には Npm2-mC-ES 細胞の mCherry を用いる。mCherry 陽性の細胞が得られたら、FACS ソートし、RNA-seq を行い、転写プロファイルから全能性型に転換しているかを評価する。

4. 研究成果

目的ごとに研究成果を記載する

大目的 1. 理解する: 全能性獲得を司る遺伝子群の同定と機能解明

- ・多能性—全能性転換期に出現する遺伝子ネットワークの抽出

申請者らは多能性-全能性転換点を同定するために、in vitro oogenesis の系を用いて、1 日おき、もしくは 2 日おきの生殖細胞をサンプリングし、時系列 RNA-seq を行った。それぞれのトランスクリプトームから、in vitro oogenesis day 11 と day13 の二日間が重要な転

換点であることを突き止めた。この転換に伴い、以下の5つの卵母細胞特異的な特徴が出現したため、この転換点を Maternal genome activation (MGA)と命名した。次にこの MGA を制御する候補因子を同定するために、Weighted gene-correlation network analysis (WGCNA)の手法を用いて、転換点周辺に特異的に出現する遺伝子ネットワークを同定し、更にこの中から転写制御因子として27 遺伝子を抽出した。

・ in vitro 卵培養系を用いた、ネットワーク構成因子のハイスループット機能解析

上記27 因子の MGA における機能を解析するためにそれぞれの遺伝子をノックアウトした ES 細胞を樹立し、それぞれから in vitro oogenesis を行い、MGA が起こるかどうかを RNA-seq を用いて判断した。その結果、Nobox, Tbp12, Lhx8, Figla, Sub1, Stat3, Sohlh1, Dnll1 が MGA において必要な因子であることが判明した。

大目的2．再構築する：全能性遺伝子導入による多能性細胞から全能性細胞への運命転換

・多能性幹細胞に導入し、全能性の再構成に挑戦

同定された MGA に必須の8 因子を ES 細胞で強制発現させたところ、ES 細胞の増殖が止まり、生殖細胞マーカーである Stella-CFP の強い発現上昇が観察された。5 日目の Stella-CFP 陽性細胞のトランスクリプトームを調べたところ、未成熟卵である原始卵胞卵に非常に近い卵母細胞様細胞 (DIOLs)に転換されていることが明らかになった。すなわち転写因子によって卵母細胞が ES 細胞から直接誘導された可能性が示唆された。更に胎児卵巣の支持細胞と混ぜて培養を進めたところ、DIOLs は支持細胞と協調して卵胞構造を形成し、誘導後8 日で Npm2-mCherry を発現し始めた。これはこれまで我々が樹立してきた in vitro oogenesis で Npm2-mCherry 発現までに必要な日数である23 日より大幅に短かったことから、通常の卵母細胞形成に必要なステップをスキップしている可能性が示唆された。特に始原生殖細胞から卵母細胞が形成される過程に減数分裂とエピゲノムリプログラミングを経る。もし DIOLs が ES 細胞から直接誘導された卵母細胞であれば、減数分裂とエピゲノムリプログラミングを経ないはずである。そこでエピゲノムリプログラミングの指標である DNA メチル化レベルを PBAT 法で調べたところ、day5 DIOLs では始点細胞である ES 細胞とほぼ同一の DNA メチル化レベルであったことから、エピゲノムリプログラミングをスキップしていたことが明らかになった。減数分裂に関しても減数分裂型の染色体構造ではなく、体細胞型の染色体構造をした卵母細胞であることが明らかになった。これらのことから DIOLs は ES 細胞から減数分裂とエピゲノムリプログラミングをスキップした卵母細胞であることが示唆された。これらの結果は減数分裂とエピゲノムリプログラミングは卵母細胞発生に必須ではないこと、そして卵母細胞を形作るための遺伝子ネットワークは減数分裂とエピゲノムリプログラミングとは可分であることを証明したことになる。これらの重要な生物学的イベントを経ない DIOLs であるが、3 週間の培養の後に in vitro growth (IVG)を経ると germinal vesicle 卵 (GV-DIOLs)に、さらに in vitro maturation (IVM)を経ると MII 卵 (MII-DIOLs)に分化し、極体を放出した。MII-DIOLs が正常な卵母細胞の特徴である受精能と卵割能を有しているか検討するため

に、野生型の精子を媒精する in vitro fertilization (IVF)を行った。その結果、MII-DIOLs は翌日には2細胞期胚に、さらに翌々日には低率ながら4細胞期胚と8細胞期胚に発生した。これらのことから DIOLs は受精能と卵割能を有する成熟卵にまで分化する能力を持っていることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浜崎伸彦
2. 発表標題 In vitro卵細胞誘導系を基盤とした卵細胞を形作る転写ネットワークの解明
3. 学会等名 第89回 動物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浜崎伸彦
2. 発表標題 Transcriptional regulatory networks controlling the oocyte identity
3. 学会等名 第17回 幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐藤 俊朗、武部 貴則、永樂 元次	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 372
3. 書名 決定版 オルガノイド実験スタンダード	

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