

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19295

研究課題名（和文）始原生殖細胞におけるDNAメチル化リプログラミングの人為操作技術の開発

研究課題名（英文）Over expression of Uhrf1 to regulate DNA methylation in PGCs

研究代表者

栗本 一基（Kurimoto, Kazuki）

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20415152

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）：親から子孫に伝えられる遺伝情報は通常はDNAの塩基配列情報だけと考えられているが、胎児の環境等の影響が次の世代に伝えられる現象も報告されている。DNAはメチル化修飾を受けることが知られているため、次の世代に伝わる塩基配列以外の情報として有望だと考えられるが、精子や卵子の形成過程で通常は消去されてしまう。本研究はDNAのメチル化を維持するために働くタンパク質UHRF1を人為操作することで生殖細胞のDNAメチル化情報を人為的に増減させることを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではUhrf1を過剰発現させるES細胞から始原生殖細胞を誘導し、その性状解析を行った。その結果、遺伝子発現の過剰発現が起きていることがわかった。このことは、子孫に受け継がれ、遺伝情報の担い手である生殖細胞のゲノムDNAに対して直接化学修飾を操作することができる可能性を示唆している。一方で、精密な発現誘導の制御には、この実験系のさらなる改良が必要なことも示唆された。

研究成果の概要（英文）：It is believed that the only genetic information transmitted from parents to offspring is usually DNA sequence information. However, it has been reported that environmental and other influences on the fetus can be passed on to the next generation. Since DNA is known to undergo methylation modification, it is thought to be a promising source of information other than base sequences to be transmitted to the next generation. Primordial germ cells (PGCs) undergo erasure of DNA methylation, before sperm and oocytes start to develop. This project aims to make a method to manipulate expression level of UHRF1 in PGCs; UHRF1 is a protein involved in maintenance of DNA methylation by recruiting DNMT1 to the replication foci.

研究分野：発生生物学・ゲノム科学

キーワード：PGC エピゲノム リプログラミング 始原生殖細胞 DNAメチル化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ゲノム情報は配偶子を介して次世代に伝達し、生命の連続性を担う。一方で、ゲノムに後成的に付与された情報(エピゲノム)は、哺乳類ではほとんど遺伝しない。これは、精子や卵子の起源である始原生殖細胞において、エピゲノムが一旦消去され、その後再構築されるという「初期化」機構によると考えられている(リプログラミング)。その一方で、父母の環境曝露の影響が、子孫の生理的形質として伝達することや、DNA配列では説明できない形質の多様性が遺伝することがよく知られており、世代間のエピゲノム継承機構が存在すると考えられている(Daxinger & Whitelaw, Nat. Rev. Genet., 2012)。

この現象の分子的情報担体として、DNAメチル化、ヒストン修飾、非コードRNAが提唱されつつも実体は不明である。ただし精子は細胞質をほとんど持たず、ヒストンの大半がプロタミンに置換されることなどから、ヒストン修飾や非コードRNAが普遍的メカニズムである蓋然性は低く、DNAメチル化が最も有力な候補であると考えられる。

2. 研究の目的

UHRF1は、DNAメチル化維持に必須な因子であり、複製フォークにDNAメチル化酵素DNMT1をリクルートする。代表者はこれまでに、マウス始原生殖細胞におけるUHRF1の発現低下と、増殖に伴ったDNAメチル化の希釈原理を発見した。また始原生殖細胞の体外再構成法を開発して、この細胞のDNAメチル化動態を体外でほぼ完全に再現し、さらに精子幹細胞への分化にも成功した。本研究の目的は、これらの独自知見と独自の再構成技術を活用して、始原生殖細胞における、DNAメチル化維持因子UHRF1の人為操作技術を開発し、世代間エピゲノム継承機構の分子的解析基盤を創出することである。

3. 研究の方法

本研究では、UHRF1を過剰発現するマウス多能性幹細胞を作出し、その性状解析、始原生殖細胞への誘導、メチル化維持活性を検討する。そのために試験管内で多能性幹細胞から誘導した始原生殖細胞のDNAメチル化プロファイルからゲノムワイドなDNAメチル化の指標となる領域を同定する必要がある。

すなわち、マウスにおいては、PGC形成過程でゲノムDNAのメチル化が消去された後、雄では前精原細胞の分化にともなってゲノムワイドに再度メチル化を受ける。この再メチル化過程でのメチル化されにくく、低メチル化状態を維持するゲノム部位は、リプログラミング過程が異常であった場合に最も影響を受けやすいゲノム部位であると予想される。したがって、体外培養系および胚体内のPGC、前精原細胞におけるゲノムワイドなDNAメチル化および遺伝子発現データを解析し、PGC形成過程で脱メチル化されるが、前精原細胞では再メチル化されず低メチル化状態を維持するプロモーターが候補となる。そのような部位を同定するために試験管内で誘導した始原生殖細胞、それを体外増殖させた細胞、前精原細胞のDNAメチル化プロファイルとヒストン修飾プロファイルを詳細に解析した。また、始原生殖細胞のリプログラミング過程で、ゲノム全体のDNAメチル化率に近い割合でメチル化率の変動を示す繰り返し配列も良い指標となる。

これらを同定した後、始原生殖細胞の蛍光レポーター(Blimp1-mVENUS, Stella-EGFP; BVSC)を有するマウスES細胞に、タグ付与UHRF1を強制発現させ、EpiLC、始原生殖細胞に分化誘導して性状解析を行い、DNAメチル化リプログラミングの人為操作に適した性能を有するかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) ゲノムワイドなDNAメチル化を代表する領域の同定

全ゲノムレベルでのDNAメチル化を評価するため、そのマーカーとなるゲノム部位を探した。始原生殖細胞は、エピプラストから分化した直後からゲノムワイドなDNAの脱メチル化が始まる。試験管内で誘導した細胞は誘導6日目(d6 PGCLC)にはゲノムワイドなDNAメチル化が概ねエピプラスト(EpiLC)の50%程度になることが、研究代表者らの研究で明らかになっている(Shirane et al., 2016)。これを代表するプロモーターをすでに同定していたが、予備検討を繰り返すと、1コピー遺伝子であるため、少数の細胞からの解析には不都合であることがわかった。このため、コピー数の多い繰り返し配列の中に、ゲノム全体の動向を代表する領域がないかどうかを検討した。レトロトランスポゾンを含む繰り返し配列は、DNAの脱メチル化に抵抗する傾向を示す。このため、プロモーターなど他のゲノム領域に近い動態を示す配列を選ぶ必要がある。Repeat maskerに登録されている配列をスクリーニングした結果、中間的なメチル化レベルであ

り、かつ、エピプラスト (EpiLC) と始原生殖細胞 (d6 PGCLC) の間の DNA メチル化の変化が、大多数のプロモーターと同等である LTR を同定した (Figure 1)。

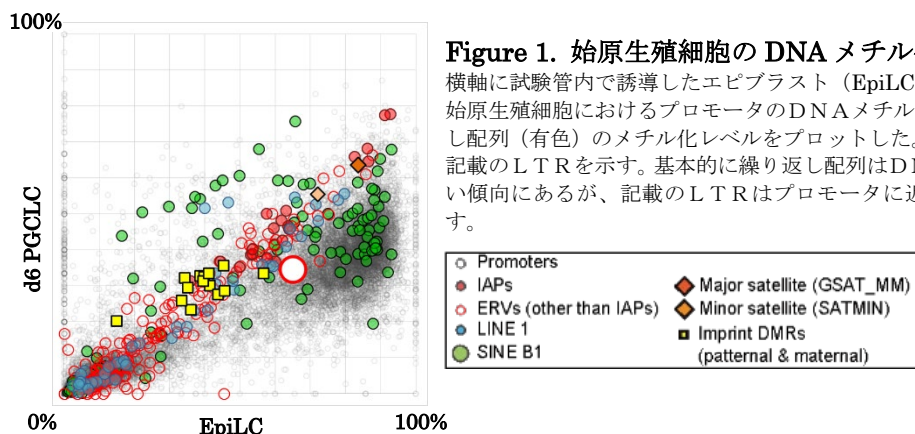


Figure 1. 始原生殖細胞の DNA メチル化動態

横軸に試験管内で誘導したエピプラスト (EpiLC)、縦軸に誘導 6 日の始原生殖細胞におけるプロモータの DNA メチル化 (灰色) と、繰り返し配列 (有色) のメチル化レベルをプロットした。白抜き赤丸で本文記載の LTR を示す。基本的に繰り返し配列は DNA の脱メチル化が遅い傾向にあるが、記載の LTR はプロモータに近いメチル化動態を示す。

(2) DNA メチル化リプログラミングを代表するプロモーター領域の同定

始原生殖細胞で脱メチル化したあと、雄性生殖細胞の分化過程で新たにメチル化が獲得されない遺伝子プロモーターを探索するため、ES 細胞、EpiLC、PGCLC (d4, d6)、さらに平面培養で増殖させた PGCLC (d4c3, d4c7)、発生 16.5 日の前精原細胞 (prospermatogonia) における DNA メチル化データから、全遺伝子のプロモーターのメチル化率を抽出した。上記のメチル化動態を示す遺伝子を抽出するため、EpiLC で 75% 以上のメチル化で、脱メチル化が完了する d4c7-PGC-like cells と発生 16.5 日の前精原細胞の両方においてメチル化率 10% 未満となる遺伝子を探索した (Figure 2)。この条件を満たす遺伝子は 1,081 個あり、DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>) による gene ontology (GO) 解析の結果、嗅覚受容体 (OlfR 遺伝子群)、鋤鼻受容体 (Vmn 遺伝子群)、免疫グロブリン遺伝子群が突出してエンリッチしていた。これらの遺伝子の正常な脱メチル化が、PGC や PGCLC の遺伝子発現に関わりうるか否かを解析した。体外培養系におけるエピゲノムリプログラミング過程および、胚内の PGC 発生過程 (発生 9.5-13.5 日) の RNA-seq データを解析し、EpiLC と比較して、ゲノムワイドな発現動態に対する相対的な発現量を検討した。ゲノムワイドな遺伝子発現パターンは既報の通り、PGC および PGCLC のいずれにおいても DNA メチル化除去の影響をほとんど受けていなかった。

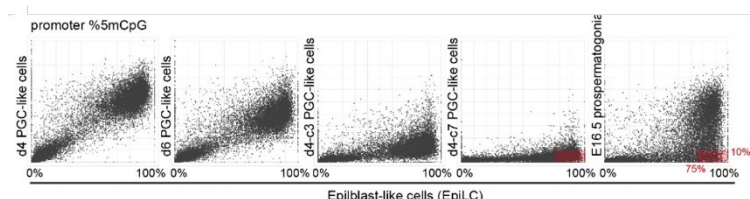


Figure 2. DNA メチル化リプログラミングを代表するプロモーター領域の探索

プロモーター領域の DNA メチル化レベルを示す。横軸に EpiLC、縦軸に試験管内始原生殖細胞分化過程の細胞を示す。強力にリプログラミングされ (EpiLC で高メチル化・PGCLC で低メチル化)、雄性生殖細胞 (精原細胞 prospermatogonia) で新たなメチル化が獲得されないプロモーターを赤棒で示す。

(3) UHRF 過剰発現系における始原生殖細胞の誘導とその性状解析

CAG プロモータの下流でタグ付き Uhrf1 の cDNA を条件付きで発現させる Blimp1-membrane Venus, stella-ECFP (BVSC) マウスからホモ接合体の細胞を樹立した。このうち、増殖と PGCLC への分化が良好であったラインを用いて、リコンビナーゼの発現ベクターを導入することで、両方のアレルからタグ付き UHRF1 を強制発現する 4 系統を作出した。これらの細胞は feeder-free で長期培養することが可能であり、正常に EpiLC および、BVSC でセルソート可能な PGCLC に分化した。遺伝子発現解析すると、内在的な Uhrf1 を上回る発現量を示すラインを得ることができた。

一方、予備的な実験では、転写アクティベーターを用いて薬剤誘導的にタグ付き Uhrf1 の cDNA を、BVSC 細胞で過剰発現させると、EpiLC や PGCLC へも、野生型の (Uhrf1 cDNA を導入していない BVSC) と同様にセルソート可能な PGCLC にサイトカイン依存的に分化した。しかしながら、

ライン間のばらつきが非常に大きかった。またいくつかの遺伝子の発現レベルが、解釈の難しい変動を示した。

これらの結果から、今後の方向性として、恒常的な発現系の性状解析をすすめるとともに、マウスでの発現制御に向けた、誘導法の改良が必要であると考えられる。すくなくとも、Uhrf1を恒常的に強制発現するマウスを作出することは困難であろう。プロモーターをCAGから、誘導可能なプロモーターに変更するか、inducible DegronやTrim awayなど、タンパク質レベルで制御可能な系に切り替えることを検討している。タンパクレベルでの制御法は、mRNAレベルで恒常的に高発現する遺伝子の一過的制御に適する報告が複数あり、今後の展開として有望である。また、Uhrf1を誘導的に発現させると遺伝子発現がPGCLCにおいて変化することは、Uhrf1にDNAメチル化維持以外のゲノム制御機能があることを示唆している。Uhrf1がES細胞においてヒストン修飾因子と競合するという過去の報告(Sharif et al., Cell Stem Cell, 2016)との関係も興味深い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kurimoto Kazuki, Saitou Mitinori	4. 巻 125
2. 論文標題 Germ cell reprogramming	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Top Dev Biol	6. 最初と最後の頁 91-125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.ctdb.2019.04.005	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 Kobayashi Toshihiro, Kobayashi Hisato, Goto Teppei, Takashima Tomoya, Oikawa Mami, Ikeda Hiroki, Terada Reiko, Yoshida Fumika, Sanbo Makoto, Nakauchi Hiromitsu, Kurimoto Kazuki, Hirabayashi Masumi	4. 巻 147
2. 論文標題 Germline development in rat revealed by visualization and deletion of Prdm14	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 183798-183798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.183798	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 Nagaoka So I., Nakaki Fumio, Miyauchi Hidetaka, Nosaka Yoshiaki, Ohta Hiroshi, Yabuta Yukihiko, Kurimoto Kazuki, Hayashi Katsuhiko, Nakamura Tomonori, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 367
2. 論文標題 ZGLP1 is a determinant for the oogenic fate in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 4115 ~ 4115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aaw4115	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 Kurimoto K, Saitou M	4. 巻 52
2. 論文標題 Epigenome regulation during germ cell specification and development from pluripotent stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr Opin Genet Dev	6. 最初と最後の頁 57-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gde.2018.06.004	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 Ohta Hiroshi, Yabuta Yukihiro, Kurimoto Kazuki, Nakamura Tomonori, Murase Yusuke, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 104
2. 論文標題 Cyclosporin A and FGF signaling support the proliferation/survival of mouse primordial germ cell-like cells in vitro†	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 344 ~ 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iaaa195	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 Nagaoka So I., Saitou Mitinori, Kurimoto Kazuki	4. 巻 18
2. 論文標題 Reconstituting oogenesis in vitro: Recent progress and future prospects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research	6. 最初と最後の頁 145 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.coemr.2021.03.022	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 Kurimoto Kazuki, Ikeda Hiroki, Kobayashi Hisato	4. 巻 21
2. 論文標題 Epigenome reprogramming in the male and female germ line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Epigenetics and Reproductive Health	6. 最初と最後の頁 3 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-819753-0.00001-5	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 栗本一基	4. 巻 52
2. 論文標題 始原生殖細胞発生過程におけるDNAメチル化リプログラミング	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊 細胞	6. 最初と最後の頁 508-511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 長岡 創、栗本一基、斎藤通紀	4. 巻 38
2. 論文標題 マウス卵母細胞運命決定機構の解明	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1893-1896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 栗本一基
2. 発表標題 組織学にリンクした定量的な単一細胞遺伝子発現解析法の開発に向けて
3. 学会等名 日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗本一基
2. 発表標題 単一細胞遺伝子発現解析の展望
3. 学会等名 「生体5次元情報」を解読する医工計測技術を創出する「知・もの・人」づくり計画 キックオフシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗本一基
2. 発表標題 始原生殖細胞の発生とエピゲノムリプログラミング
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021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
---------	---------