

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20710151  
 研究課題名 (和文) 体系的 RNAi による ES 細胞から始原生殖細胞への分化に関わる遺伝子群の探索  
 研究課題名 (英文) RNAi screening for genes involved in differentiation of embryonic stem cells into primordial germ cells.  
 研究代表者  
 前田 郁麻 (IKUMA MAEDA)  
 東北大学・加齢医学研究所・助教  
 研究者番号：20376560

## 研究成果の概要 (和文)：

本研究では、胚性幹細胞 (ES 細胞) を哺乳類初期胚のモデルと考え、始原生殖細胞発生に関わる遺伝子を RNA 干渉法 (RNAi) を用いて検索する系を構築した。マウス ES 細胞で発現している 864 遺伝子を標的にして試験的なスクリーニングを行ったところ、5 つの陽性遺伝子を発見することができた。生殖細胞関連マーカーの発現変化などから、それらの遺伝子を機能阻害した ES 細胞は後期生殖細胞の性質を獲得していることが示唆された。

## 研究成果の概要 (英文)：

In this study, we utilized mouse embryonic stem cells as an in vitro model for embryogenesis and developed an RNAi screening system for identifying genes involved in development of primordial germ cells. We performed a pilot screen of 864 genes and identified five candidate genes. Knockdown of these genes in ES cells led to a significant increase in expression of germ cell specific genes and these cells seemed to acquire properties of late stage primordial germ cells to some extent.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

## 研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：生殖細胞、ゲノム、発生・分化

## 1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は次世代へとつながる唯一の細胞であり、生命の根幹を支える極めて重要な細胞である。そして、ほ乳類の胚発生過程において多能性のある細胞集団から生殖細胞のもととなる始原生殖細胞が生まれてくる機構には特に興味深いものがある。近年、ゲノム情報をベースとした網羅的な遺伝子機能解析が主

流となりつつあるが、高等動物の胚をもちいてそのような研究を行うには大きな困難が伴う。以上の観点から本研究は、次の二点を目標として研究を遂行する。

マウス ES 細胞をほ乳類の初期発生モデルとして考え、胚発生時に生殖細胞が分化していく機構を探る手がかりとする

機能阻害によりES細胞を始原生殖細胞への分化を誘導できる遺伝子を体系的なRNAiを用いてゲノムワイドに検索する

### (1) ほ乳類の発生とES細胞

ほ乳類はその初期発生において受精卵はいったん多能性の高い細胞集団になってから各組織に分化していくという過程をとる。この最初の多能性の高い細胞を胚から取り出して培養細胞として樹立したものがES細胞である。ES細胞はその由来から、分化における多能性を持っていることが予想されており、実際、胚に戻すと生殖細胞を含む全ての細胞系列に分化することができる。また、*in vitro*での分化系においても様々な組織に分化することが知られている。

ES細胞は胚発生における多能性の高い細胞集団であるエピブラストの性質を反映しているとされている。始原生殖細胞はエピブラストから生まれることが知られているが、その機構のモデルとしてES細胞を用いることができると考えられる。

### (2) RNAi を用いた大規模な機能スクリーニング

RNAi は手軽で簡便な遺伝子機能破壊のツールとして近年急速に発展した手法であるが、哺乳類の場合は siRNA と呼ばれる約 20 塩基対程度の短い配列を設計する必要がある。近年、ノックダウン効果の高い siRNA を効率的に設計する方法が確立され、従来は線虫などの下等生物で行われてきた全遺伝子を対象とするような大規模な RNAi スクリーニングが哺乳類細胞においても可能なものとなった。

## 2. 研究の目的

マウスES細胞から生殖細胞を分化させる研究はすでに先行研究がいくつか行われている。しかしながらどの研究も成熟した生殖細胞への分化を誘導することそのものに主眼を置いたものであり、遺伝学的な解析や胚発生との関係まで踏み込んだ研究はほとんど行われてこなかった。

そこで、本研究では、胚発生における始原生殖細胞の発生過程の解明を念頭に置きながら、ES細胞から生殖細胞へ分化する機構の遺伝学的な解析を行うことを目標とし、RNA干渉法 (RNA interference; RNAi) を用いたゲノムワイドな体系的スクリーニングを行うことを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) ES細胞から始原生殖細胞への分化をモニタリングできる細胞

mouse vasa homolog (Vasa) はマウスにおいて生殖細胞特異的に発現する事が知られている遺伝子である。当研究室ではVasaのプロモーター下にRFPをつなげたコンストラクトを持つES細胞、VR15が樹立されている。Vasaは現在知られている限りでは最も生殖細胞への特異性が高いマーカーであり、VR15を用いてトランスジェニックマウスを作ると始原生殖細胞特異的にRFPの発現が見られることが確認済みである。また、VR15を培養条件下で分化させると、非常に出現頻度は低いもののRFPの蛍光を発する細胞が認められ、それらの細胞が内在性のVasaタンパク質も発現していることも確認済みである。従って、RNAiによりVasaプロモーターが活性化するような遺伝子、すなわちES細胞が始原生殖細胞へ分化するのを抑えているような遺伝子を、RFPの蛍光を指標にしてスクリーニングすることが可能と考えられる (図1)。

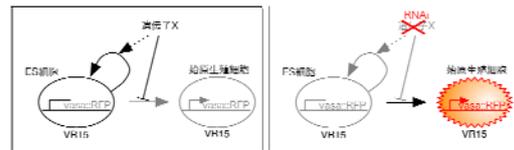


図1 VR15を用いたES細胞から始原生殖細胞への分化をモニタリングするシステム

### (2) 実際のスクリーニングの概要

実際のスクリーニングは96ウェルプレートでVR15を培養して行い、1ウェルにつき1遺伝子に対するRNAiを行って遺伝子機能阻害を行っていく。

VR15へのsiRNAの導入には高い導入効率とRNAi効果が確認されているリポフェクション法を用いる。導入後一週間ほど培養し、RFPの蛍光を検出する。長期培養しなければ変化が見られないものや、逆に長期培養すると致死になってしまうものもあるかもしれないので、RFPの検出は日ごとに行っていく。VR15の培養条件は未分化条件下・分化条件下の両方を検討する。前者の方が安定した培養ができるが、後者は条件が緩くなるのでより多くの候補クローンが期待できる。

### (3) 検出系の自動化

RFPの蛍光を網羅的に検出するために電動ステージを備えた蛍光倒立顕微鏡に低倍率のレンズを設置し、96ウェルプレートの全てのウェルについて自動的に細胞の蛍光画像を取得することを可能とした。さらに、取得し

た画像を解析ソフトで処理することにより、蛍光を発した細胞の検出を半自動で行えるようにする (図 2)。

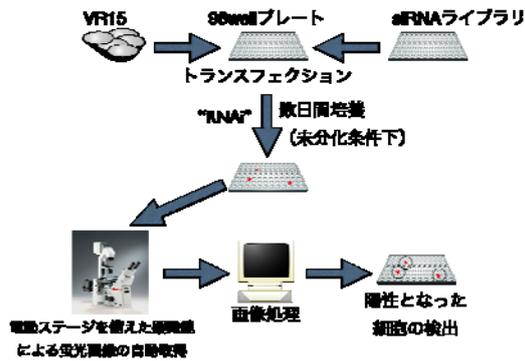


図2 RNAiスクリーニングの概要

#### 4. 研究成果

##### (1)パイロットスクリーニングの結果

パイロットスクリーニングとして、マウス ES 細胞で発現していることがわかっている遺伝子のうち、864 遺伝子を選び、それらに対する siRNA のライブラリを用いて上記の検出系を用いたスクリーニングを未分化条件下で試みた。その結果、RFP の蛍光がはっきりと上昇した遺伝子を 5 つ得ることができた (図 3, 図 4)。

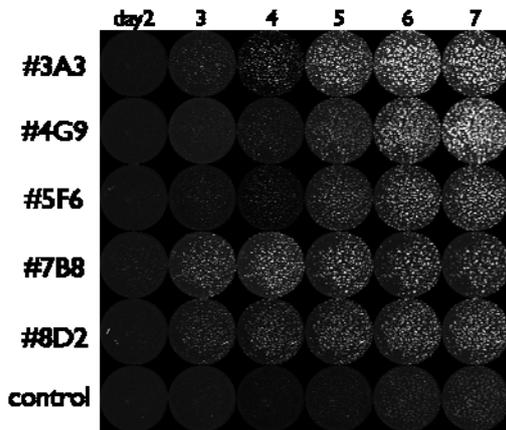


図 3 VR15 に対して 5 つの遺伝子をそれぞれ機能阻害したときの RFP 蛍光の経時変化

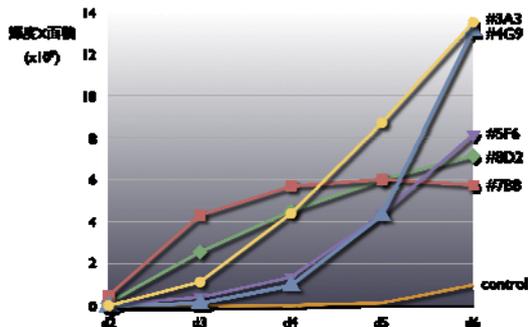


図 4 図 3 の蛍光変化をグラフ化したもの

これらの 5 つの候補遺伝子それぞれについて機能阻害した VR15 では、すべて内在性 Vasa の発現が上昇していることを確認した。さらに、VR15 以外の Vasa::蛍光タンパク質レポーターを有するマウス ES 細胞株でも、これらの遺伝子について機能阻害すれば同様に蛍光マーカーの上昇が見られたことから、この現象は細胞株やレポーターに依存しないことがわかった。また、複数遺伝子を同時に機能阻害した場合、さらに Vasa::RFP の蛍光が上昇する相乗効果が見られたことから、ES 細胞から始原生殖細胞へと変化する過程には複数の経路が関わっている可能性も示唆された。

##### (2) Vasa::RFP 陽性となった細胞の性質

候補遺伝子を機能阻害して得られた Vasa::RFP 陽性細胞が実際に生殖細胞としての性質を獲得しているかどうかを確認するために、まず生殖細胞系列関連遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR により調べた。胚発生初期の生殖系列マーカーについては、未分化 ES 細胞に比べて 1.5 倍から 2.5 倍程度の中程度の発現上昇が見られたが、Dazl や Stra8 といった後期生殖細胞の発現は十数倍から百倍前後の大幅な発現上昇が見られた。さらに、減数分裂のマーカーである Scp3 タンパク質の発現を免疫染色により確認したところ、RFP 蛍光強度の上昇がもっとも顕著だった 1 遺伝子については、発現が上昇しているに加えて、核内でドット状の局在を示すようになった (図 5)。これは減数分裂への移行を示唆するものである。さらに、後期始原生殖細胞では発現が低下することが知られている表面抗原 SSEA-1 の発現が、RFP 陽性細胞では低下していた。以上の結果から、マウス ES 細胞はこの遺伝子の機能阻害により後期始原生殖細胞の性質を獲得する可能性が示唆された。

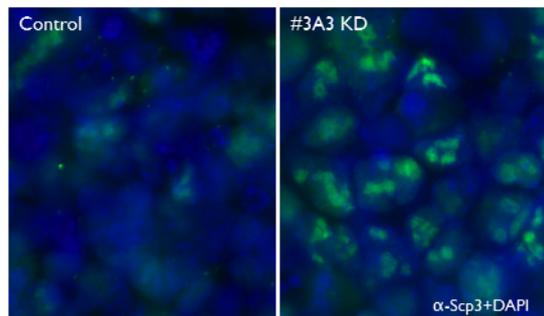


図 5 減数分裂マーカー Scp3 の発現 (青:DAPI 緑:Scp3)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Ikuma Maeda, Yasuhisa Matsui. In vitro assay system for primordial germ cell development

*Cell Research* **19**, 1125-1126 査読無し, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 郁麻 (IKUMA MAEDA)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：20376560

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし