

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06605

研究課題名(和文) マウス胚において全能性を規定する分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms governing totipotency in mouse embryos

研究代表者

富川 順子 (Tomikawa, Junko)

東京大学・生命科学ネットワーク・特任助教

研究者番号：80534990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマウスをモデルとして、2細胞期胚で見出された核内のDNA高次構造が全能性という性質にどのような役割を担っているのか検証することを目的とした。そのため、2細胞期胚で見出された染色体間インタラクションの可視化を試みるとともに、その構造形成に関わる因子の同定を目指した。3D DNA-FISH法により、ハブ状の17番染色体と11番染色体の領域との相互作用がみとめられた。しかし、モチーフ解析からCux1タンパクの関与が示唆されたが、Cux1ノックアウトマウスは胎生9.5日の時点までは発生しており、全能性自体に関わる因子ではない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

分化した体細胞の核を人為的に初期化(リプログラミング)する方法としては、体細胞核を除核した卵子に移植する方法、体細胞をES細胞と融合する方法、あるいは特定の転写因子群を体細胞に導入する方法が知られている。しかし、これらのリプログラミング法に比べて自然生殖での全能性獲得の効率は圧倒的に高い。つまり、自然生殖における全能性獲得の分子機構の解明は、正常発生におけるリプログラミング機構の理解だけでなく、体細胞核を効率よくリプログラミングする方法の開発につながり、良質なiPS細胞などを用いた再生医療への応用といった観点からも極めて重要といえる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I used the mouse as a model to examine the role of higher-order nuclear DNA structures found in 2-cell stage embryos in the property of totipotency. 3D DNA-FISH analysis revealed a hub-shaped interaction between chromosome 17 and chromosome 11. On the other hand, while motif analysis suggested the involvement of Cux1 protein in hub formation in 2-cell mouse embryos, Cux1-knockout mice develop up to 9.5 days of gestation. These results indicated that Cux1 is not a factor involved in totipotency itself.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：全能性 ゲノム高次構造

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Hi-C によるゲノムワイドなクロマチン構造解析が広く普及したことで、ゲノムの三次元空間構造と遺伝子発現制御との関わりが明確になってきた。間期のゲノム DNA は 1 Mb ほどの Topologically associating domain (TAD) という区画化された高次構造体を形成しており (Dixon et al., Nature, 2012)、転写の活発な TAD が集合した A コンパートメント、不活性な TAD が集合した B コンパートメントを形成している (Lieberman-Aiden et al., Science, 2009)。TAD が異なる細胞種間でも保存されている一方、A/B コンパートメントは動的に変化することも明らかになった (Dixon et al., Nature, 2015; Rao et al., Cell, 2017; Miura et al., Nat Genet, 2019)。さらに各染色体 DNA は互いに相容れない一定の核内空間 Chromosome territory に区画化されていることから、遺伝子発現の制御は、通常、各染色体内 (intrachromosomal) で形成される上記のドメイン群の挙動によって完結しているように考えられがちで、染色体間相互作用 (inter-chromosomal) に関する研究は進んでいない。染色体間ほど長距離間での相互作用は、Hi-C では検出が困難であるという特徴もそれを後押しした。

マウス胚を用いた Hi-C によると、初期発生過程の 4~8 細胞期までは明確な TAD は形成されないことが報告されている (図 1) (Ke et al., Cell, 2017; Du et al., Nature, 2017)。しかしこの時期、胚性ゲノムからの遺伝子発現はすでに行われている。つまり、TAD が未熟な初期胚では、Hi-C では見えない染色体間相互作用を介した発現調節機構が重要な役割を果たしている可能性がある。

通常 Hi-C 法では、染色体内相互作用が主要な長距離クロマチン相互作用であり、染色体間相互作用は手技的なミスによるもの、またはレアな相互作用であると判断され除かれてしまう (Li et al., Cell, 2012; Schoenfelder et al., Genome Res, 2015)。しかし、それを念頭において、データベース上に登録されている 2 細胞期胚の Hi-C 生データを再解析したところ、申請者は、全能性を有するマウス 2 細胞期胚では、染色体間相互作用の割合が他の細胞に比べて高いことを見出した。さらにこの染色体間相互作用によって、2 細胞期胚には、胚盤胞期では見られない、ゲノムの特定の領域を基点とした高次構造が形成されていることが示唆された (図 2)。このゲノム領域にはリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) の偽遺伝子が存在していたが、マッピングに利用した参照配列に rDNA の配列情報は含まれないことから、2 細胞期胚での rDNA 領域との相互作用を再検証したところ、2 細胞期胚では、ゲノムの多数の領域が rDNA 領域と相互作用していることが明らかになった。全能性を有する 2 細胞期胚では、TAD などのようなドメイン状の高次構造は不完全でアクセシビリティも高く、よりオープンな状態にあることが報告されている (Ke et al., Cell, 2017; Du et al., Nature, 2017)。しかし上記のことから、全能性を保持している 2 細胞期胚で、rDNA が集結していると思われる核小体を基点とした 2 細胞期胚特異的な核内ゲノム高次構造が形成されている可能性が示唆された。分化全能性という性質との関わりからも非常に興味深い。2 細胞期胚特異的な核内ゲノム高次構造が全能性という性質においてどのような役割を担っているのかを確かめるため、この 2 細胞期胚において全能性獲得に寄与するゲノム領域、クロマチン構造や新たな制御因子の同定を試みる。

2. 研究の目的

前述の通り、本研究では、2 細胞期胚において全能性獲得に寄与しているゲノム領域、クロマチン構造や新たな制御因子の同定を試みる。

3. 研究の方法

本研究計画では、大別して 2 つの項目を進めていく。

- ① 生細胞蛍光イメージング法による核内ゲノム動態の観察

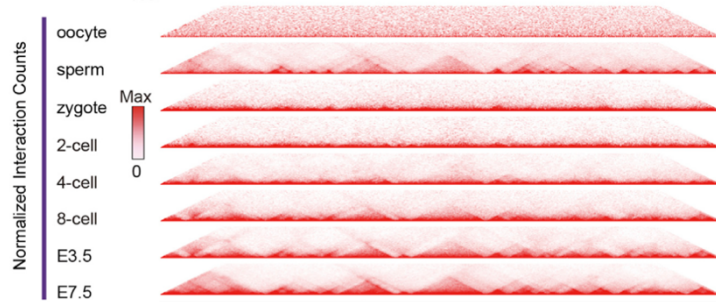


図 1 マウス初期発生胚における Hi-C 二次元コンタクトマップ。各領域が相互作用している確率が高いほど赤くなるように示されている。

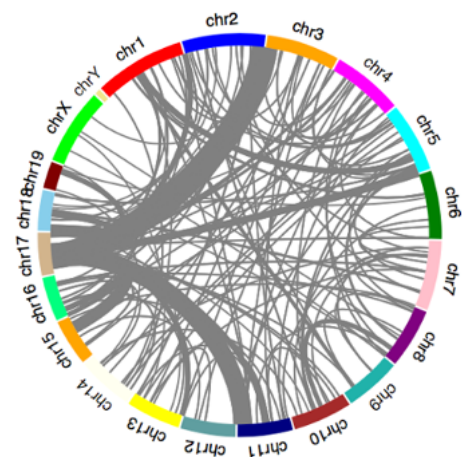


図 2 2 細胞期胚特異的なゲノム高次構造。2 細胞期胚での Hi-C の結果をサークル状にマッピングすると、17 番染色体に多数の異なる染色体領域が集積していた。

[1] 蛍光イメージング法によるマウス 2 細胞期核内でのゲノム高次構造の確認

2 細胞期核内で rDNA がすでに核小体に集結しているのか、未だ核内に分散しているのか、Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法あるいは蛍光標識 dCas9 を用いた蛍光イメージング法により各 rDNA 配列の核内分布状況を確認する。並行して、rDNA 領域と相互作用していた配列群が実際に rDNA 配列部分に集結しているのか、蛍光標識 dCas9 を用いた方法で可視化する。

② 2C 特異的な核内高次構造形成に寄与しているタンパク質の同定とその生理機能解析

- [1] 2C 特異的な核内高次構造形成に寄与している可能性のあるタンパク質の推定
- [2] 推定されたタンパク質の、2 細胞期胚での細胞内（核内）分布の確認
- [3] ゲノム編集による標的タンパク質のノックアウトおよび表現型解析

項目[1]では、rDNA に集結していた配列情報から、モチーフ解析などによりこの 2 細胞期胚特異的な核内高次構造形成に寄与している可能性のあるタンパク質を推定する。項目[2]では、項目[1]から推定されたタンパク質について、順次、免疫染色を行い、2 細胞期胚での細胞内（核内）分布状況を可視化し確認する。項目[3]では、項目[1]、[2]で rDNA 配列との共存が明らかになったタンパク質について、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により標的タンパクをノックアウトし、表現型を解析する。ノックアウトにより、2 細胞期胚以後、正常に発生するのかどうか、まずはホモ欠損マウスが生まれるのかどうかを検証する。生まれない場合には、どの段階で致死になっているのか、発生を遡って解析する。

4. 研究成果

実験①に関しては、当初、リボソーム DNA を基点として他のゲノム領域が集結していると考え、dCas9-mCherry mRNA を標的配列に対する sgRNA とともに受精卵にインジェクションし、2 細胞期胚において mCherry のシグナルの検出を試みたが、特異的なシグナルを得ることはできなかった (図 3)。

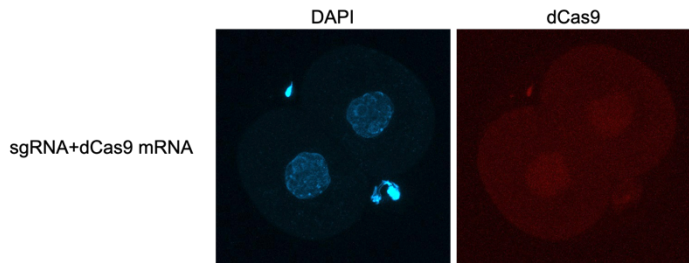


図 3 mCherry-dCas9 を用いた蛍光イメージング

そこで可視化手段を 3D DNA-FISH 法に変更し、各染色体間でのインタラクションの可視化を試みた。その結果、ハブ状の 17 番染色体と 11 番染色体の領域との相互作用がみとめられた (図 4)。他の領域についても現在解析を進めているが、基点となっているのがリボソーム DNA ではなく、ハブとなっていた 17 番染色体である可能性が強く示唆される結果となった。

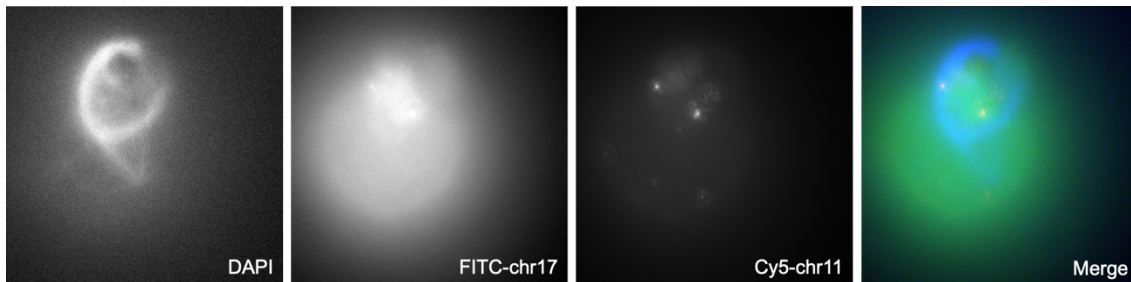


図 4 3D DNA-FISH による染色体感相互作用の検出

実験②に関しては、まず、rDNA に集結していた配列情報から、モチーフ解析によりこの 2 細胞期胚特異的な核内ゲノム高次構造形成に寄与している可能性のあるタンパク質の推定を試みた (図 5)。その結果、Cux1 が有意に enrich していたことから、2 細胞期胚での Cux1 タンパクの細胞内局在状況を見たところ、核小体への集結がみとめられた (図 6)。そこで、この Cux1 タ

Rank	Motif	P-value	log P-value	% of Targets	% of Background	STD(Bg STD)	Best Match/Details	Motif File
1	IGATCAAT	1e-1088	-2.506e+03	61.53%	39.08%	54.1bp (69.2bp)	PH0016.1_Cux1.1/Jaspar(0.766) More Information Similar Motifs Found	motif_file (motif1)
2	GTGGACACTGT	1e-97	-2.241e+02	4.0%	0.02%	56.2bp (53.8bp)	PB0099.1_2/p691.1/Jaspar(0.746) More Information Similar Motifs Found	motif_file (motif2)
3	TGGCCACCACT	1e-96	-2.220e+02	2.7%	0.01%	35.9bp (52.2bp)	Bcl11a(Zf)HSPC-BCL11A-ChIP-Seq(GSE104676)/Homer(0.656) More Information Similar Motifs Found	motif_file (motif3)
4	CCGGTAATAGTG	1e-87	-2.009e+02	2.5%	0.01%	33.4bp (31.6bp)	Me(2a)MADS/HLI-Me(2a)biotin-CHIP-Seq(GSE21529)/Homer(0.640) More Information Similar Motifs Found	motif_file (motif4)
5	TCACCTTTCIT	1e-85	-1.967e+02	2.5%	0.00%	28.6bp (0.8bp)	Nur71(NR)K562-NRA1-1-CHIP-Seq(GSE1363)/Homer(0.735) More Information Similar Motifs Found	motif_file (motif5)
6	TGAATCTTGAC	1e-81	-1.884e+02	2.4%	0.00%	34.3bp (0.8bp)	PB0176.1_Sox5.2/Jaspar(0.656) More Information Similar Motifs Found	motif_file (motif6)
7	ICTCAGSCGG	1e-81	-1.873e+02	2.9%	0.01%	34.6bp (49.2bp)	TFAP2C(Var.2)/MA0814.2/Jaspar(0.672) More Information Similar Motifs Found	motif_file (motif7)
8	TGGTGGTTGTGG	1e-81	-1.873e+02	2.9%	0.01%	41.7bp (24.9bp)	KL19/MA1107.2/Jaspar(0.733) More Information Similar Motifs Found	motif_file (motif8)
9	CAAATCTTGGAA	1e-76	-1.765e+02	2.7%	0.01%	51.4bp (51.6bp)	ZNF7(Zf)/Heg2-ZNF7-Flag-CHIP-Seq(Encode)/Homer(0.719) More Information Similar Motifs Found	motif_file (motif9)
10	CTCAGCTCCA	1e-75	-1.729e+02	2.7%	0.01%	42.0bp (19.7bp)	NF1-halfsite(CTF)/LNCaP-NF1-CHIP-Seq(Unpublished)/Homer(0.620) More Information Similar Motifs Found	motif_file (motif10)

図 5 モチーフ解析による関連タンパク質の推定

ンパク質については CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集によるノックアウトを試みた。この Cux1 ノックアウトマウスは、胎生致死となったことから、どの段階で致死となっているのか発生段階を遡って検証した。その結果、胎生 9.5 日の時点までは発生しており、その後神経管の形成がうまくいかずに致死となっていることがわかった (図 7)。したがって、全能性獲得に関わる因子ではないことが明らかになった。



図 7 Cux1 ノックアウトマウスの 9.5 日胚

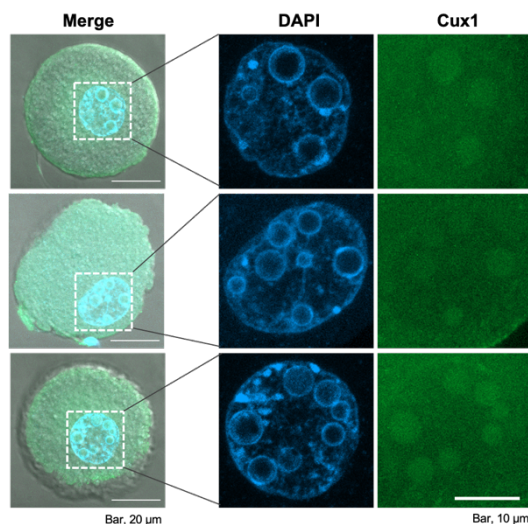


図 6 Cux1 の 2 細胞期胚での核内分布

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tomikawa Junko, Penfold Christopher A., Hatakeyama Rena, Miyamoto Kei	4. 巻 3
2. 論文標題 Nuclear transfer system for the direct induction of embryonic transcripts from intra- and cross-species nuclei using mouse 4-cell embryos	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101284 ~ 101284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2022.101284	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 Tomikawa Junko, Penfold Christopher A., Kamiya Takuma, Hibino Risa, Kosaka Ayumi, Anzai Masayuki, Matsumoto Kazuya, Miyamoto Kei	4. 巻 24
2. 論文標題 Cell division- and DNA replication-free reprogramming of somatic nuclei for embryonic transcription	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103290 ~ 103290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103290	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 Tomikawa Junko, Miyamoto Kei	4. 巻 -
2. 論文標題 Structural alteration of the nucleus for the reprogramming of gene expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FEBS 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) 10.1111/febs.15894	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 -
1. 著者名 Shindo T, Ihashi S, Sakamoto Y, Okuno T, Tomikawa J, Miyamoto K.	4. 巻 mvaa125
2. 論文標題 Visualization of endogenous nuclear F-actin in mouse embryos reveals abnormal actin assembly after somatic cell nuclear transfer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biochem.	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) 10.1093/jb/mvaa125	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 -

1. 著者名 Minabe S, Nakamura S, Fukushima E, Sato M, Ikegami K, Goto T, Sanbo M, Hirabayashi M, Tomikawa J, Imamura T, Inoue N, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda KI, Matsuda F	4. 巻 66
2. 論文標題 Inducible Kiss1 knockdown in the hypothalamic arcuate nucleus suppressed pulsatile secretion of luteinizing hormone in male mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Reprod Dev.	6. 最初と最後の頁 369-375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2019-164	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 -

1. 著者名 Ikegami K, Goto T, Nakamura S, Watanabe Y, Sugimoto A, Majorune S, Horihata K, Nagae M, Tomikawa J, Imamura T, Sanbo M, Hirabayashi M, Inoue N, Maeda KI, Tsukamura H, Uenoyama Y	4. 巻 66
2. 論文標題 Conditional kisspeptin neuron-specific Kiss1 knockout with newly generated Kiss1-floxed and Kiss1-Cre mice replicates a hypogonadal phenotype of global Kiss1 knockout mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Reprod Dev.	6. 最初と最後の頁 359-367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-026	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 富川順子
2. 発表標題 マウス胚を用いた細胞分裂・DNA複製非依存的転写リプログラミング
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会
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
---------	---------