

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650065

研究課題名(和文) 始原生殖細胞の潜在的多能性を司る基盤転写因子ネットワークの解明

研究課題名(英文) Analysis of a transcriptional network for potential pluripotency in primordial germ cells

研究代表者

栗本 一基 (Kurimoto, Kazuki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20415152

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)：精子や卵子の源である始原生殖細胞は、胎児の中で一過的に形成される細胞種であり、全ての細胞に分化しうる能力(多能性)を潜在的に保持する。多能性幹細胞などの顕在化した多能性は奇形種の原因となり生体に有害であるが、多能性を潜在化させる転写制御メカニズムは未解明である。研究代表者は近年、少数細胞における転写因子の結合部位を同定することのできる微量ChIP-seq法を開発した。本研究では、始原生殖細胞における多能性の形成・維持を司る転写因子群の結合部位の解析への応用を検討し、始原生殖細胞様細胞において、OCT4の結合パターンが多能性幹細胞と異なり、特有の転写ネットワークを形成する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Primordial germ cells (PGCs), precursors of sperm and oocyte, is an embryonic cell type, which potentially possess the pluripotency, a cellular ability to give rise to all of cell types in the body. The explicit pluripotency (e.g., pluripotent stem cells, mis-migrate PGCs) is a harmful property, which give rise to teratoma, but the mechanism to make pluripotency to be a "potential" one is largely elusive. Recently, I developed a method to faithfully identify genomic binding sites of transcription factors in a small number of cells (~10,000 cells). In this study, I investigated application of this method to pluripotency transcription factors expressed in PGCs, and identified the OCT4 binding pattern in PGC-like cells distinct from that of ES cells, suggesting a transcription network characteristic of potential pluripotency.

研究分野：分子生物学・ゲノム科学

キーワード：ChIP-seq OCT4 始原生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞系列は次世代に遺伝情報を伝達し、生命の連続を保證する唯一の細胞種である。このため、生殖細胞の発生にはゲノムの正確な複製や、減数分裂による多様化とともに、全個体を完全に発生させる能力の獲得が含まれる。生殖細胞の起源は始原生殖細胞であり、胚発生の初期に多能性の上皮様組織（エピプラスト）から分化して生ずる。興味深いことに、始原生殖細胞を一定の条件下で培養すると、ES 細胞や iPS 細胞と同様の分化能をもつ多能性幹細胞(Embryonic Germ Cell : EG 細胞)へと分化する。また始原生殖細胞は、奇形腫(三胚葉の全てに由来する細胞を含む、多能性の機能的指標の一つ)や胚生期癌の起源である。さらに、多能性幹細胞の基盤転写因子の発現は、生体内では初期胚と生殖細胞系列にほぼ限定される。すなわち始原生殖細胞は潜在的に多能性を保持しつつ、その顕在化を抑制しているといえる。奇形腫は多能性幹細胞を医療利用する際の安全性問題としても重要であると考えられる。

転写因子による転写制御ネットワークを解析するためには、そのゲノム結合部位を同定すること、また転写制御に関わるエピゲノム状態（ヒストン修飾等）との関係を解析することが必要である。しかしながら、技術的な限界によって、転写因子のゲノム結合部位の同定には基本的には 10^7 程度の細胞が必要であり、その知見は多数の細胞を入手可能な培養細胞、血球系の細胞種、また組織や臓器まるごと限定されており、生体内の特定の細胞系譜や、培養系であっても多数の細胞を得ることが困難な系における解析はほとんど行われていなかった。この状況は、現在においても基本的に変わっていない。

研究代表者は、近年、転写因子にタグを付与し、ChIP-seq によって少数の細胞における結合部位を解析する手法（転写因子微量 ChIP-seq 法）を開発した。この技術基盤によって、いままで解析の対象になりえなかった少数の細胞や、生体内の特定の細胞系譜の分化過程における転写因子の結合動態を解析の射程に収めることが格段に容易となった。

その一方で、この手法は抗体の質による基質特異性や免疫沈降効率の差異を軽減する利点があるが、一方で、この手法は目的とする転写因子へのタグの付与を必要とするため、あらゆる転写因子に一般化するためには、ゲノムにタグを挿入したホモ接合体マウスや細胞を作出しなければならないという複雑さがあった。

2. 研究の目的

研究代表者が開発した転写因子微量 ChIP-seq 法を、タグを付与しない転写因子

に拡張することができれば、より普遍的な手法になると期待される。本研究の目的は、転写因子微量 ChIP-seq 法の、転写因子それぞれに対する抗体を用いた ChIP へ適用を検討し、始原生殖細胞における多能性幹細胞の基盤転写因子の結合部位を同定し、始原生殖細胞の多能性の分子基盤を確立するとともに、その顕在化を抑制する機構を解析することである。

3. 研究の方法

まず、多能性転写因子に対する抗体の選定と ChIP の条件検討を行った。それぞれの転写因子に対し ChIP に適用しうる抗体が市販されているが、本研究で計画する細胞数 (10^5 個) に適用可能かどうかは検討が必要であった。特に担体への非特異的吸着 DNA 総量と、免疫沈降される特異的な転写因子結合部位の量比が、ChIP-seq におけるシグナル/ノイズ比を決定する重要な因子である。ES 細胞は多能性基盤転写因子群が機能し、すでに結合部位が良く知られているので、これを利用して検討した。QPCR により条件検討を行い、最終的に次世代シーケンサで検証した。

次いで、細胞の取得が比較的容易な、始原生殖細胞の試験管内誘導モデルを用いた解析を行った。最近申請者を含む研究グループは、始原生殖細胞と同等の発生的機能を持つ細胞 Primordial Germ Cell-Like Cells (PGCLCs) を、マウス ES 細胞から作出することに成功した。PGCLCs は胚体内の始原生殖細胞と同様の機構で形成される [エピプラストのモデル細胞 Epiblast-Like Cells (EpiLCs) から BMP4 などのサイトカインにより誘導される]。PGCLCs は、エピゲノムや遺伝子発現プロファイル等において、発生 9.5 日ごろの始原生殖細胞に類似した遺伝子発現や細胞生物学的性質を示し、機能的な精子・卵子へと成熟する。また、現実的な経費・労力の範囲内で、一回の誘導で 10^5 個程度の細胞数を得ることができ、微量 ChIP-seq 法の解析対象として適する。

4. 研究成果

本研究では、多能性転写因子に対する抗体を検討した。その結果、OCT4 に対するマウスモノクローナル抗体が 10^5 個程度の細胞数の ES 細胞に対する ChIP において機能しうることを同定した (図 1, 2)。

この抗体を用いて、ES 細胞、EpiLCs、PGCLCs における OCT4 結合部位を、転写因子微量 ChIP-seq 法によって解析した。それぞれの細胞種に対して 2 回ずつ ChIP-seq 実験を行い、再現性を検討した。

転写因子固有の抗体を用いる手法は、タグを用いた ChIP-seq よりもバックグラウンドが

高かった。また OCT4 以外の転写因子に対して利用可能な抗体の同定は今後の課題である。これらの点から、高精度な ChIP-seq 解析を行うためには、ゲノム編集などによって効率よくタグを付与することが望ましいことも示唆された。

解析の結果、ES 細胞と PGCLC における OCT4 の結合部位に大きな差異が観察され、PGCLC においては、ES 細胞における OCT4 結合部位の一部が選択されており、PGCLC に特異的なエンハンサー(ヒストン H3K27ac によって同定される)とよく一致することが示唆された(図3)。このことは、潜在的多能性を有する始原生殖細胞においては、特有の転写制御ネットワークが存在しており、多能性の顕在化した ES 細胞とは異なる状態を維持している可能性が示唆された。

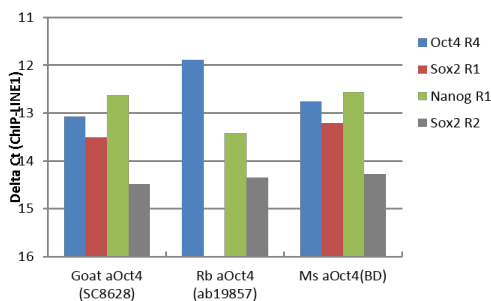


図1 抗 OCT4 抗体の検討。OCT4 の良く知られた結合部位 (Oct4 R4, Sox2 R1, Nanog R2) とその近傍 (Sox2 R2) を比較した。各抗体を用いて ChIP-QPCR を行い、非結合部位である LINE 1 との ΔCt 値を計算した。マウスモノクローナル抗体 (Ms aOCT4) が比較的良好な ChIP 効率を示した。

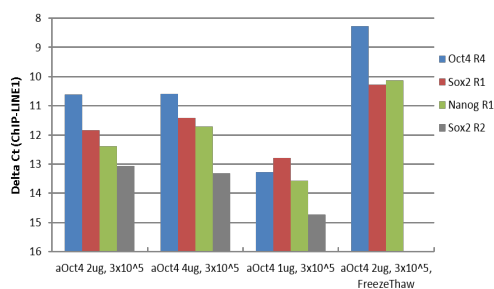


図2 細胞数と抗 OCT4 抗体の抗体量の検討。3 x 10⁵ 個細胞の ES 細胞に対して最適な抗体量を検討した。2 μ g の抗体が必要十分であること、細胞を freeze-thaw することによって、より効率の良い ChIP を期待することができることが示唆された。

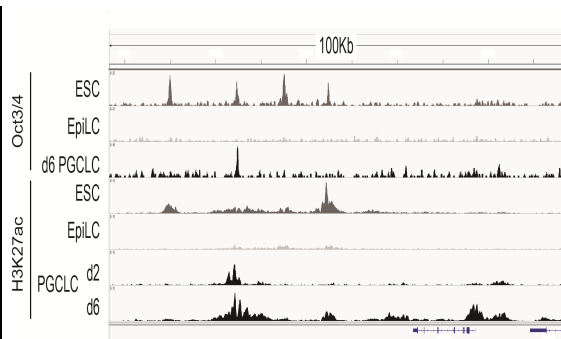


図3 ある多能性関連遺伝子の近傍における OCT4 結合部位と、活性化エンハンサーをマークするヒストン修飾 H3K27ac の分布。ES 細胞において 4 つ存在するピークの内の一つだけが、PGCLC において選択され、その場所が PGCLC 特異的なエンハンサー (H3K27ac) として機能する。

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 11 件)

*corresponding author(s), †co-first authors

1. *Kurimoto, K†, Yabuta, Y†, Hayashi, K., Ohta, H., Kiyonari, H., Mitani, T., Moritoki, Y., Kohri, K., Kimura, H., Yamamoto, T., Katou, Y., Shirahige, K., and *Saitou, M.

Quantitative Dynamics of Chromatin Remodeling during Germ Cell Specification from Mouse Embryonic Stem Cells.

Cell Stem Cell, 16, 517-532 (2015). Doi: S1934-5909(15)00113-7

[pii]/10.1016/j.stem.2015.03.002

査読有

2. Nakamura, T., Yabuta, Y., Okamoto, I., Aramaki, S., Yokobayashi, S., Kurimoto, K., Sekiguchi, K., Nakagawa, M., Yamamoto, T., *Saitou, M.

SC3-seq: A method for highly parallel and quantitative measurement of single-cell gene expression.

Nucleic Acids Research, e60 (2015) doi: 10.1093/nar/gkv134

査読有

3. Sasaki, K., Yokobayashi, S., Nakamura, T., Okamoto, I., Yabuta, Y., Kurimoto, K., Ohta, H., Moritoki, Y., Iwatani, C., Tsuchiya, H., Nakamura, S., Sekiguchi, K., Sakuma, T., Yamamoto, T., Mori, T., Woltjen, K., Nakagawa, M., Yamamoto, T., Takahashi, K., Yamanaka, S., and *Saitou, M.

Robust In Vitro Induction of Human Germ

Cell Fate from Pluripotent Stem Cells.
Cell Stem Cell. 17, 178-94. (2015).doi:
10.1016/j.stem.2015.06.014
査読有

4. Yamashiro, C., Hirota, T., **Kurimoto, K.**, Nakamura, T., Yabuta, Y., Nagaoka, S., Ohta, H., Yamamoto, T., and *Saitou, M.

Persistent Requirement and Alteration of the Key Targets of PRDM1 During Primordial Germ Cell Development in Mice.

Biology of Reproduction. 94, 7. (2016). doi:
10.1095/biolreprod.115.133256

査読有

5. Ohnishi, Y., Huber, W., Tsumura, A., Kang, M., Xenopoulos, P., **Kurimoto, K.**, Oles, A.K., Arauzo-Bravo, M.J., Saitou, M., Hadjantonakis, A.K., *Hiiragi, T.

Cell-to-cell expression variability followed by signal reinforcement progressively segregates early mouse lineages.

Nature Cell Biology 16, 27-37. (2014) . doi:
ncb2881 [pii]/10.1038/ncb2881

査読有

6. Hirai, H., Fujishita, T., **Kurimoto, K.**, Miyachi, H., Kitano, S., Inamoto, S., Itatani, Y., Saitou, M., Maekawa, T., *Taketo, M. M.

CCR1-mediated accumulation of myeloid cells in the liver microenvironment promoting mouse colon cancer metastasis.

Clinical & Experimental Metastasis 31, 977-989. (2014). doi:
10.1007/s10585-014-9684-z

査読有

7. Nakaki, F., Hayashi, K., Ohta, H., **Kurimoto, K.**, Yabuta, Y., and *Saitou, M.

Induction of mouse germ-cell fate by transcription factors in vitro.

Nature 501, 222-226. (2013). Doi:
nature12417 [pii]/10.1038/nature12417

査読有

8. Aramaki, S., Hayashi, K., **Kurimoto, K.**, Ohta, H., Yabuta, Y., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., Kato, Y., Shirahige, K., and *Saitou M.

A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants.

Developmental Cell 27, 516-529. (2013).
Doi: S1534-5807(13)00664-3
[pii]/10.1016/j.devcel.2013.11.001

査読有

9. ***Kurimoto, K.**, *Saitou, M.
Mechanism and Reconstitution In Vitro of Germ Cell Development in Mammals.
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. LXXX. 1-7. (2015). Doi:
10.1101/sqb.2015.80.027425

査読無

10. *Saitou, M., **Kurimoto, K.**

Paternal nucleosomes: are they retained in developmental promoters or gene deserts?

Dev. Cell. 30, 6-8 (2014). Doi:
S1534-5807(14)00414-6

[pii]/10.1016/j.devcel.2014.06.025

査読無

11. 栗本一基, 斎藤通紀. 始原生殖細胞の試験管内再構成系とその応用: エピゲノムイリプログラミング機構の解明に向けて. 日本生殖内分泌学会雑誌. 20, 7-13 (2015).

査読無

〔学会発表〕(計 2件)

1. ***Kurimoto, K.**

Quantitative Dynamics of Chromatin-State Reprogramming of Mouse Germ Cell Specification Pathway In Vitro
Gordon Research Conference, Germinal Stem Cell Biology, 3rd/Jun/2015, 香港(中国)

2. ***栗本一基**, 藪田幸宏, 斎藤通紀

単一細胞遺伝子発現解析によるマウス始原生殖細胞の発生機構の解明

日本分子生物学会. 2015年12月1日. 神戸ポートアイランド(神戸市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

栗本一基 (Kurimoto, Kazuki)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20415152

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし