

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650077

研究課題名(和文)一倍体ES細胞による始原生殖細胞の発生に必須な遺伝子の順遺伝学的スクリーニング

研究課題名(英文)An attempt to identify genes involved in PGC specification by using haploid ES cells

研究代表者

林 克彦(HAYASHI, Katsuhiko)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20287486

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)：始原生殖細胞はすべての卵子や精子のもとであり、発生過程の初期に体細胞系列から分岐する。本研究は始原生殖細胞の分化に必須な遺伝子を同定するために、1倍体ES細胞から始原生殖細胞を分化誘導する培養系を用いて、機能的スクリーニングを行うものである。これまでに導入箇所での遺伝子の発現が阻害される機能的スクリーニング用ベクターを構築し、それらを細胞内に導入し、ES細胞ライブラリーを作製した。これらの材料を基盤として、現在機能的スクリーニングを行っている。

研究成果の概要(英文)：Primordial germ cells (PGCs) are origin of all germ cell lineage including sperm and egg. During embryogenesis PGCs are specified at an early developmental stage. This study aims to identify genes involved in PGC specification by using haploid embryonic stem cell lines, which are convenient for forward genetics to identify functional genes. Thus far, we have constructed a plasmid vector that interfere endogenous gene expression at the integrated genomic locus. By transfection of the plasmid vector to haploid ES cells, we have made a pool of ES cell lines in which multiple copies of the vectors are inserted in the genome. Based on the established materials, we are going to screen functional genes involved in PGC specification.

研究分野：発生生物学

キーワード：始原生殖細胞

### 1. 研究開始当初の背景

始原生殖細胞(PGCs)はすべての卵子や精子の源であり、発生の初期に体細胞系列から分岐する。マウスの場合、胚齢6日目前後の胚においてエピプラストからBMP4によりPGCsが分化誘導される。分化誘導過程のPGCsはBlimp1やPrdm14などの特異的な遺伝子のはたらきにより生殖細胞系列としての決定を受ける。PGCsの発生に必須な遺伝子群は、これまで逆遺伝学的な手法により部分的に明らかにされてきたが、その全貌解明には至っていない。これは初期のPGCsの数がごく少量(50個/胚)であることや、解析方法がノックアウトマウスに依存していることから、遺伝子機能の解析に多大な時間と労力を要するためである。これらの技術的な障壁を取り除くために、本研究代表者はES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞からPGCsを体外培養系で分化誘導する方法を開発した。この培養条件下におけるES/iPS細胞からPGCsへの分化過程は胚の分化過程をよく踏襲しており、得られたPGCsは卵子や精子になる能力を有していた。これらの研究の一方で、近年発生工学的手法により一倍体のES細胞が樹立された。一倍体細胞は理論上すべての遺伝子がゲノム中に1コピーずつ存在しており、順遺伝学的解析に適した細胞と思われた。これらの背景により、体外培養におけるPGCsの分化誘導培養と一倍体ES細胞を用いた順遺伝学的解析を組み合わせることにより、PGCsの運命決定に重要な遺伝子を同定することが可能になるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、上述するような新しい技術を組み合わせることにより、PGCsの細胞運命の決定に機能的な遺伝子を同定することである。また、同定された個々の遺伝子の機能解析を通してPGCsの分化機構について明らかにする。体外培養系によって十分に得られる材料を用いて、PGCsの運命決定を制御する遺伝子ネットワークを解明する。

### 3. 研究の方法

まずはPGCsへの分化をモニターできるレポーター遺伝子Blimp1-mVenusとStella-ECFPをもつトランスジェニックマウスから一倍体のES細胞を樹立する。得られた一倍体ES細胞クローンについてCGH(Comparative genomic hybridization)解析を行い、遺伝子の重複や欠落がなるべく少ないものを選択する。選択された一倍体ES細胞クローンからPGCLCsを分化誘導し、その効率が良いクローンを選択する。それと同時に一倍体ES細胞クローンに導入するトラップベクターを構築する。トラップベクターは一倍体ES細胞のゲノム

DNAへの挿入が容易になるDNAトランスポゾン由来のPiggyBac配列を2カ所もち、その間にスプライスアクセプターとストップ配列を配置し、さらに選択マーカーとして独立したプロモーターをもつハイグロマイシン耐性遺伝子を配置する。このトラップベクターを大量に調整し、一倍体のES細胞へ導入する。この方法により、30-100コピー程度のトラップベクターがゲノムDNAに挿入されると予想される。

遺伝子の導入された一倍体ES細胞を、培養液中にハイグロマイシンを加えることにより選択する。選択されたES細胞のコロニーをそれぞれ単離して培養する。それぞれのトラップクローンを培養して増殖させた後に凍結保存する。

凍結保存されたトラップクローンについて順次融解し、それぞれのクローンからPGCsを誘導する。レポーター遺伝子の発現を基準に、Blimp1-mVenusとStella-ECFPが双方とも陰性もしくは、Blimp1-mVenus陽性Stella-ECFP陰性のトラップクローンを選別する。PGCsが誘導されないES細胞クローンについて、トラップベクターの挿入部位を同定し遺伝子を同定し、その機能を解析する。

### 4. 研究成果

本研究ではまずPGCsへの分化がモニターできるBlimp1-Venus, Stella-ECFP(BVSC)レポーターマウスから一倍体ES細胞を樹立することから始めた。しかしながら先行論文に従い実験を行っても、安定的なBVSC一倍体ES細胞の樹立は困難であった。恐らくこれにはトランスジェニックマウスの遺伝的背景に起因している可能性もある。実質的に研究の遂行が困難であったために、次善策としてレポーターを持たないが、既に樹立されている安定的一倍体ES細胞を用いて遺伝子スクリーニングを行うこととした。PGCsへの分化はこれまでの研究代表者の条件検討によりItgb3とSSEA1(双方陽性がPGCs)を用いることにした。次にトラップベクターを作製し、それらを一倍体ES細胞に導入した。ハイグロマイシン選択により、トラップベクターをもつES細胞ライブラリーを作製した。現在それぞれのクローンについてPGCsへの分化試験を行い、分化異常を示すクローンを探索している。

### 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9件)

1. K. Hayashi: Current advances in mammalian germ cell research. Fukuoka Igaku Zasshi 105, 196-203 (2014)
2. 3 T. Kimura, Y. Kaga, H. Ohta, M. Odamoto, Y. Sekita, K. Li, N. Yamano, K.

- Fujikawa, A. Isotani, N. Sasaki, M. Toyoda, K. Hayashi, M. Okabe, T. Shinohara, M. Saitou, T. Nakano: Induction of Primordial Germ Cell-Like Cells from Mouse Embryonic Stem Cells by ERK Signal Inhibition. *Stem Cells* 32, 2668-2678 (2014)
3. K. Hayashi and M. Saitou: Perspectives of germ cell development in vitro in mammals. *Anim Sci J.* 85, 617-626 (2014)
  4. S. Aramaki, K. Hayashi, K. Kurimoto, H. Ohta, Y. Yabuta, H. Iwanari, Y. Mochizuki, T. Hamakubo, Y. Kato, K. Shirahige, M. Saitou: A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants. *Dev Cell* 27, 516-529 (2013)
  5. R. Mizuta, S. Araki, M. Furukawa, Y. Furukawa, S. Ebara, D. Shiokawa, K. Hayashi, S. Tanuma, D. Kitamura: DNase  $\gamma$  is the effector endonuclease for internucleosomal DNA fragmentation in necrosis. *PLoS One.* 8, e80223 (2013)
  6. B. Payer, M. Rosenberg, M. Yamaji, Y. Yabuta, M. Koyanagi-Aoi, K. Hayashi, S. Yamanaka, M. Saitou, JT Lee: Tsix RNA and the Germline Factor, PRDM14, Link X Reactivation and Stem Cell Reprogramming. *Mol Cell* 52, 805-818 (2013)
  7. K. Hayashi and M. Saitou: Stepwise differentiation from naïve state pluripotent stem cells to functional primordial germ cells through an epiblast-like state. *Methods Mol Biol.* 1074, 175-183 (2013)
  8. F. Nakaki, K. Hayashi, H. Ohta, K. Kurimoto, Y. Yabuta, M. Saitou: Induction of the mouse germ-cell fate by transcription factors in vitro. *Nature* 501, 222-226 (2013)
  9. K. Hayashi and \*M. Saitou: Generation of eggs from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Nature Protoc.* 8, 1513-1524 (2013)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 林克彦 .「生殖系細胞のエピジェネティック制御と体外再構築」第 14 回再生医療学会、2015 年 3 月 21 日、横浜
2. 林克彦 .「Artificial Gamete の可能性」東海 ART カンファレンス、2015 年 3 月 15 日、名古屋
3. Katsuhiko Hayashi. “Propagating generations of healthy mice using manufactured oocytes.” *Ovarian club V*, Feb. 1. 2015 Hong Kong
4. Katsuhiko Hayashi. “Generation of eggs from mouse embryonic stem cells.” *Society of Reproduction and Fertility*, Sep. 21. 2014. Edingborough
5. 林克彦 .「In vitro germline formation from pluripotent stem cells」第 47 回日本発生生物学学会、2014 年 5 月 30 日、名古屋
6. Katsuhiko Hayashi. “Making oocyte and

babies from stem cells.” *The congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction (ASPIRE)*, Apr. 4. 2014. Brisbane

7. Katsuhiko Hayashi. “Prospects of gamete production from pluripotent stem cells” *The 45th meeting of the Dutch Society of Obstetrics and Gynaecology*, May 23 2014. Leeuwarden
8. 林克彦 .「生殖細胞系列の再構築培養系の確立と生殖巣の役割」第 21 回日本ステロイドホルモン学会、2013 年 11 月 16 日、大阪
9. 林克彦 .「始原生殖細胞の分化を体外で再現する培養系の確立と利用」第 85 回日本遺伝学会、2013 年 9 月 19 日、東京 招待講演
10. Katsuhiko Hayashi. “Germ cell differentiation from stem cells in mice” *17th World Congress on IVF*, Sep. 7. 2013. Tuins
11. 林克彦 .「生殖細胞系列の体外培養による再構築」第 25 回高遠・分子細胞生物学シンポジウム、2013 年 8 月 29 日、滋賀
12. 林克彦 .「iPS 細胞からの生殖細胞作製-技術開発とその意義-」上廣倫理研究部門開設記念シンポジウム、2013 年 7 月 26 日、京都

〔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 :  
 出願年月日 :  
 取得年月日 :  
 国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.hgs.med.kyushu-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

林 克彦 (HAYASHI Katsuhiko)

研究者番号 : 20287486

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：