

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650104

研究課題名(和文) 多能性幹細胞が生殖細胞へ変換することを抑制する分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms regulating conversion of pluripotential stem cells into Germ cells

研究代表者

松居 靖久 (Yasuhisa, Matsui)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：40241575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまでの我々のマウスES細胞での研究で明らかになった、生殖細胞特異的な遺伝子の発現が多能性幹細胞で抑制される分子機構について、動物種を越えて保存されている可能性を検討することを目的とした。そのために、マウスES細胞で生殖細胞特異的な遺伝子の発現を抑制するMax, Brg1について、プラナリアおよびニワトリ胚でノックダウン(KD)を行い、生殖細胞特異的な遺伝子の発現変化を調べた。その結果、どちらの場合も、Max-KDによって一部の生殖細胞特異的な遺伝子のみの発現が上昇し、マウスES細胞とはMax, Brg1の役割が、やや異なると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We previously found that knock-down of transcription factors, Max and Brg1 in mouse embryonic stem cells (ESCs) by RNA interference (RNAi) resulted in global induction of germ cell-specific genes. In this study, we attempted to examine whether Max and Brg1 also play a similar role on pluripotential stem cells in diverse organisms such as chick and planaria. We found that Max- or Brg1-knockdown (KD) in mature planaria containing pluripotential neoblast cells resulted in up-regulation of some germ cell-specific genes. We also found increased expression of some germ cell-specific genes by Max-KD in pluripotential blastoderm cells derived from early chick embryos. The results indicate that Max and Brg1 are involved in repression of germ cell-specific genes in planaria and chick, but they repress only a part of germ cell-specific genes. Therefore functions of Max and Brg1 may be somewhat different among mouse ESCs, planaria and chick pluripotential stem cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：多能性幹細胞 生殖細胞 RNA干渉法 プラナリア ニワトリ Max Brg1

### 1. 研究開始当初の背景

胚に存在する未分化な生殖細胞である始原生殖細胞 (PGC) は、ES 細胞などの多能性幹細胞の維持に必須な Oct3/4 や Nanog 等の遺伝子を発現しており、これらの細胞は類似した性質を持つと考えられる。しかし多能性幹細胞は様々な種類の細胞に直接分化を開始できるのに対して、PGC は配偶子にのみ分化する単能性の細胞であり、両者の分化能には明らかな違いがある。また多能性幹細胞が PGC へ自発的に変化することはない。マウス胚発生過程では、着床前の胚盤胞に存在している多能性幹細胞からなる内部細胞塊は着床後、エピプラストへと分化した後、エピプラスト細胞の一部が BMP シグナルの作用を受けて PGC の形成が起こる。また培養した ES 細胞でも、エピプラストに類似した細胞への誘導を介して PGC 形成を再現できることが報告されている (Hayashi, K. et al. Cell 146, 519-532, 2011)。これらのことから内部細胞塊や ES 細胞には、PGC へ直接変化することを阻害する機構が備わっている可能性が考えられる。

本研究課題応募者等はこれまでに RNAi スクリーニングにより、ES 細胞が PGC へ変化することを阻害している転写制御因子として Max, Mga, L3mbtl2, Brg1, Atf7ip を同定した (Maeda, I. et al., Nature Communications 4, 1754, 2013)。このうち Max について詳しい解析を行い、ES 細胞において Max をノックダウンすると生殖細胞特異的遺伝子がゲノムワイドに発現誘導されること、また Max とヒストンメチル化酵素 G9 および GLP からなる複合体が、生殖細胞特異的遺伝子のプロモーター領域に結合し、ヒストン H3K9 をメチル化することによりそれら遺伝子の ES 細胞での発現を抑制していることを明らかにした。

### 2. 研究の目的

以上のような背景を踏まえて本研究では、多能性幹細胞が生殖細胞へ分化することを抑制している同様なメカニズムが動物種を越えて働いている可能性について、無脊椎動物のプラナリア、およびニワトリ胚を用いて調べることを目的とする。すなわちマウス ES 細胞で生殖細胞遺伝子の発現を抑制する Max, Brg1 について、プラナリアとニワトリのホモログ遺伝子を同定・クローニングし、それらがマウス ES 細胞においてと同様に、プラナリアの成体内に存在する多能性幹細胞のネオプラストや、ニワトリ初期胚の多能性幹細胞でも、生殖細胞遺伝子の発現抑制に働いているかどうかを、RNAi により調べ、さらに生殖細胞遺伝子の発現誘導が起こった細胞が、生殖細胞として機能するかを明らかにする。この本研究では、多能性幹細胞が PGC へ直接変換しようという新たな視点で、それを抑制するメカニズムの一部が、動物種を越えて広く保存されている可能性を検証しようとする

点に特色がある。

### 3. 研究の方法

マウス ES 細胞で生殖細胞遺伝子の発現を抑制している Max, Mga, L3mbtl2, Brg1, Atf7ip, GLP および G9a に関して、プラナリアのネオプラストとニワトリ多能性幹細胞での機能を調べるために、まずそれらのホモログ遺伝子の同定とクローニングを行う。次にプラナリア個体およびニワトリの初期胚多能性幹細胞で、RNAi によるノックダウンを行い、それら遺伝子がプラナリアとニワトリの多能性細胞でも生殖細胞遺伝子の発現抑制に機能しているかを明らかにする。まずプラナリアの場合は、*in vitro* で合成した、標的遺伝子に対応する二本鎖 RNA を餌に混ぜて投与し、一定期間、飼育後、いくつかの生殖細胞特異的遺伝子の発現を定量的 RT-PCR、および *in situ* ハイブリダイゼーション法により調べる。またノックダウン後、身体を切断し、一定期間、再生させた後に同様に遺伝子の発現解析を行う。一方、ニワトリの場合は、初期胚多能性幹細胞であるプラストダーム細胞を初代培養し、モルフォリノ、または shRNA 発現ベクターを導入後、一定期間培養後に、代表的な生殖細胞特異的遺伝子の発現を定量的 RT-PCR、および免疫染色により調べる。

### 4. 研究成果

プラナリアでは、ホモログが見つかった Max, Brg1 について、まずそれらの発現を調べたところ、Max は全身的に、また Brg1 は神経組織で強い発現が見られた。次に Max のノックダウン (KD) を行った。週 1 回の二本鎖 RNA 投与で 43 日間、または 3 日おきに投与で 14 日間、あるいは 7 日間、毎日投与後、体を切断し、後部断片を 7 日間、再生させた後に生殖細胞特異的遺伝子の発現変化を調べた。その結果、調べた 6 種類の生殖細胞特異的遺伝子のうち、2 種類の遺伝子の発現が、上記のいずれの条件でも KD に依存して有意な発現上昇を示すことがわかった。また Brg1-KD では、同様な実験により、同じ 6 種類の遺伝子の中で Max-KD の場合とは異なる 3 種類の遺伝子の発現が有意に上昇した。これらの結果から、プラナリアではマウス ES 細胞とは異なり Max, Brg1 は一部の生殖細胞特異的遺伝子の発現抑制に係わっていると考えられた。またニワトリでは、初期胚の多能性幹細胞であるプラストダーム細胞を培養し、モルフォリノの導入により Max-KD を試みたが、モルフォリノの導入効率が悪く、KD がうまくいかなかった。そこで shRNA 発現ベクターを導入することを試み、その場合は Max-KD が効率良く起こることを確認した。さらにこの条件で Max-KD を行うと、調べた 3 種類の生殖細胞特異的遺伝子の中で 1 つの遺伝子は有意に発現上昇、2 番目の遺伝子は上昇傾向、残りの 1 遺伝子は減少傾向を示すことがわかり、ニワトリに

においても Max-KD の効果がマウス ES 細胞とは異なると考えられた。一方、有意に発現上昇した 1 遺伝子についてタンパクレベルでの発現を免疫染色により調べたところ、発現細胞数が有意に増加することが明らかになり、Max-KD を行うと、多能性幹細胞から、より多くの生殖細胞が形成される可能性が示唆された。これらの結果から、プラナリア、ニワトリのいずれの場合も、マウス ES 細胞とは異なり、Max が生殖細胞特異的遺伝子を包括的に抑制している訳ではないが、一部の遺伝子の発現抑制には係わっていることがわかった。今後、ノックダウンにより実際に生殖細胞数の増加などが見られるのかを調べていく必要がある。

#### 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 15 件)(全て査読あり)

1. Suzuki, A., Hirasaki, M., Hishida, T., Wu, J., Okamura, D., Ueda, A., Nishimoto, M., Nakachi, Y., Mizuno, Y., Okazaki, Y., Matsui, Y., Izpisua Belmonte, J.C., Okuda, A. Loss of MAX results in meiotic entry in mouse embryonic and germline stem cells. *Nature Communications* 7, 11056 (2016). doi: 10.1038/ncomms11056
2. Ogoh, H., Tanuma, N., Matsui, Y., Hayakawa, N., Inagaki, A., Sumiyoshi, M., Momoi, Y., Kishimoto, A., Suzuki, M., Sasaki, N., Ohuchi, T., Nomura, M., Teruya, Y., Yasuda, K., Watanabe, T., Shima, H. The protein phosphatase 6 catalytic subunit (Ppp6c) is indispensable for proper post-implantation embryogenesis. *Mechanisms of Development* 139, 1-9 (2016). doi: org/10.1016/j.mod.2016.02.001
3. Sakashita, A., Kawabata, Y., Jincho, Y., Tajima, S., Kumamoto, S., Kobayashi, H., Matsui, Y. and Kono, T. Sex Specification and Heterogeneity of Primordial Germ Cells in Mice. *PLoS ONE* 10, e0144836 (2015). doi: 10.1371/journal.pone.0144836.
4. Sumiyoshi, M., Masuda, N., Tanuma, N., Ogoh, H., Imai, E., Otsuka, M., Hayakawa, N., Ohno, K., Matsui, Y., Hara, K., Gotoh, R., Suzuki, M., Rai, S., Tanaka, H., Matsumura, I., Shima, H., Watanabe, T. Mice doubly-deficient in the Arf GAPs SMAP1 and SMAP2 exhibit embryonic lethality. *FEBS Letters* 589, 2754-2762 (2015). doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.050
5. Ito, S., Hirabayashi, K., Moriishi, K., Matsui, Y., Moriya, K., Koike, K., Matsuura, Y., Shiota, K. and Yagi, S. Novel sex-dependent differentially methylated regions are demethylated in adult male mouse livers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 462, 332-338 (2015). Doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.137
6. Yamaguchi, Y. L., Satomi S. Tanaka, S. S., Kumagai, M., Yuka Fujimoto, Y., Terabayashi, T., Matsui, Y. and Nishinakamura, Y. Sall4 is essential for mouse primordial germ cell specification by suppressing somatic cell program genes. *Stem Cells* 33, 289-300 (2015). doi:10.1002/stem.1853.
7. Okano, D., Ishida, S., Ishiguro, S., Kobayashi, K. Light and electron microscopic studies of intestinal epithelium in *Notoplana humilis* (Plathlminthes, Polycladida): The contribution of mesodermal/gastrodermal neoblasts to intestinal regeneration. *Cell Tissue Research* 362(3) (2015). Doi: 10.1007/s00441-015-2221-9
8. Hayakawa, N., Ogoh, H., Sumiyoshi, M., Matsui, Y., Nishikawa, S., Miyamoto, K., Maede, Y., Kiyonari, H., Suzuki, M. and Watanabe, T. The ADP-ribosylation factor 1 gene is indispensable for mouse embryonic development after implantation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 453, 748-753 (2014). doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.014
9. Matsui, Y., Takehara, A., Tokitake, Y., Ikeda, M., Obara, Y., Morita-Fujimura, Y., Kimura, T., and Nakano, T. The majority of early primordial germ cells acquire pluripotency by Akt activation. *Development* 141, 4457-4467 (2014). doi:10.1242/dev.113779
10. Matsui, Y. and Mochizuki, K. A current view of the epigenome in mouse primordial germ cells. *Molecular Reproduction and Development* 81, 160-170 (2014). doi: 10.1002/mrd.22214
11. Maezawa, T., Tanaka, H., Nakagawa, N., Ono, M., Aoki, M., Matsumoto, M., Ishida, T., Horiike, K., Kobayashi, K. Planarian D-amino acid oxidase is involved in ovarian development during sexual induction *Mechanisms of Development* 132, 69-78 (2014). : 10.1016/j.mod.2013.12.003
12. Leitch, H.G., Okamura, D., Durcova-Hills, G., Stewart, C.L., Gardner, R.L., Matsui, Y., Papaioannou, V.E. On the fate of primordial germ cells injected into early mouse embryos. *Developmental Biology* 385, 155-159 (2013). doi: org/10.1016/j.ydbio.2013.11.014
13. 松居靖久. 始原生殖細胞の分化と多能性幹細胞への再プログラム化のメカニズム. 生化学 86, 726-734 (2014).
14. Maeda, I., Okamura, D., Tokitake, Y., Ikeda, M., Kawaguchi, H., Mise, N., Abe, K., Noce, T., Okuda, A., Matsui, Y. Max is a repressor of germ-cell-related gene expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Communications* 4, 1754 (2013). doi: 10.1038/ncomms2780

15. Kobayashi, H., Sakurai, T., Miura, F., Imai, M., Mochizuki, K., Yanagisawa, E., Sakashita, A., Wakai, T., Suzuki, Y., Ito, T., Matsui, Y., Kono, T. High-resolution DNA methylome analysis of primordial germ cells identifies gender-specific reprogramming in mice. *Genome Research* 23, 616-627 (2013). doi:10.1101/gr.148023.112

[学会発表](計14件)

1. K. Mochizuki, H. Yokoyama and Y. Matsui. An RNAi screen for histone modifier genes involved in development of primordial germ cells in mice. KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology, 'Chromatin and Epigenetics, Shistler Conference Center, Whistler, British Columbia, Canada, March 20-24, 2016.
2. 関中 保、野瀬俊明、松居靖久「マウス胎仔線維芽細胞から始原生殖細胞を直接誘導する試み」第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会・合同大会、神戸、平成27年12月3-4日
3. Nana Aoki, Kentaro Mochizuki, Yasuhisa Matsui. 'Identification and characterization of mouse cancer/testis antigen genes.' 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会・合同大会、神戸、平成27年12月2日
4. 顧巍、望月研太郎、松居靖久「Dnd1 変異マウスの始原生殖細胞におけるヒストン修飾解析」第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会・合同大会、神戸、平成27年12月1日
5. 松居靖久「ナイーブ型多能性幹細胞を生殖細胞に直接変換する試み」第108回日本繁殖生物学会大会 シンポジウム「in vitro における生殖細胞形成研究の最新トピックス」宮崎、平成27年9月28日
6. Kentaro Mochizuki, Yasuhisa Matsui. 'An RNAi screen for histone modifier genes involved in primordial germ cell fate determination in mice.' 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Tsukuba, June 2-5, 2015
7. Tamotsu Sekinaka, Toshiaki Noce, Yasuhisa Matsui. 'An attempt of direct reprogramming of mouse embryonic fibroblasts into primordial germ cells.' 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Tsukuba, June 2-5, 2015
8. Asuka Takehara, Yuko Tokitake, Yasuhisa Matsui. 'Analysis of the mechanisms that promote the reprogramming in Akt-activated primordial germ cells.' 48th Annual Meeting of the

- Japanese Society of Developmental Biologists, Tsukuba, June 2-5, 2015
9. 松居靖久「始原生殖細胞の分化と再プログラム化の分子機構」第60回日本生殖医学会学術講演会、シンポジウム「生殖細胞の産生制御機構」、横浜、平成27年4月27日
  10. K. Kobayashi: *International Symposium of Flatworm Biology*, 'Yolk glands containing a large amount of tryptophan have a set of sex-inducing substances to fully sexualize asexual worms of *Dugesia ryukyuensis*', Oxford, Aug 4, 2015.
  11. 林 陽平、前田郁麻、松居靖久「胚性幹細胞の始原生殖細胞への in vitro 直接誘導に必要な因子の同定」第37回日本分子生物学会年会、横浜、平成26年11月25日
  12. 松居靖久.「多能性幹細胞と生殖細胞を隔てるエピジェネティック障壁」日本遺伝学会第86回大会、ワークショップ「マウス遺伝学が牽引する最先端生命科学」、長浜、平成26年9月19日
  13. Yasuhisa Matsui and Ikuma Maeda, 'Epigenetic barrier between pluripotency and germness in mice', 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Symposium 'A contact point between pluripotency and germness' Nagoya, May 30, 2014.
  14. 小林一也: 第60回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 北日本支部合同大会、「プランナリアの生殖様式転換機構：有性化因子による無性生殖から有性生殖への誘導について」、盛岡、平成26年10月18日

[図書](計1件)

1. Maezawa, T., Ishikawa, M., Okamoto, H., Kobayashi, K. Reproductive strategies in planarians: Insights gained from the bioassay system for sexual induction in asexual *Dugesia ryukyuensis* worms. In "**Reproductive and Developmental Strategies**" eds by K. Kobayashi, T. Kitano, Y. Iwao, M. Kondo, Springer Japan (in press)

[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〕

研究室ホームページ

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/cbr/cbr/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松居 靖久 (YASUHISA MATSUI)  
東北大学・加齢医学研究所・教授  
研究者番号：40241575

##### (2) 研究分担者

小林 一也 (KAZUYA KOBAYASHI)  
弘前大学・農学生命科学部・准教授  
研究者番号：50360110

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：