

課題番号 54

始原生殖細胞 (PGC) の分化運命決定を担う ヒストン修飾調節因子群の機能解明

[1] 組織

代表者: Jafar SHARIF
(理化学研究所・IMS)

対応者: 望月 研太郎
(東北大学加齢医学研究所)

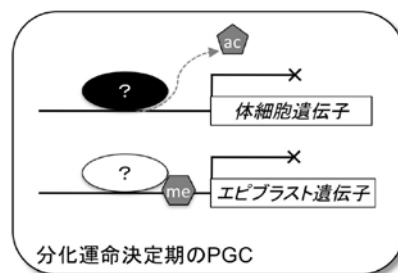
研究費: 物件費 31万円, 旅費 4万円

[2] 研究経過

ヒトを含む哺乳動物では、生殖細胞が唯一、精子または卵子を形成した後に、受精を経て世代の継承を保証する。生殖細胞の異常は不妊や子孫が持つ様々な先天性疾患の原因となる。マウスの生殖細胞は、胎齢 6.5 日頃に全身の細胞の源となるエピブラストの一部から、始原生殖細胞 (PGC) として分化運命決定を受ける。PGC はその分化運命決定の初期段階で胚発生 (初期中胚葉) プログラムに暴露された後、PGC としての分化を辿る。PGC 形成に重要なシグナル伝達や転写カスケードについては徐々に記述されてきているが、特にエピジェネティックな観点からは未だ多くの謎が残る。例えば、体細胞遺伝子群を PGC で抑制するエピジェネティック制御や胚発生 (初期中胚葉) プログラムと関わるエピジェネティック制御などは全く明らかになっていない。本研究では、特にヒストン修飾に着目して、PGC の分化運命決定に重要なヒストン修飾酵素を同定し、その機能を解明することを目指している (図)。

我々は最近、マウス胚性幹 (ES) 細胞からエピブラスト様細胞を経て PGC 様細胞を誘導する培養モデル系で、約 200 種のヒストン修飾調節因子に対する RNA 干渉 (RNAi) スクリーニングを行い、PGC 分化運命決定を促進する制御因子候補を 6 種同定することに成功した。本申請課題では、まず、上記 6 種の制御因子候補それぞれを欠損させたマウス胎仔において、PGC 形成異常の有無を検証する。さらに、各制御因子候補が調節するヒストン修飾がどのような遺伝子の発現制御を通じて PGC 分化運命決定に寄与するかを、上記の PGC 様細胞モデル系を材料とした次世代シーケンズ解析により明らかにすることを目的とした。

また、円滑な研究進展のため、定期的に電子メールや Skype 会議による意見交換、また東北大学加齢医学研究所において直接打ち合わせ (29 年 2 月) を行ってきた。



[3] 成果

(3-1) 研究成果

まず、6 種のヒストン修飾調節因子それぞれを欠失させたマウス胎仔を、ゲノム編集または条件付き遺伝子ノックアウトによって作製した。その結果、ヒストン脱アセチル化酵素 Hdac3 あるいはヒストンメチル基転移酵素 Setdb1 を欠失したマウス胚において、PGC がほぼ完全に形成されないことを発見した。したがって、Hdac3 および Setdb1 を PGC 分化運命決定を促進する最有望の候補として詳細な解析を進め、以下の成果を得た。

[Hdac3 について]

- RNA-seq から、PGC 様細胞誘導過程で Hdac3 をノックダウンすると、大規模な体細胞遺伝子群の発現上昇が起こることを確認した。
- 免疫沈降および ChIP-qPCR から、HDAC3 が転写制御因子 BLIMP1 にリクルートされて体細胞遺伝子群のヒストン H3/H4 脱アセチル化と発現抑制を担うことを明らかにした。
- HDAC3 が、体細胞遺伝子のヒストン H3/H4 脱アセチル化を介した発現抑制を通じて、PGC 分化運命決定に寄与することを証明した。

[Setdb1 について]

- RNA-seq および ChIP-seq/ChIP-qPCR から、決定期の PGC において、SETDB1 はエピブラスト遺伝子群 (特に Dppa2, Otx2, Utf1) を標的としてヒストン H3K9me3 (ヒストン H3 リジン 9 の

3 価メチル化) 修飾を介した発現抑制を担うことを予測した。

- Dppa2, Otx2, Utf1 は胚発生遺伝子群を発現抑制する可能性があり、また、PGC 形成の初期過程で3 遺伝子の発現は抑制されることを確認した。
- SETDB1 が、Dppa2, Otx2, Utf1 のヒストン H3K9me3 修飾を介した発現抑制を通じて、胚発生プログラムの発動を担い、PGC 分化運命決定に寄与することを提唱した。

(3-2) 波及効果と発展性など

これまでに、シグナル伝達因子 WNT3 や転写制御因子 BLIMP1 など、PGC 分化運命決定に機能する分子はいくつか同定されてきたが、それらと関わるエピジェネティック修飾や分子ネットワークについては未だ不明な部分が多かった。本研究から、PGC 分化運命決定を制御するエピジェネティック修飾の一端が明らかになり、分子ネットワークの全体像に切り込む突破口が見えてきたと言える。

PGC 分化運命決定は生殖細胞の発生分化の初発段階に位置することから、そこで機能するエピジェネティック修飾は、後の段階のエピジェネティック修飾のパターン確立に関わり、減数分裂や精子/卵子形成、受精、個体発生にも大きな役割を担う可能性が高い。本研究は、そのようなヒストン修飾とその責任酵素を明らかにしたことから、生殖細胞の発生分化の理解に大きく貢献できる。

タバコ煙や排ガス、環境ホルモン、さらには日常的な食事の成分など、様々な化学物質や環境要因がヒストン修飾を変化させることが、近年報告されてきている。PGC 分化運命決定を制御するヒストン修飾を明らかにした本研究は、そのような化学物質や環境要因への暴露をコントロールすることを通じて、ヒトにおける不妊の改善や子孫の先天性疾患の予防に寄与すると考えられる。

今回の共同研究により、理化学研究所 (Sharif J) と東北大学加齢医学研究所 (Mochizuki K) における若手研究者の交流が深まり、活発な議論やディスカッションが行われた。本研究から既に得られた知見、そしてこれらから期待される結果を将来的に国内外の学会に発表すると共に論文として報告をする予定である。

[4] 成果資料

(1) Sharif J et al. 『Activation of Endogenous Retroviruses in Dnmt1(-/-) ESCs Involves Disruption of SETDB1-Mediated Repression by

NP95 Binding to Hemimethylated DNA.』 *Cell Stem Cell*, 19(1): 81-94, 2016.

(2) Aoki N, Mochizuki K et al. 『DNA methylation of the Fthl17 5'-upstream region regulates differential Fthl17 expression in lung cancer cells and germline stem cells.』 *PLoS One*, 12(2):e0172219, 2017.