

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 研究開発領域：エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出
2. 研究開発課題名：世代継承を担うエピゲノム制御の解明
3. 研究開発代表者： 松居 靖久（国立大学法人 東北大学・加齢医学研究所）
4. 研究開発の成果

1) 生殖細胞のエピゲノム・リプログラミングの生理的意義の解明

始原生殖細胞の形成のエピジェネティック制御に関わるヒストン修飾関連遺伝子候補を、ES 細胞から始原生殖細胞様の細胞 (PGCLC) を誘導する培養系での RNA 干渉法 (RNAi) によるノックダウンスクリーニングにより選択し、6 種類の遺伝子を最有力の候補として同定した。次に、これらの候補遺伝子をノックダウン (KD) すると、PGCLC 形成の抑制、中胚葉マーカー遺伝子の発現亢進などが起こることを確認した。また少なくともそのうちの 1 つについては、ゲノム編集により *in vivo* の PGC 形成にも働いていることを確認した。さらに少数 (1×10^4) の始原生殖細胞および ES 細胞を対象とした包括的ヒストン修飾情報を Native ChIP-seq 法を用いて取得可能とした。DNA メチローム解析法としては、金井チーム・伊藤隆司教授らが開発した Post-Bisulfite Adaptor Tagging (PBAT) 法をベースに、さらに少数細胞への適応ならびに効率化および解析コストの削減に向けて研究を展開した。また始原生殖細胞 (PGC) 特異的非コード (nc) RNA を、既存のトランスクリプトームデータの再解析により調べ、これまでに 3 種類の miRNA を同定した。

2) 次世代に影響するエピゲノム変異 (エピ変異) の形成機構の解明

加齢にともない精子で起こる可能性があるエピ変異を同定するために、包括的 DNA メチローム解析を老齢 (18ヶ月齢) および若齢 (3ヶ月齢) マウス精子で実施した。そして、この解析により老齢マウス精子に特有の高メチル化領域および低メチル化領域を検出した。これらの老齢マウス精子に特定された DNA メチル化の変化が、精子や産仔の遺伝子発現に影響を与える可能性が示唆された。また、興味深いことに低メチル化領域には転写因子 REST 結合モチーフが確認され、老齢マウスを父親とした場合に認められる産仔の母子関係障害への関連に興味を持たれる。

3) 多能性幹細胞と生殖細胞を隔てているエピゲノム制御の解明

ES 細胞で転写因子 Max をノックダウン (KD) すると、生殖細胞特異的遺伝子の発現が包括的に上昇するが、Max-KD ES 細胞と PGC のトランスクリプトームを比較すると違いが大きい。そこで、Max-KD ES 細胞を PGC に直接変化させることを目標に、PGC と Max-KD ES 細胞で発現が異なる遺伝群を包括的に制御する可能性のある転写因子遺伝子候補を同定した。そして得られた候補遺伝子の発現を Max-KD ES 細胞で操作すると、トランスクリプトームが PGC に近づくことが明らかになった。また ES 細胞で DNA メチル化酵素遺伝子のノックダウンを行うと、Max-KD で発現上昇する生殖細胞特異的遺伝子の中でも、発現誘導が顕著なものと、そうでないものがあり、Max を介した抑制機構に相違があることが予想された。さらに PGC に比べて、Max-KD ES 細胞で発現の低い減数分裂関連遺伝子を、Max-KD ES 細胞で過剰発現し、減数分裂の誘導に適した条件で培養を試みたが、Max-KD ES 細胞でも見られる減数分裂前期細胞の、より高い効率での出現や半数体細胞などは、いままでのところ観察されず、上記の転写因子遺伝子の操作などが、ES 細胞を生殖細胞に変化させるためには必要である可能性が考えられた。