

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 世代継承を担うエピゲノム制御の解明
(英語) Molecular basis underlying epigenetic control of germ cell development and trans-generational inheritance of germ cell properties

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人 東北大学 加齢医学研究所 教授 松居靖久
所属 役職 氏名： (英語) Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University,
Professor, Yasuhisa Matsui

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語)
開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

松居靖久教授 (東北大学 加齢医学研究所) のグループは、河野友宏教授 (東京農業大学 応用生物科学科) のグループとともに、以下の研究を行った。

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(PGC)形成の分子機構を明らかにするために、関与する可能性のあるヒストン修飾関連遺伝子のRNAiスクリーニングを行い、選択した候補遺伝子の機能解析により、PGC形成に必要な役割を果たしていることが明らかになったヒストン脱アセチル化酵素について、相互作用する分子

の同定、および形成期の PGC における標的遺伝子の解析を行った。その結果、この因子が PGC 特異的転写因子と共に体細胞遺伝子の発現を抑制することにより、PGC への分化運命決定を促進することを明らかにした。この研究で RNA-seq および ChIP-seq 解析は河野グループが担当した。またこれまでに同定した PGC で特異的に発現するマイクロ RNA について、ゲノム編集により変異個体を作成し、精子形成に必須な役割を果たしていることを示唆する結果を得た。さらに河野グループでは、生殖系列細胞の異質性 (Heterogeneity) について、単一細胞を対象としたトランスクリプトーム解析系を確立した。追加で開始した PGC のメタボローム・プロテオーム解析についての研究から、PGC では ES 細胞や胎仔生殖巣の体細胞に比べて、解糖系が抑制、電子伝達系が亢進していることが明らかになった。さらに多能性幹細胞から PGC が形成される際には、電子伝達系の活性化が必須であることがわかり、PGC 形成の際にエネルギー代謝経路のスイッチングが、重要な役割を果たしていることが明らかになった。

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

これまでに河野グループが同定した、若齢マウス精子に比べて加齢精子で DNA が低メチル化になっているゲノム領域の近傍に見られた、自閉症、統合失調症、および両疾患に関連する候補遺伝子について、加齢精子由来産仔の脳で発現を調べたところ、若齢精子由来産仔に比べて、発現が低下しているものがあることが明らかになった。またそれらの遺伝子は、自閉症への関与が報告された転写抑制因子 REST により制御されている可能性が示唆された。

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

転写因子 Max をノックダウンした ES 細胞で、生殖細胞特異的遺伝子が包括的に発現上昇する分子機構について、DNA メチル化とヒストン H3K9 トリメチル化に注目して解析を行った。その結果、Max により発現抑制される生殖細胞特異的遺伝子の一部が、Max と相互作用した DNA メチル化酵素、または H3K9 メチル化酵素の働きで発現が抑制されることがわかった。一方、MEF を生殖細胞に変換する研究では、MEF と PGC または精子幹細胞 (GS 細胞) とで発現に顕著な差のある転写因子を調べた結果、数十倍程度の発現差がある複数の転写制御因子遺伝子を確認した。その中のいくつかの遺伝子は、欠損マウスで生殖細胞の形成不全が起こることが報告されており、体細胞を生殖細胞に変化させるために必要な有力な候補と考えられた。そこで、それら転写因子を過剰発現させる実験を試みているが、いまのところ生殖細胞特異的な遺伝子発現の包括的な上昇は確認されていない。

1) Molecular mechanisms of germ cell specification and differentiation via epigenetic reprogramming

We previously selected candidate genes involved in mouse primordial germ cell (PGC) specification, encoding histone modification-related proteins by RNAi screening by using the in vitro model of PGC specification from embryonic stem cells (ESCs). Among the candidates, we focused on a histone acetyl-transferase, HDAC-X and found that its deficient embryos generated by CRISPR-CAS9 caused impaired germ cell specification in vivo. In addition, we found that HDAC-X collaboratively repressed the expression of critical genes for early somatic cell development in forming PGCs with a germ cell-specific transcription factor to ensure the PGC fate.

We also identified miRNA specifically expressed in germ cells and found that they played a role on spermatogenesis. In addition, we showed that oxidative phosphorylation (OXPHOS) was

enhanced while glycolysis was repressed in PGCs compared with ES cell, and stimulated OXPHOS was critical in early phase of PGC specification.

2) Trans-generational inheritance of epi-mutation accumulated in testicular germ cells during aging

We examined DNA methylation status in sperm in young and aged males by the SSM-PBAT method. As a result, hyper- and hypo-methylated differentially methylated regions (DMRs) in aged sperm compared with young sperm were found, and autism spectrum disorder (ASD)-related and schizophrenia-related genes were located near some of the hypo-methylated DMRs. In addition, those genes shared a binding motif of a transcription repressor REST known to be involved in ASDs.

3) Direct reprogramming of pluripotential stem cells and somatic cells into germ cells by epigenetic manipulation

We previously reported global repression of germ cell-specific genes by a transcription factor, Max in ES cells, but its molecular mechanisms are still not fully understood. We found that Max interacted with a DNA methyl transferase or a histone H3K9 tri-methyl transferase and recruited those enzymes to the target genes to repress their expression via DNA methylation and H3K9 tri-methylation, respectively.

We also demonstrated that the expression of some germ cell-specific genes was selectively de-repressed in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) by addition of the inhibitors for repressive epigenetic modification in culture medium. To attempt further conversion of MEFs into cells with germ cell properties, we performed in silico analysis to select transcription factor genes preferentially expressed in PGCs or GSCs (germ line stem cells) compared with MEFs, and identified genes up-regulated in PGCs or GSCs in several folds, some of which were known to play a role on germ cell development. We have over-expressed some of those genes together in MEFs, but global up-regulation of germ cell-specific genes have not been so far observed.

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 5 件）

1. 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. Suzuki, A. *Nature Communications*, 2016, 7, 11056.
2. Hidema, S., Fukuda, T., Date, S., Tokitake, Y., Matsui, Y., Nishimori, K., Sasaki, H. Transgenic Expression of Telomerase reverse transcriptase (Tert) Improves Cell Proliferation of Primary Cells and Enhances Reprogramming Efficiency into the Induced Pluripotent Stem Cell. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2016, 80, 1925-1933.

3. [Sekinaka, T.](#), Hayashi, Y., Noce, T., Niwa, H., [Matsui, Y.](#) Selective de-repression of germ cell-specific genes in mouse embryonic fibroblasts in a permissive epigenetic environment. *Scientific Reports*, 2016, 6, 32932.
4. Kusano, R., Kousuke Fujita, K., Yasuharu Shinoda, Y., Nagaura, Y., Kiyonari, H., Abe, T, Watanabe, T., [Matsui, Y.](#), Fukaya, M., Sakagami, H., Sato, T., Funahashi, J.-I., Ohnishi, M., Tamura, S., Kobayashi, T. Targeted disruption of the mouse protein phosphatase ppm1l gene leads to structural abnormalities in the brain. *FEBS Letters*, 2016, 590, 3603-3615.
5. Aoki, N., [Mochizuki, K.](#), [Matsui, Y.](#) DNA Methylation of the *Fthl17* 5'-Upstream Region Regulates Differential *Fthl17* Expression in Lung Cancer Cells and Germline Stem Cells. *PLoS ONE*, 2017, 12, e0172219.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. マルチオミックス解析を通じたマウス始原生殖細胞の代謝特性の解析 口頭 [林陽平](#)、[蝦名真行](#)、[五十嵐香織](#)、[大塚 慧](#)、[竹原雅子花](#)、[松本光代](#)、[五十嵐和彦](#)、[金井昭夫](#)、[曾我朋義](#)、[松居靖久](#) 第39回日本分子生物学会年会、横浜、平成28年11月30日-12月2日、国内
2. マウスにおけるがん精巢抗原遺伝子の同定と発現制御解析 ポスター [青木七菜](#)、[望月研太郎](#)、[松居靖久](#) 第39回日本分子生物学会年会、横浜、平成28年11月30日-12月2日、国内
3. 転写因子 Max の ES 細胞および始原生殖細胞における生殖細胞関連遺伝子制御機構 ポスター [辰巳大気](#)、[林陽平](#)、[遠藤舞](#)、[小林久人](#)、[河野友宏](#)、[松居靖久](#) 第39回日本分子生物学会年会、横浜、平成28年11月30日-12月2日、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 世代継承を担うエピゲノム制御の解明
(英語) Molecular basis underlying epigenetic control of germ cell
Development and trans-generational inheritance of germ cell
properties

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人 東北大学 加齢医学研究所 教授 松居 靖久
所属 役職 氏名： (英語) Tohoku University, Institute of Development, Aging and Cancer, Professor,
Yasuhisa Matsui

実施期間： 平成 28年 4月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語) 少数細胞を用いたエピゲノム解析の実験系の開発・確立、および生殖器系
列における世代間のエピゲノム変異の解析
開発課題名： (英語) Establishment of experimental system for epigenome analysis using small
number of cells, and analysis of intergenerational epigenetic mutations in
germline

研究開発分担者 (日本語) 学校法人東京農業大学大学院農学研究科バイオサイエンス専攻
教授 河野 友宏
所属 役職 氏名： (英語) Tokyo University of Agriculture, Graduate School of Agriculture, Department of
Biosciences, Professor, Tomohiro KONO

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：東北大学・加齢医学研究所・教授・松居 靖久

河野友宏教授（東京農業大学 応用生物科学部）は、松居靖久チームリーダー（東北大学）とともに、少数細胞を解析対象としたマウス生殖系列における包括的 DNA メチル化およびヒストン修飾の解析を進めた。その結果、 1×10^4 細胞で H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, H3K27me3, H3K9me2 および H3K9me3 の当初目的としていた全 6 ヒストン修飾について信頼性の高い包括的データの取得を可能とした。雌雄 PGC のヒストン修飾をトランスクリプトームデータと比較し、DNA メチル化情報が消去された発生段階の PGC においてヒストン修飾が遺伝子発現制御に重要な役割を担っていることを明らかにした。また、少数細胞を用いた DNA メチローム解析では、全発生過程を網羅する生殖系列における PBAT 法を用いた包括的 DNA メチローム解析をさらに展開し、そのリプログラミングの状況の全容をほぼ明らかにした。体細胞クローン雌マウスの卵子の DNA メチローム解析を PBAT 法により実施し、少数細胞を用いた包括的 DNA メチル化情報の取得に成功した。

Professor Tomohiro Kono (Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture) performed comprehensive analysis of DNA methylation and histone modifications in the mouse germline by using a small number of cells. This research was performed in collaboration with Professor Yasuhisa Matsui (Tohoku University), the team leader of this project, and generated highly reliable and comprehensive data for the modifications of all six histones (H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, H3K27me3, H3K9me2 and H3K9me3) by using 1×10^4 cells. Comparison of histone modifications in male and female PGCs and the transcriptome data sets revealed that histone modifications play an important role in the regulation of gene expression in PGCs after demethylation. In addition, by using PBAT method for a small number of germline cells, comprehensive DNA methylome analysis was performed throughout the developmental process. The results provided the complete spectrum of the reprogramming at a single-base resolution. To gain better understanding of the transgenerational effects of the epigenome, the DNA methylome of oocytes from somatic cloned mice was analyzed by the PBAT method and DNA methylation errors in the oocytes that evaded from germline reprogramming were successfully detected.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

1. Kobayashi H, Koike T, Sakashita A, Tanaka K, Kumamoto S, Kono T. Repetitive DNA methylome analysis by small-scale and single-cell shotgun bisulfite sequencing. *Genes Cells*. 2016, 21(11), 1209-22.

2. Koike T, Wakai T, Jincho Y, Sakashita A, Kobayashi H, Mizutani E, Wakayama S, Miura F, Ito T, Kono T. DNA Methylation Errors in Cloned Mouse Sperm by Germ Line Barrier Evasion. *Biology of Reproduction*. 2016, 94(6), 128, 1-7.
3. Morohaku K, Tanimoto R, Sasaki K, Kawahara-Miki R, Kono T, Hayashi K, Hirao Y, Obata Y. Complete in vitro generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016, 113(32), 9021-6.
4. Ogawa H, Takyu R, Morimoto H, Toei S, Sakon H, Goto S, Moriya S, Kono T. Cell proliferation potency is independent of FGF4 signaling in trophoblast stem cells derived from androgenetic embryos. *Journal of Reproduction and Development*. 2016, 62(1), 51-8.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ホールマウント免疫染色法を用いたPGCsの計数とアポトーシスの検出、口頭・田島紫雲、井関陽介、小川英彦、尾畑やよい、河野友宏、第57回日本哺乳動物卵子学会 新潟ときメッセ、平成28年5月14日・国内
2. DNA methylome analysis in mouse germ cells and early embryos, Poster, Tomohiro Kono, Hisato Kobayashi, Tasuku Koike, Akihiko Sakashita, Haruka Tsuno, Soichiro Kumamoto, Takuya Wakai, Satoshi Sano, ESHRE Annual Meeting Helsinki, 2016/7/4, 海外 (Finland)
3. 体細胞クローンマウス卵子のDNAメチレーションエラー、口頭・吉岡 匠、神長祐子、小池 佐、小林久人、大畠一輝、加藤容子、河野友宏、第109回日本繁殖生物学会大会 麻布大・平成28年9月12日・国内
4. 小規模およびシングルセルショットガンバイサルファイトシーケンス解析による生殖細胞系列における反復配列特性の解明、口頭・小林久人、小池 佐、坂下陽彦、田中啓介、河野友宏、第109回日本繁殖生物学会大会 麻布大学、平成28年9月12日・国内
5. DNA methylome analysis in mouse germ cells and early embryos, Poster, Hisato Kobayashi, *Genomic Imprinting, Epigenetics, and Physiological Functions*, 2016/10/2, 海外 (イタリア) .
6. Role of miRNAs expressed from *Dlk1-Dio3* imprinted domain in mice, Poster, Souitiro Kumamoto, Kayo Nomura, Nozomi Takahashi, Tomohiro Kono, 6th Annual Next Generation Sequencing Asia Congress, 4th Annual Single Cell Analysis Asia Congress, 2016/10/11-12, 海外 (Singapore).
7. マウス生殖細胞および初期発生胚のDNAメチローム解析、ポスター・小林 久人、小池 佐、坂下 陽彦、都能 遼、隈本 宗一郎、若井 拓也、佐野 賢、河野 友宏、分子生物学会 横浜、平成28年11月28日・国内
8. 父加齢による精子のDNAメチル化変化は仔の行動や遺伝子発現に影響する、ポスター・木村 龍一、吉崎 嘉一、小池 佐、小林 久人、小池 航平、吉川 貴子、稲田 仁、今村 拓也、中島 欽一、松居 靖久、河野 友宏、大隅 典子、分子生物学会 横浜、平成28年11月30日・国内
9. 胎生期雄性生殖細胞におけるDNAメチル化導入機構の解析、ポスター・永森 一平、小林 久人、城本 悠介、西村 徹、山岸 令奈、宮川 さとみ、河野 友宏、仲野 徹、分子生物学会 横浜、平成28年11月30日・国内

10. 脱メチル化完了後のマウス始原生殖細胞におけるヒストン修飾の役割、ポスター・川畑順子、神尾明日香、神長祐子、高島友弥、坂下陽彦、小林久人、河野友宏、分子生物学会 横浜、平成 28 年 12 月 1 日・国内
11. アレル特異的なメチローム情報解析ツールの開発と評価、ポスター・小池 佐、Hamid Younesy、Julien Richard Albert、小林 久人、河野 友宏、Matthew C. Lorincz、Steven J. M. Jones、Mohammad M. Karimi、分子生物学会 横浜、平成28年12月1日・国内
12. MaxのDNAメチル化およびH3K9me2/3を介した生殖細胞関連遺伝子抑制機構 口頭・辰巳 大気、林 陽平、遠藤 舞、小林 久人、河野 友宏、立花 誠、松居 靖久、分子生物学会 横浜、平成28年12月2日・国内
13. DNA methylome analysis in mouse germ cells and early embryos, Hisato Kobayashi, Tasuku Koike, Akihiko Sakashita, Soichiro Kumamoto, Kamio Asuka, and Tomohiro Kono, Oral RIKEN CDB Symposium 2017, 2017/3/27・国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 生殖医療を支える次世代シーケンサー、口頭、河野友宏、第 15 回生殖バイオロジー東京シンポジウム、平成 28 年 7 月 17 日、国内
2. ゲノミックインプリンティング～全ゲノムバイサルファイトシーケンス解析から“目印”として働くDNAメチル化の本質を探る～、小林久人、第5回生命医薬情報学連合大会、東京、平成28年9月29日、国内。

(4) 特許出願