

多彩な細胞系譜の運命決定・恒常性を制御する転写因子

Blimp1の統合的機能解明

Unveiling the mechanism of action of Blimp1,
a transcriptional regulator that governs fates and
homeostasis of diverse cell lineages

齋藤 通紀 (SAITOU MITINORI)

京都大学・大学院医学研究科・教授



研究の概要

少数 (-1000) の細胞のエピゲノム状態を Chromatin immunoprecipitation-DNA sequence 法により定量的に測定する技術を開発し、その技術を用いて、多彩な細胞の運命決定・恒常性維持に必須の働きをする転写因子 Blimp1 の作用発現機序を生殖細胞系列と B 細胞系列をモデルに解明する。

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：細胞分化

1. 研究開始当初の背景

細胞の運命決定・機能維持機構の解明は、生命科学の中で最も重要な課題の一つであり、多能性幹細胞や組織幹細胞を起点に医学的有用細胞を調整する際に不可欠な基盤情報を提示する。細胞の運命及び機能はそれぞれの細胞に特異的な転写因子群とそれらの結合部位を規定するエピゲノム状態（クロマチンの後成的修飾状態）により制御される。ところが実際の生体における細胞の運命決定・機能維持過程においてこの両者を高い解像度で解明した研究は極めて少ない。これは、実際の生体における細胞運命決定や機能維持が少数の細胞を起点にして起こる現象で、これまで少数の細胞においてこの両者を定量的に解析する技術が存在しなかったことに起因する。

2. 研究の目的

少数 (-1000) の細胞のエピゲノム状態を Chromatin immunoprecipitation-DNA Sequence 法により定量的に測定する技術を開発し、その技術を用いて、多彩な細胞の運命決定・恒常性維持に必須の働きをする転写因子 Blimp1 の作用発現機序を生殖細胞系列と B 細胞系列をモデルに解明、それにより細胞の運命決定・機能維持を可能とする遺伝学的・後成遺伝学的・細胞生物学的機序を統合的に理解することを目的とする。

3. 研究の方法

少数細胞からのChIP-seq法の開発においては、多量の細胞 (10^7 個) から既存の方法にてChIP-seqを行った実験結果と、少数細胞からChIPを行い得られたDNAを増幅しsequenceを行った結果を定量的に比較する。

EGFP-Blimp1 及び BT-Blimp1 ノックインマウス及び ES 細胞を樹立し、Blimp1 のゲノムワイドな結合部位を同定する。

ES 細胞から試験管内で生殖細胞形成過程を再現する系を確立する。

薬剤依存的に生殖系列特異的の遺伝子組換えを可能とするマウス、stella-MCM マウスを樹立し、生殖系列の増殖・機能維持における Blimp1 の機能を解明する。

形質細胞（長期免疫記憶細胞）ににおける Blimp1 のゲノムワイドな結合部位を同定し、異なる細胞系譜の機能維持における Blimp1 の作用機序を解明する。

4. これまでの成果

タグ (EGFP) を標的とした少数細胞からの高効率 ChIP 法のプロトコル確立を目指した。ChIP プロトコルを改善し、反応溶液の体積の縮小、単一の反応チューブの使用、担体やキャリアの最適化による非特異的吸着の最小化と反応効率の向上を行った。また免疫沈降されたゲノム DNA 断片の、独自に考案したプライマーペアによる網羅的かつ高精度な増幅を試みた。

その結果、 10^7 細胞からChIPしたものを希釈して得られる 10^4 細胞相当のDNA、 10^4 細胞から直接ChIPして得られるDNAを高い定量性 (Q-PCRで定量) で増幅出来る方法論の開発に成功した。

EGFP-Blimp1 及び BT-Blimp1 ホモノックインマウス、ホモノックイン ES 細胞の樹立に成功した。

ESCsを出発点として、エピプラスト様細胞 (Epiblast-like cells: EpiLCs) を誘導し、さらにPGC様細胞 (PGC-like cells: PGCLCs) を誘導することに成功した。EpiLCsからPGCLCsが形成される過程の遺伝子発現変化は、エピプラストからPGCsが形成される過程の遺伝子発現変化と高い定量性で合致した。重要なことに、PGCLCsを、生殖細胞を有さないW/W^mマウスの新生仔精巣に移植すると、健全な精子に分化し、それら精子は健全な子孫に貢献した。精子分化能を有するPGCLCsは複数のESCs、さらにはiPSCsからも誘導可能であり、本研究により、エピプラストからPGCs形成に至る過程が初めて試験管内で再現されたことになった (Hayashi et al., Cell, 146, 519-532, 2011)。

Blimp1 の PGC 形成以降の機能を解明するため、第一に PGC 特異的に高効率でコンディショナルノックアウトを誘導出来るマウス系統の樹立を推進した。生殖系列特異的遺伝子 *stella/Pgc7* のプロモーター下に、改変されたエストロゲン受容体 (MER) と Cre recombinase を融合させた MER-Cre-MER (MCM) を発現するトランスジェニックマウスを作成した。本マウスでは *stella* が発現される初期胚、PGCs、発育過程の卵母細胞で MCM が発現し、投与する Tamoxifen 依存的に MCM が核内に移行し、floxed region を excise out する。実際に本マウスを用いると、初期胚、PGCs、発育過程の卵母細胞で、非常に特異的に、高効率 (-80%) で、Tamoxifen 依存的に遺伝子組み換えが誘導されることが示された (Hirota et al., Biology of Reproduction, 85, 367-377, 2011)。

本マウスと *Blimp1* コンディショナルノックアウトを交配し、発生9.5日目及び発生11.5日目で Tamoxifen を投与することで、Blimp1 の生殖系列の増殖・機能維持における役割を検証した。その結果、Blimp1 が PGC 形成後もその発生過程で重要な役割を果たすことを示すデータを得た。

5. 今後の計画

昨年度までに開発した少数細胞からのChIP-seq法で、 10^5 細胞及び 10^4 細胞から増幅したChIP-DNAのゲノムワイドプロファイルを、増幅を介さず通常の方法で 10^7 細胞から得られるChIP-DNAのゲノムワイドプロファイルと、massively parallel sequenceにより比較・検証する。

ESCs, EpiLCs, PGCLCs と至る過程における様々なヒストン修飾プロファイル及びDNAメチル化、DNAヒドロキシメチル化プロファイルを決定する。

Blimp1 コンディショナルノックアウトPGCsにおける遺伝子発現異常、細胞周期異常、細胞死の状態、エピゲノム異常を解析する。PGCsにおける *Blimp1* のゲノムワイドな結合配列を同定する。

形質細胞 (長期免疫記憶細胞) における *Blimp1* のゲノムワイドな結合部位を同定し、異なる細胞系譜の機能維持における *Blimp1* の作用機序を解明する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)
Saitou, M., and Yamaji, M. (2012). Primordial germ cells in mice. CSH Perspectives, in the press.

Saitou, M., Kagiwada, S., and Kurimoto, K. (2012). Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. Development, 139, 15-31.

Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., and Saitou, M. (2011). Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. Cell, 146, 519-532.

Hirota, T., Ohta, H., Shigeta, M., Niwa, H., and Saitou, M. (2011). Drug-inducible gene recombination by the *Dppa3-MER Cre MER* transgene in the developmental cycle of the germ cell lineage in mice, Biology of Reproduction, 85, 367-377.

Yabuta, Y., Ohta, H., Abe, T., Kurimoro, K., Chuma, S., and Saitou, M. (2011). TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly and spermiogenesis in mice. The Journal of Cell Biology, 192, 781-795.

ホームページ等

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/1103/