

単一細胞での網羅的遺伝子発現解析によるマウス生殖細胞決定機構の解明

斎藤 通紀

1. 研究のねらい

本研究のねらいは大きく2つに分けられる。第一のねらいは、人類を含む多細胞生物を構成する細胞群の中で、唯一その全遺伝情報を次世代に継承させる細胞系譜である生殖細胞系列が形成される分子機構を明らかにし、その過程を試験管内で再構成する基盤を築くこと、第二のねらいは、その目的を達成するために必要と考えられる、単一細胞に発現する全遺伝子を定量的に捉える技術を開発すること、である。

現個体の恒常性を維持する体細胞群とは対照的に、生殖細胞は、次の世代を多様にかつ誤りなく構成する機能を担う。この機能を遂行するため、生殖細胞には大きく分けて3つのユニークかつ本質的な能力、1)ゲノム/細胞の潜在的全能性の再獲得・維持機構、2)ゲノムの後成遺伝学的情報の再編集能、及び3)減数分裂及びそれに伴う特異的代謝能、が備わっている。本研究者は生殖細胞の持つこうした特性獲得機構をその出発点から理解すべく、哺乳類における生殖細胞形成機構の研究を推進してきた。本研究ではこれまでの研究を更に発展させ、生殖細胞形成に関わる分子群の全貌とその関係性を明らかにすることを目的とし、またその目的達成のために必要な単一細胞 cDNA マイクロアレイ法の開発を行った。単一細胞 cDNA マイクロアレイ法の開発は、生体に存在するいかなる細胞のいかなる時点でのゲノムワイドな遺伝子発現プロファイルをも検証することが基本的には可能となることを意味し、今後生物学全般における様々な応用も期待される。

2. 研究成果

1) 生殖細胞形成過程における *Blimp1* の役割の解明

我々は、決定直後(発生(E)7.5 日目)のマウス単一始原生殖細胞(Primordial Germ Cells;PGCs) (*stella* 遺伝子発現陽性細胞)cDNA とそれらと近接する体細胞(胚体外中胚葉細胞)cDNA で発現する遺伝子群を比較することにより、*Blimp1* と呼ばれる遺伝子が PGC 特異的に発現することを見出した⁷⁾。*Blimp1* はその N 末に PR ドメイン(ヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を有する SET ドメインに似た構造)、その C 末に5つの Zn フィンガーを有する転写制御因子で、これまでの研究から、B 細胞が、イムノグロブリンを分泌する形質細胞に最終分化する過程で機能するマスター因子として知られていた。我々は in situ hybridization 法により、*Blimp1* が PGC 特異的に発現することを確認し、その発現を real time で観察可能とすべく、*Blimp1* の発現制御領域下に形質膜に標的化した EGFP を発現するトランスジェニックマウスを作成した。これらの実験の結果、*Blimp1* は E6.25~E6.5 の一部の胚体外胚葉細胞でその発現を開始し、それらの細胞はすべて PGC へと分化することが示唆された。これまで生殖細胞系列の細胞は E7.5 においてアルカリフォスファターゼ活性陽性 *stella* 遺伝子発現陽性の細胞として同定される PGC がその起源であると考えられてきたが、我々の実験結果はこれまでの定説を覆し、それよりも1日以上前に運命決定された *Blimp1* 陽性生殖前駆細胞が存在することを示唆するものとなった^{5),7)}。

さらに Cambridge 大学、Rockefeller 大学との共同研究により、*Blimp1* は PGC 形成に必須の因子であること、*Blimp1* を発現する初期の細胞は確かにすべて PGC に分化することが遺伝学的実験により明らかとなった。また *Blimp1* 欠損細胞から単一細胞 cDNA を作成しその構成を解析した結果、野生型の成熟した PGC (*Blimp1* 陽性 *stella* 陽性細胞)ではほぼ例外なく認められる *Hoxb1* 遺伝子の発現抑制が、*Blimp1* 欠損細胞では異常になっていることが明らかとなり、*Blimp1* が PGC の遺伝子プログラム規定する重要な因子であることが示された⁷⁾。

Blimp1 はその後の発生過程では、内胚葉、体節中胚葉、肢芽後部中胚葉、毛包、血管など幅広い領

域で非常に動的な発現を示し、それぞれの組織分化に重要な役割を果たしていることが示されつつある¹⁾。PGCを含む様々な細胞分化過程における *Blimp1* の機能に共通の要素があるのか、その生化学的機能の解析が今後の課題となる。また PGC 形成における *Blimp1* の機能、PGC において *Blimp1* が発現誘導される機序をより正確に理解することも重要であろう。

2) マウス生殖細胞形成過程に伴う定量的遺伝子発現動態

マウス生殖細胞系列は *Blimp1* 陽性の数個から十数個の細胞を起源とし徐々にその数を増し、E7.5 において約40個のアルカリフォスファターゼ陽性 *stella* 遺伝子発現陽性の細胞集団(PGCs)を形成する⁷⁾。これら PGC はその後1細胞毎に移動を開始し、発生過程の後腸を經由して腸間膜、そして生殖原器へと移入する。また PGC は移動の過程でそのゲノムワイドな後成遺伝学的修飾を変換することがわかっており⁸⁾、この過程も1細胞毎に進行する。従って、PGC の形成機構、その内部でのゲノム再編機構を正確に理解するためには、1細胞内でおこる遺伝子発現の変化を捉える実験系が必須となる。単一細胞 cDNA マイクロアレイ法の開発に先立ち、これまで用いてきた単一細胞 cDNA 増幅法を改良し、我々は簡便かつ定量的に単一細胞から cDNA を増幅する方法を確立し[3]の項参照]、その方法を用いて CD1 マウスにおける E6.75、E7.25、E7.75、E8.25 の PGC 及び E6.75、E7.25、E7.75 の近隣体細胞(胚体外中胚葉)から単一細胞 cDNA を増幅、それら細胞における PGC 形成に重要な関連を示すと考えられる遺伝子発現を定量的 PCR(Quantitative PCR; Q-PCR)にて解析した²⁾。

その結果、*Blimp1* 陽性の生殖前駆細胞から *stella* 陽性の PGC が成立する過程では非常に動的な遺伝子発現の変動が起こることがわかった。具体的には *Blimp1* 陽性となった生殖系列細胞は、多能性を司るマスター因子の一つである *Sox2* の発現を再獲得し、生殖系列に特異的な発現を示す遺伝子(*fragilis*, *stella*, *Blimp1*に加えて *Nanos3*, *Dnd1*, *Kit*, 新規に同定された *Prdm14* etc)の発現を段階毎に活性化するとともに、体細胞系列の特異化に関わる遺伝子(*Hoxb1*, *Hoxa1*, *T*, *Fgf8*, *Snai1*, etc)発現を時期依存的に抑制する。さらに PGC の成立過程では、その過程に関わりうるシグナル伝達分子(*Smad1*, *Smad3*, *Smad5*, *Bmpr1a*, *Acvr2b* etc)の発現や、ゲノムの後成遺伝学的修飾に関わる因子(*Dnmt3b*, *Glp*)の発現も動的に変化することが明らかとなった。これらの結果は、この過程に関わる遺伝子の機能解析の基盤を築くとともに、この過程を将来的に試験管内で再構築する際の良い指標と成る²⁾。さらに単一細胞マイクロアレイ解析を含むより包含性の高い解析を行うことにより、生殖細胞系列形成過程に伴うシグナルと転写制御因子の階層的関わりが明らかになることが期待される。

3) 単一細胞 cDNA マイクロアレイ法の開発

生殖細胞形成・分化過程に関わるゲノムワイドな遺伝子発現を単一細胞レベルで解析するために、我々は単一細胞 cDNA マイクロアレイ技術の開発を目指した。単一細胞 cDNA マイクロアレイ法の開発は、生殖細胞形成過程の研究にとどまらず、単一細胞レベルでの解像度を必要とする様々な生物学的問題(成体の体性幹細胞の研究、神経細胞の多様性の研究、発生生物学に関する多くの課題等)にとって重要な技術開発となると考えられる。

少量の開始材料から cDNA を合成・増幅する方法としては、PCR を用いる対数的増幅法と、T7 RNA polymerase を利用する線形増幅法が主として用いられてきた。両方法論は増幅効率・感度・定量性において、それぞれ固有の利点・欠点を有しており、相補的なものであると考えられる。しかし、単一細胞レベルの極微量の資料から cDNA を増幅する場合、操作の簡便性や増幅力の点から PCR 法が有利であろうと考えられた。既存の PCR 法は単一細胞から cDNA を増幅する場合、50~80 回の増幅サイクルを用いるので、開始材料と比較した際の増幅産物に存在する遺伝子群の定量的な関係が大きく損なわれ、また単一のプライマーを用いて増幅するので増幅産物から方向性が失われ、汎用されている様々な市販のマイクロアレイスライドに使用するプローブを効率よく作成しづらいという問題点を有している。また増幅途中で本来存在している遺伝子とは無関係な増幅副産物が多量に形成され、これらの産物はマイクロアレイハイブリダイゼーションを行う際にその感度を低減させると考えられた。

これらの問題点を解決すべく様々な試行錯誤を行った結果、1) 単一細胞レベルの産物からマイクロアレイハイブリダイゼーションを行うプローブを作成するのに十分な cDNA 合成には初期の PCR 増幅回数が20回で十分であること、2) 増幅副産物は cDNA を合成するために用いる過剰の第1プライマーに由来するものであるため、それらをエクソヌクレアーゼにより分解することが必要であること、3) 異なる配列

を有する2つのプライマーを用いて単一細胞レベルの資料からcDNAを効率よく合成するためにはプライマーの配列が重要であること、4)PCR増幅ではチューブ毎にランダムな増幅エラーが生じるため、PCRを4本のチューブに分けて行い、その後それらを再混合することでエラーを最小限にできること、が明らかとなった。これらの点を考慮に入れ、また増幅後にT7プロモーター配列を有する第3のプライマーと第2のプライマーを用いて少数回増幅することで、その後線形増幅を行うことによりマイクロアレイハイブリダイゼーションに適したプローブが作成できる方法論を確立した³⁾。

本方法論を用いた増幅産物は、従来の方法で得られるものに比較し、非常に優れた定量性と再現性を有していることが明らかとなった。多量の開始 mRNAに含まれる遺伝子群の比率と、単一細胞レベルから増幅したものに含まれる遺伝子群の比率を比較した結果、従来の方法では correlation coefficient(R^2)が0.496であったのに対し本方法論では0.734であった。単一細胞あたり20コピー以上発現している遺伝子に関しては、擬陽性及び擬陰性率がそれぞれ3及び6%と低く、単一細胞あたり5コピーの発現しか示さない遺伝子に関しても60%に及ぶ遺伝子が検出され、それらの70%が正しく発現しているものであることが示された³⁾。

実際に本方法論の有効性を検証すべく、E3.5の胚盤胞内部細胞塊細胞(Inner Cell Mass;ICM)を取り出し、それらを単一細胞に解離して単一細胞cDNAを合成した。E3.5のICMは、形態学的には区別し難い未分化な細胞集団(〜30個)と考えられ、これらからすべての胚組織が形成され、また胚性幹細胞(Embryonic stem cells;ES cells)が樹立される重要な細胞集団である。総数50個の*Oct4*陽性*Cdx2*陰性単一細胞cDNAを合成し、そのうちランダムに選んだ20個を用いてマイクロアレイハイブリダイゼーションを行った結果、これらの細胞は遺伝子発現の明らかな異なる2つの細胞群に分けられることが明らかとなった。一つは未分化な胚性外胚葉様細胞で、もう一つはそれらを覆う胚体外組織となる原始内胚葉様細胞である。これら2つの細胞群の遺伝子発現は、1日を経て形態学的に明らかに分化したE4.5胚性外胚葉細胞及び原始内胚葉細胞のそれと多くの点でそれぞれ共通しており、結果の正しさを示唆している³⁾。

本研究の結果を受け、では哺乳類胚発生のいつの時点で初めて割球毎の遺伝子発現の差異が生じるのかに関し共同研究が進行中である。また本技術はすでに多くの国内・国外の研究室に情報提供を行い、その一部に関しては共同研究が進行中である。我々自身は生殖細胞系列形成過程の解明に向けて応用し、現在それに関する論文を作成中である。

3. 今後の展開

本研究の結果、生殖細胞系列形成過程で起こる分子生物学的変化を包括的に捉える系が確立したと考えられる。今後は本研究によりこの過程に重要な役割を果たすことが示唆された遺伝子群の機能を順次解析して行き、生殖細胞形成過程に関わる転写制御因子の関係性を明らかにしていきたい。同時に*Blimp1*もしくは*Prdm14*の発現をGFPの発現によりモニターできるマウスを利用して、生殖細胞形成過程に関わるシグナル伝達分子とその個々の生殖細胞特異的遺伝子の発現に関する役割を明らかにする予定である。これらの研究は、ES細胞を用いて生殖細胞形成過程を試験管内で正確に再現する実験の基盤を築くと期待され、実際にこれまで得られた情報に基づいてこの過程の試験管内での再現を検討しているところである。

確立された単一細胞cDNAマイクロアレイ法は上述の生殖細胞系列以外に様々な応用が考えられる実験手法である。生殖細胞系列とはその性質を全く異にする神経細胞群(大脳皮質の特異的な領域)において本方法論を用いた研究を計画中であり、新しいシステムでの有効性を証明したいと考えている。

4. 研究成果

(1)原著論文

1. Horsley, V., O'Carroll, D., Tooze, R., Ohinata, Y., Saitou, M., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovskiy, A., and Fuchs, E. (2006). *Blimp1* defines a progenitor population that governs cellular input to the sebaceous gland. *Cell*, 126, 587-609.
2. Yabuta, Y., Kurimoto, K., Ohinata, Y., Seki, Y., and Saitou, M. (2006). Gene expression dynamics during

- germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biol. Reprod.*, 75, 705-716
3. Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., Ono, Y., Uno, D. K., Yamada, R. G., Ueda, H. R., and Saitou, M. (2006). An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nuc. Acids Res.*, 34, e42.
 4. Payer, B., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Barton, S. C., Lee, C., Saitou, M., and Surani, M. A. (2006). Generation of stella-GFP transgenic mice, a novel tool to study germ cell development. *Genesis*, 44, 75-83.
 5. *Saitou, M., Payer, B., O'Carroll, D., Ohinata, Y., and *Surani, M. A. (2005). Blimp1 and the emergence of the germ line during development in the mouse. *Cell Cycle*, 4, 1736-1740.*
Co-correspondence
 6. Western, P., Maldonado-Saldivia, J., van den Bergen, J., Hajkova, P., Saitou, M., Barton, S., and Surani, M. A. (2005). Analysis of Esg1 expression in pluripotent cells and the germline reveals similarities with Oct4 and Sox2, and differences between human pluripotent cell lines. *Stem Cells*, 23, 1436-1442.
 7. Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S. C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovskiy, A., *Saitou, M., and *Surani, M. A. (2005). Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature*, 436, 207-213.
* Co-correspondence
 8. Seki, Y., Hayashi, K., Itoh, K., Mizugaki, M., Saitou, M., and Matsui, Y. (2005). Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev. Biol.* 278, 440-458.

(2) 特許出願: 国内1件

(3) その他の成果

学会発表

1. Mitinori Saitou, 平成18年10月11～15日、Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells, NY, USA, 'A Network of Transcriptional Regulators Involved in the Generation of the Germ Cell Lineage in Mice'
2. 斎藤通紀、平成18年8月4～5日、第25回分子病理学研究会、東京、特別講演、「生殖細胞の起源と特質: ゲノム情報の再編集と全能性」
3. 斎藤通紀、平成18年7月7～8日、第8回京都大学大学院生命科学研究科シンポジウム、京都、「生殖細胞の起源と特質: ゲノム情報の再編集と全能性」
4. 斎藤通紀、平成18年6月13日、神戸バイオメディカル学術交流会、神戸、「単一細胞マイクロアレイ法の開発と応用: その可能性を考える」
5. 斎藤通紀、平成18年3月1～3日、第5回日本生化学会国際シンポジウム(JBS バイオフロンティアシンポジウム)、軽井沢、「Germline specification in mice: A genetic program for epigenetic reprogramming」
6. 斎藤通紀、平成18年2月24～26日、第2回宮崎サイエンスキャンプ、宮崎、「生殖細胞の起源と特質: ゲノム情報の再編集と全能性」
7. 斎藤通紀、平成17年12月7～10日、第28回日本分子生物学会年会、福岡、シンポジウム、「Germline recruitment in mice: A genetic program for epigenetic reprogramming」
8. 斎藤通紀、平成17年11月22日、第2回クロマチン・フロンティアーズ・ジャパン、京都、「マウス生殖細胞系列の決定とゲノム再編成」
9. Mitinori Saitou、平成17年10月22日～23日、Mammalian Oogenesis and Epigenetic Modification、上総、「Specification of germ cell fate in mice: A genetic program for epigenetic reprogramming」
10. 斎藤通紀、平成17年10月19～22日、第78回日本生化学会大会、神戸、ミニシンポジウム、「Germline recruitment in mice: A genetic program for epigenetic reprogramming」

11. Mitinori Saitou, 平成17年10月17～18日、The 17th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, Seoul, シンポジウム、' Germ line specification in mice: A genetic program for epigenetic reprogramming'
12. Mitinori Saitou, 平成17年9月1～3日、Ernst Schering Research Foundation Workshop 60, ' Stem Cells in Reproduction and in the Brain', 神戸、' Germline recruitment; a genetic program for epigenetic reprogramming'
13. 斎藤通紀, 平成17年8月6日、こうべバイオフエスタ, 神戸、「生命(いのち)のつながりと生殖細胞」
14. 斎藤通紀, 平成17年7月1～2日、第7回京都大学大学院生命科学研究科シンポジウム、京都、マウス生殖細胞系列の決定とゲノム再編成
15. Mitinori Saitou, 平成16年11月15～16日、Kobe University The 21st Century COE Program Symposium 'Signal Transduction in Gametogenesis and Fertilization', 神戸、' Single cell analysis of a molecular programme for the birth of germ cell lineage in mice'
16. 斎藤通紀, 平成16年10月2日、国際高等研究所「分化全能性—普遍性と特異性」研究会、奈良、「マウス生殖細胞系列の決定機構」
17. 斎藤通紀, 平成16年6月30日、7月1日、第6回京都大学大学院生命科学研究科シンポジウム、京都、「マウス生殖細胞決定の分子プログラム」
18. Mitinori Saitou, 平成16年6月6日～6月10日、Gordon Research Conference, Mammalian Gametogenesis & Embryogenesis, 'Single Cell Analysis of a Molecular Program for the Specification of Germ Cell Fate in Mice'
19. 斎藤通紀, 平成16年5月15～16日、第45回日本哺乳動物卵子学会、大津、特別講演、「マウス生殖細胞形成機構の全容解明に向けて」
20. 斎藤通紀, 平成15年10月15～18日、第76回日本生化学会大会、神戸、「マウス初期発生と生殖細胞形成の分子プログラム」

総説等の著作物

1. Ohinata, Y., Seki, Y., Payer, B., O' Carroll, D., Surani, M. A., and Saitou, M. (2006) Germline recruitment in mice: A genetic program for epigenetic reprogramming. Ernst Schering Research Foundation Workshop 60, 143-174.
2. Surani, M. A., Ancelin, K., Hajkova, P., Lange, U. C., Payer, B., Western, P., and Saitou, M. (2004). Mechanism of mouse germ cell specification: A genetic program regulating epigenetic reprogramming. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. LXII.
3. 関由行, 斎藤通紀, 2006, 生殖細胞とリプログラミング, 蛋白質 核酸 酵素, Vol. 51, 2052-2059.
4. 斎藤通紀, 2006, 電顕に期待するもの, 細胞工学, Vol.25, 1090-1091.
5. 斎藤通紀, 2006, 生殖細胞の起源と特質:ゲノム情報の再編集と全能性, 蛋白質 核酸 酵素, Vol. 51, 1058-1071.
6. 栗本一基, 大日向康秀, 斎藤通紀, (2006), 哺乳類における生殖細胞の運命決定, 細胞工学, Vol. 25, 918-923.
7. 栗本一基, 藪田幸宏, 大日向康秀, 斎藤通紀, (2006), 単一細胞マイクロアレイ解析を可能とするPCRを用いた cDNA 増幅法, 実験医学, Vol.24, 2165-2172.
8. 大日向康秀, 佐野光枝, 小野由紀子, 斎藤通紀, 2005, Blimp1 はマウス生殖細胞系列決定因子の1つである, 細胞工学, Vol. 9, 956-957.
9. 斎藤通紀, 2005, マウス生殖細胞の運命決定, Medical Science Digest, Vol. 31, 120-122.