

機関番号：82401

領域設定期間：令和元年度～令和5年度

領域番号：7102

研究領域名（和文）全能性プログラム：デコーディングからデザインへ

研究領域名（英文）Program of totipotency: From decoding to designing

領域代表者

小倉 淳郎（OGURA Atsuo）

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・室長

研究者番号：20194524

交付決定（予定）額（領域設定期間全体）：（直接経費）1,139,100,000円

#### 研究の概要

終末分化した生殖細胞である精子と卵子は、ゲノム再プログラム化を受け、受精卵へと変化する。このゲノム再プログラム化は、生殖サイクルの中で最も大規模なゲノム状態の変化であり、この結果、受精卵のゲノムは「全能性（totipotency）」を獲得する。全能性は、未分化なゲノムの状態であり、1個の細胞から発生途上で生じる組織（胎盤など）を含めた全ての細胞系列へ発生する能力と定義される。本研究領域では、「全能性＝完全な発生能」を保証する各階層・因子の同定、そしてこれらの制御・再構築系の研究を進める。本領域活動を通して、最新の解析技術と独創的な発生工学技術を融合させた世界初の全能性研究の一大拠点を創出する。

研究分野：生殖生物学、エピジェネティクス、細胞生物学

キーワード：全能性、受精、ゲノム再プログラム化、核移植クローン、胎盤

#### 1. 研究開始当初の背景

受精に始まる新しい命は、受精卵・胚発生そして生殖細胞の発生・分化を経て、次の世代に受け渡される。この命の循環である生殖サイクルに関する研究は、我が国が世界をリードする分野の一つであり、生殖サイクルとそのエピゲノム変化に関わる多数の重要な発見が次々と報告された。また、核移植クローンなどの高度な発生工学と最新の解析技術の組み合わせも、多くの独創的な成果を生み出す原動力となった。しかしながら、これらの研究において達成すべき重要なテーマであったにもかかわらず、進展が遅れたのが、全能性研究である。これは、卵子や受精卵など微小なサンプルを用いた解析という技術的な限界が主な原因であった。一方で、この未解明に残されている「命の始まり」に対する人為的な操作は日々進行し、我が国でも毎年数万人が体外受精（IVF）や顕微授精（ICSI）技術により生まれている。このように、科学的・社会的に重要である全能性研究が生殖サイクルの中でブラックボックスとして残されていたが、近年の受精卵・初期胚のエピゲノム解析技術の進展とそれに伴う優れた研究者、特に若手の台頭により、全能性のプログラムの理解と応用に踏み込んだ新たな学問領域を開く機運が高まった。

#### 2. 研究の目的

本研究では、多様な背景を持つ計画班員（医学、薬学、農学、獣医、理学、生命科学）を中心に公募班員を含めた全メンバーの総合力を結集させることにより、配偶子の全能性因子から受精、胚発生、着床、胎盤形成までを包括的かつ多階層的に解析し、全能性の分子生物学的な理解とその普遍原理の追求を進める。さらに、得られた成果の将来の医療、産業などへの応用展開の基盤を構築する。なお、世界的にもまだ端緒にある全能性研究の長期的な発展を見据え、次世代を担う若手の育成も重要な目的としている。

#### 3. 研究の方法

その目的のために本領域では、解析系のA01と応用系のA02の2研究項目を設定し、さらに時間軸に沿って①全能性獲得、②全能性の発揮、③全能性消失の3つのステージ分けを行なった。  
 (1) A01 全能性プログラムの解読（デコーディング）：「①全能性獲得」においては、CRISPRノックアウトスクリーニングによって全能性獲得に関わる卵子（母性）因子を同定し、核内物理的特性解析を行なうことで、全能性獲得核（前核）に特異的な形成メカニズムを解明する。「②全能性の発揮」においては、発生イベント依存のおよび転移因子依存的な胚性遺伝子発現

メカニズムを解明し、いかに全能性が発揮されるかを明らかにする。「③全能性の消失」においては、胚と胚体外への初期分化過程におけるエピゲノム動態を解明し、エピゲノム操作による全能性構築の技術基盤を作る。

(2) A02 全能性の制御と構築 (デザイン) : A01 で解読する全能性プログラムを各ステージに対応させて制御技術を確認する。「①全能性獲得」においては、カエル卵子抽出液を用いて *in vitro* でゲノム再プログラム化を再現することで、全能性獲得因子とメカニズムを明らかにする。「②全能性の発揮」においては、エピゲノム再編成因子を同定し、全能性細胞 (核) の構築をめざす。「③全能性の消失」においては、独自に確立した幹細胞培養技術を活用し、全能性を喪失した幹細胞から人工胚盤胞の構築を経て、胚体外を含めた完全な個体形成を目指す。さらに、体細胞核移植の新規技術開発により、全能性胚から胎盤までの全期間の完全な再構築を目指す。

#### 4. 研究の進展状況及び成果

本研究は当初の計画に沿って順調に進展している。A01 および A02 いずれも全能性の理解および制御につながる新しい研究成果を得ることができた。特に、研究項目や計画・公募研究の枠を越えた活発な共同研究が領域の推進力となっている。次世代を担う計画班若手5人 (宮本、井上、新富、石内、岡江) 全員が責任あるいは筆頭著者として顕著な業績を挙げたことも特筆される。主な成果は以下の通りである (肩番号は「6. 主な発表論文等 (受賞等を含む)」の番号と一致)。

(1) 精巣上体の精子成熟を制御するルミクリン機構を解明するとともに (*Science* 2020)<sup>1</sup>、精子と卵の融合課程に必須な6因子を同定した(*PNAS* 2020a; *PNAS* 2020b)<sup>2,3</sup>。(A01 計画研究)

(2) 受精卵特異的重合化核アクチンが前核内の DNA 損傷修復を促し、正常な胚発生に必要であることを発見し、全能性獲得に必須となる前核の形成過程に新たな知見をもたらした (*Cell Rep* 2020)<sup>4</sup>。(A01 計画研究)

(3) 受精後の遺伝子発現調節に関わる *Dux* は、その family 遺伝子が多数存在し、それらが1細胞期に一過的に発現することによって2細胞期全能性核での遺伝子発現に関わっていることを明らかにした (*Sci Rep* 2020)<sup>5</sup>。(A01 計画研究・公募研究による領域内共同研究)

(4) ハムスターゲノムの再解析により小分子 RNA と転移因子の解析が可能な良質のゲノム配列を構築し(*Nucleic Acids Res* 2021)<sup>6</sup>、ハムスターPIWIL 因子 KO の解析を進め、受精後胚発生に必須な母性因子であることを明らかにした (*Nat Cell Biol* 2021. 2報)<sup>7,8</sup>。(A01 計画研究)

(5) 非典型ポリコーム抑制複合体 1 の必須構成因子 *Pcgfl/6* の欠損卵では、一部の遺伝子で H3K27me3 が欠落すること、そして H3K27me3 の欠落状態は受精後も不可逆的に伝承され、次世代において胎盤特異的なゲノム刷り込みの破綻と胎盤過形成を引き起こすことを明らかにした (*Nat Genet* 2021)<sup>9</sup>。(A01 計画研究)

(6) ショウジョウバエ初期胚をモデルに、遺伝子発現の空間パターンが形成されるメカニズムについて詳細な解析を行い、「転写バースト」と呼ばれる転写活性の揺らぎが初期胚内の位置に応じて柔軟に変化することで、遺伝子発現の空間パターンが形成されるという基本原理を解明した (*Curr Biol* 2021)<sup>10</sup>。(A01 公募研究)

(7) 植物の配偶子である卵細胞をつくる過程において、植物の配偶体細胞の初期状態が配偶子 (卵細胞) である可能性を示し、植物において「全能性獲得」に迫る重要な知見を得た (*PLoS Biol* 2021)<sup>11</sup>。(A01 公募研究)

(8) ヒストンメチル化酵素 *Kmt2b* の標的遺伝子の一つで精子細胞に高発現する *Tsga8* の遺伝子欠損マウスを作出、解析し、精子の形態異常により不妊になることを明らかにした(*Development* 2021)<sup>12</sup>。(A01 公募研究と A02 計画研究の領域内共同研究)。

(9) 分裂期染色体構築に不可欠なタンパク質であるトポイソメラーゼ II  $\alpha$  がその C 末端領域を介して染色体上で適切に酵素活性を発揮するメカニズムを明らかにした (*Nat Commun* 2021)。(A02 計画研究)<sup>13</sup>

(10) ヒストンバリエント H3.3 が通常の細胞と大きく異なり、受精前後にゲノムワイドに均一に分布していること、そしてこの非典型 H3.3 パターンが全能性胚に特有の転写状態の確立に重要であることを明らかにした (*Nat Struct Mol Biol* 2021)<sup>14</sup>。(A02 計画研究の領域内共同研究)

(11) ヒト trophoblast stem cell (TS 細胞) 技術を駆使して、父方ゲノムのみを有する全胎状奇胎からの TS 細胞の樹立に成功した(*PNAS* 2019)<sup>15</sup>。(A02 計画研究)

(12) 20年以上にわたっての謎であったクローンの巨大胎盤の原因が、coding 遺伝子でなく、刷込み型 miRNA クラスターの刷込み消去であることを明らかにした (*PNAS* 2019; *Nat Commun* 2020)<sup>16,17</sup>。(A02 計画研究と A01 公募研究の領域内共同研究)

(13) 卵管 *in vivo* transfection 法によるノックアウトハムスターの作出に成功し、精子アクロシンが受精に必須であることを明らかにした (*PNAS* 2020)<sup>18</sup>。(A02 計画研究)

(14) マーモセットの体細胞核移植クローンの条件設定を進め、安定してクローン胚盤胞を得る技術を確認した。近々、胚移植を開始する予定である。(A02 計画研究の領域内共同研究)

#### 5. 今後の研究計画

(1) 総括班活動：領域活動の発展には、総括班の強力な支援が必須である。これまでの総括班活動をさらに強力に進める。研究技術支援として、これまでのゲノム編集マウス作製、発生工学、次世代シーケンサー解析に加えて、需要が高まっている染色体 FISH と幹細胞樹立の支援

を追加する。若手育成では、若手勉強会、若手 web セミナー、海外学会参加をさらに充実し、自立的な研究の芽を育てるとともに、論文発表も目標とする基盤を醸成する。

(2) 領域研究の推進：①全能性の普遍的原理の解明、②ゲノム再プログラム化による全能性の獲得メカニズムの解明、③新たな実験・解析モデルを用いたメカニズムの探求を3つの柱として整理して、計画研究および公募研究の別なく領域内共同研究を強力に推進し、各班員の専門性や技術が最大限相乗効果を生むように領域研究活動を推進していく。令和4-5年の公募班は、研究レベルや独創性だけでなく、真に「全能性プログラム」領域研究の盛り上がりにつながるかどうかを公募研究選考の重要なポイントとする予定である。

#### 6. 主な発表論文等（受賞等を含む）

原著論文 192 件、総説 16 件からの抜粋。二重下線は研究代表者、下線は研究分担者、\*は責任著者。●印は、領域内共同研究。

1. Kiyozumi D, Noda T, (略), \*Matzuk MM, \*Ikawa M. NELL2-mediated lumicrine signaling through OVCH2 is required for male fertility. *Science*. 368:1132-1135 (2020)
2. Noda T, Lu Y, (略), \*Matzuk MM, \*Ikawa M. Sperm proteins SOF1, TMEM95, and SPACA6 are required for sperm-oocyte fusion in mice. *PNAS*. 117:11493-11502 (2020)
3. Fujihara Y, Lu Y, (略), \*Matzuk MM, \*Ikawa M. Spermatozoa lacking Fertilization Influencing Membrane Protein (FIMP) fail to fuse with oocytes in mice. *PNAS*. 117:9393-9400 (2020)
4. Okuno T, (略), Yamagata K, Grosse R, \*Miyamoto K. Zygotic Nuclear F-Actin Safeguards Embryonic Development. *Cell Rep*. 31:107824 (2020)
5. ●Sugie K, Funaya S, Kawamura N, Nakamura T, Suzuki MG, \*Aoki F. Expression of Dux family genes in early preimplantation embryos. *Sci Rep*. 10:19396 (2020)
6. Ishino K, Hasuwa H, (略), Morishita S, \*Siomi H. Hamster PIWI proteins bind to piRNAs with stage-specific size variations during oocyte maturation. *Nucleic Acids Res*. 49: 2700-2720 (2021)
7. Hasuwa H, (略), Sasaki H, \*Siomi H. Production of functional oocytes requires maternally expressed PIWI genes and piRNAs in golden hamsters. *Nat Cell Biol*. in press (2021)
8. Loubalova Z, Fulka H, (略), \*Ogura A, \*Svoboda P. Formation of hamster's spermatogonia and fertile oocytes requires piRNAs. *Nat Cell Biol*. in press (2021)
9. Mei H, Kozuka C, (略), Koseki H, \*Inoue A. H2AK119ub1 guides maternal inheritance and zygotic deposition of H3K27me3 in mouse embryos. *Nat Genet*. 53:539-550 (2021)
10. \*Fukaya T. Dynamic regulation of anterior-posterior patterning genes in living Drosophila embryos. *Curr Biol*. 31:2227-2236 (2021)
11. Susaki D, Suzuki T, (略), \*Higashiyama T, \*Kurihara D. Dynamics of the cell fate specifications during female gametophyte development in Arabidopsis. *PLoS Biol*. 19:e3001123 (2021)
12. ●Kobayashi Y, Tomizawa SI, (略), Ogura A, \*Ohbo K. Tsga8 is required for spermatid morphogenesis and male fertility in mice. *Development*. 148:dev196212 (2021)
13. Shintomi K, \*Hirano T. Guiding functions of the C-terminal domain of topoisomerase II $\alpha$  advance mitotic chromosome assembly. *Nat Commun*. 12:2917 (2021)
14. ●\*Ishiuuchi T, Abe S, Inoue K, Yeung WKA, Miki Y, Ogura A, \*Sasaki H. Reprogramming of the histone H3.3 landscape in the early mouse embryo. *Nat Struct Mol Biol*. 28:38-49 (2021)
15. Takahashi S, \*Okae H, (略), \*Arima T. Loss of p57KIP2 expression confers resistance to contact inhibition in human androgenetic trophoblast stem cells. *PNAS*. 116:26606-26613 (2019)
16. Matoba S, (略), Nakamuta N, \*Ogura A. Paternal knockout of Slc38a4/SNAT4 causes placental hypoplasia associated with intrauterine growth restriction in mice. *PNAS*. 116:21047-21053 (2019)
17. ●\*Inoue K, (略), Honda A, Miura K, Hada M, Hasegawa A, Watanabe N, Dodo Y, Mochida K, \*Ogura A. Loss of H3K27me3 imprinting in the Sfmtb2 miRNA cluster causes enlargement of cloned mouse placentas. *Nat Commun*. 11:2150 (2020)
18. ●Hirose M, Honda A, (略), \*Yanagimachi R, \*Ogura A. Acrosin is essential for sperm penetration through the zona pellucida in hamsters. *PNAS*. 117:2513-2518 (2020)
19. ●Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Matoba S, Ogura A, \*Shinohara T. Autologous transplantation of spermatogonial stem cells restores fertility in congenitally infertile mice. *PNAS*. 117:7837-7844 (2020)
20. ●Morimoto H, Yamamoto T, Miyazaki T, Ogonuki N, Ogura A, (略), \*Shinohara T. An interplay of NOX1-derived ROS and oxygen determines the spermatogonial stem cell self-renewal efficiency under hypoxia. *Genes Dev*. 35:250-260 (2021)

ホームページ等

新学術領域研究「全能性プログラム：デコーディングからデザインへ」ホームページ

<https://totipotency.biken.osaka-u.ac.jp/>