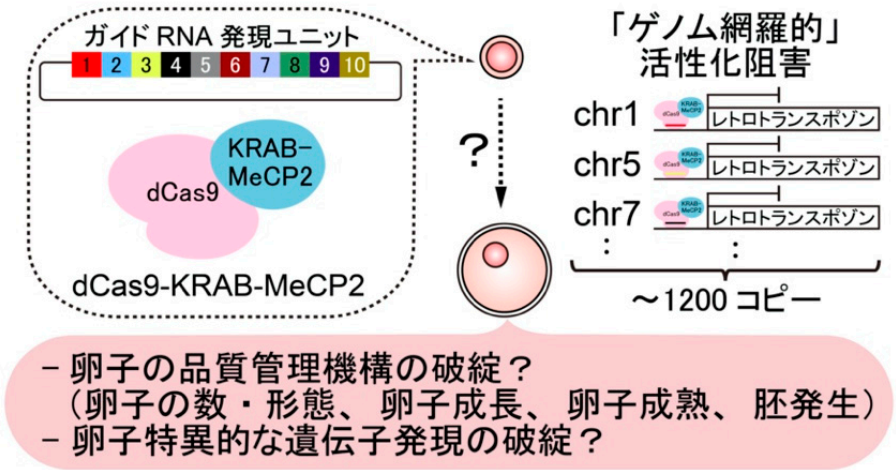
123　卵子におけるレトロトランスポゾン活性化の意義の解明	白根　健次郎

【目的】哺乳類ゲノムの約半分はトランスポゾン配列で構成されている。その中でもレトロトランスポゾンは転写を介してゲノム中を転移する。したがって、次世代へ遺伝情報を伝える生殖細胞においてはレトロトランスポゾン発現の厳密な抑制が重要である。一方で、興味深いことに、卵母細胞の成長過程では、複数のレトロトランスポゾンコピーから転写が生じるが、卵母細胞におけるその発現は転移以外の役割を担う可能性がある。本研究では、なぜ卵母細胞ではレトロトランスポゾンを発現するのかという問いのもと、これらのゲノム網羅的な活性化阻害を試みる。その卵母細胞発生への影響を解析し、卵母細胞発生においてレトロトランスポゾンが発現する意義の解明を目指す。

【方法】本研究では転写抑制ドメインを持つが DNA 切断活性をもたない Cas9（dCas9-KRAB-MeCP2）と複数のガイド RNA により、卵母細胞発生過程において複数のレトロトランスポゾンコピーの活性化を阻害する実験系の構築を目指した。具体的には、胚性幹細胞を起点として誘導された始原生殖細胞様の細胞を胎齢 12.5 日胚由来の卵巣体細胞と凝集培養し、培養膜上で卵母細胞へと分化させる実験系を基盤とした。レトロトランスポゾン発現のゲノム網羅的な活性化阻害の実験に先立ち、卵母細胞レポーターの抑制を目指した予備的な検討を行った。まず、卵母細胞レポーターSTELLA-CFP を標的とする 4 種類のガイド RNA からなるユニットにより、卵母細胞発生過程において薬剤依存的にその抑制が可能かを検証した。次に、卵母細胞の RNA シークエンスのデータから、卵母細胞の発生過程において最も発現コピーの多いレトロトランスポゾンを同定した。これらのレトロトランスポゾンコピーに共通の塩基配列を抽出することで、ゲノム網羅的な活性化阻害のための複数のガイド RNA 候補を得た。最後に、これらを直列に連結したガイド RNA ユニットと dCas9-KRAB-MeCP2 を共に発現する胚性幹細胞を作製し、体外再構築系により卵母細胞へと分化誘導した。

【結果】卵母細胞レポーター遺伝子の発現の抑制が可能かを検証した結果、4 種類のガイド RNA を直列に連結したガイド RNA ユニットを dCas9-KRAB-MeCP2 と共に発現させることで、卵母細胞において薬剤依存的に卵母細胞レポーター遺伝子の発現を抑制できることを確認した。また、*in silico* 解析により、標的のレトロトランスポゾンコピーの 99%を抑制可能な 10 種類のガイド RNA を選定した。現在は、これらを直列に繋いだガイド RNA ユニットと dCas9-KRAB-MeCP2 を共発現する胚性幹細胞から、同様の方法により体外で構築した卵巣における卵母細胞分化の評価を進めている。

卵母細胞におけるレトロトランスポゾン活性化の意義の解明



123. 卵子におけるレトロトランスポゾン活性化の意義の解明

白根　健次郎

大阪大学 大学院医学系研究科 生殖遺伝学

Key words：卵母細胞，卵巣オルガノイド，レトロトランスポゾン活性化，ゲノム機能，dCas9

緒　言

精子と卵子は接合して互いの機能を補い合うことにより、発生能を獲得する。つまり、個体発生には雌雄の配偶子の持つ異なるゲノム機能が必要であり、これは配偶子形成過程において、雌雄それぞれに特異的な機構により構築される［1]。DNA メチル化によるゲノムインプリンティングはその代表例であり、配偶子で獲得された雌雄に特異的な DNA メチル化は受精後の胚発生に必須である。我々はこれまで、ゲノム網羅的な手法を用いて、雌雄の配偶子に特異的な DNA メチル化パターンの形成は異なるヒストン修飾酵素により先導されることを明らかにしてきた［2]。この DNA メチル化制御の違いに加え、ゲノム変異の脅威となるレトロトランスポゾンの制御も雌雄の生殖細胞の間では大きく異なる。つまり、精子のエピゲノムの形成過程（胎児期）では、レトロトランスポゾンの発現を頑強に抑制するのに対して、卵子のエピゲノム形成過程（生後の卵母細胞の成長過程）では逆に、それを活性化させる。また、これらのレトロトランスポゾンの中には、内在性の遺伝子との間に融合転写物を形成するものも多く存在する［3]。

では、なぜ次世代に遺伝情報を伝達する卵母細胞において、ゲノム変異の脅威となるレトロトランスポゾンが発現するのだろうか。融合転写物の一つ（DICER1o）が減数分裂の進行に重要な役割を果たすことが報告されているが［4]、その他大多数の融合転写物の機能やレトロトランスポゾンがゲノム横断的に発現する意義は不明である。また、ヒトの卵母細胞においてもレトロトランスポゾンのゲノム横断的な発現やキメラ産物の形成が認められることから、その発現は、マウスからヒトに至るまで保存されており、卵母細胞の発生において重要な役割を果たす可能性を秘めている。DICER1o のように各々のキメラ産物の機能解析にはマウス個体を用いた遺伝学的な手法が有用である一方で、マウス個体を用いて、卵母細胞の発生過程において発現するレトロトランスポゾンをゲノム網羅的に抑制することは技術的に困難である。これが実現できれば、卵母細胞におけるレトロトランスポゾン発現の意義の理解が飛躍的に進むと期待できる。

所属の研究室では、胚性幹細胞を起点とした体外培養系を用いて、卵母細胞の発生を追跡可能な独自の実験系を構築している［5]。この培養系は胚性幹細胞を起点とするため、遺伝子改変が比較的容易であること、また卵巣内の卵母細胞の発生を体外で再構築するため、培地への薬剤添加による遺伝子発現の制御なども可能である［6]。本研究では、この実験系を基盤として卵母細胞の発生過程において、ゲノムに散在する複数のレトロトランスポゾンの活性化を阻害する新たな実験系の確立を目指す。確立した実験系において、卵巣内の卵母細胞の発生の組織学的観察や生化学的な解析を行い、卵母細胞においてレトロトランスポゾンが発現する意義の解明を目指す。

方法および結果

1. レトロトランスポゾンコピーを標的とするガイド RNA ユニットの構築

我々は、標的ゲノム領域へ結合して安定的な転写抑制効果を発揮する dCas9-KRAB-MeCP2 の実験系に着目した[7]。この実験系は、dCas9-KRAB-MeCP2 を 20 塩基のガイド RNA 配列と共に細胞内で発現させることで、標的ゲノム部位における転写の抑制が可能である。まず、我々がこれまでに取得した生体のマウス卵母細胞の RNA シークエンスデータ［3］から最も発現の高いレトロトランスポゾンコピーを同定した。これらのレトロトランスポゾンコピーの塩基

配列から、dCas9 による認識に必要な PAM 配列（5'-NGG）を検索して、9,319 種類のガイド RNA を取得した。次に、遺伝子のエキソン上に結合し得るガイド RNA を排除した。最小数のガイド RNA で最大数のレトロトランスポゾンコピーを抑制させるため、10 種類のガイド RNA の組み合わせを選択した。この 10 種類のガイド RNA により、標的とするレトロトランスポゾンコピーの 99%を抑制可能であると推定された。以上の *in silico* 解析により標的とするレトロトランスポゾンを抑制するためのガイド RNA を設計した（図 1）。

ガイド RNA は U6 プロモーターとターミネーターを含む単位として発現させる。本研究において対象とするレトロトランスポゾンはゲノム中に 1,207 コピー存在するため、細胞内においてガイド RNA と dCas9-KRAB-MeCP2 を高発現させる必要がある。そこでゲノムに高効率で外来遺伝子の導入が可能な piggyBac システム［8］を採用した。piggyBac のバックボーンをもつベクターに上述の 10 種類のガイド RNA それぞれに U6 プロモーターとターミネーターの単位を組み込み、これらを直列につないだベクターを構築した。同様に dCas9-KRAB-MeCP2 も piggyBac のバックボーンをもつベクターへと組み込んだ。

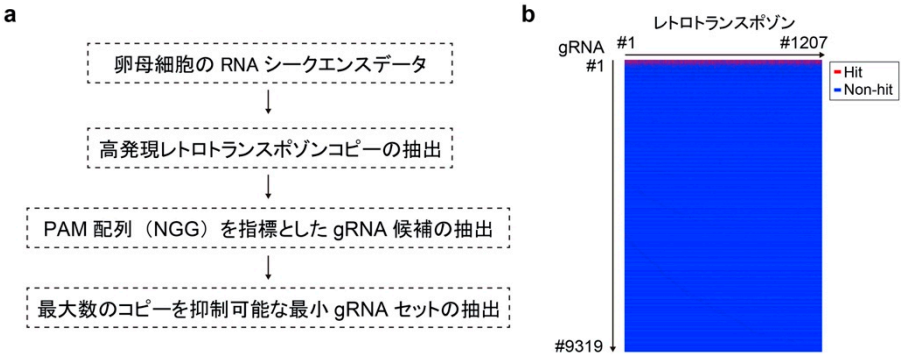


図 1. レトロトランスポゾン活性化のゲノム網羅的な阻害を実現する gRNA の設計

a) レトロトランスポゾンコピーに対する gRNA 設計のためのフローチャートを示す。

b) 設計した 9,319 種類の gRNA が標的とし得る 1,207 種類のレトロトランスポゾンコピーをヒートマップで示す。レトロトランスポゾン中に gRNA 配列があるものを Hit（赤色）、ないものを Non-hit（青色）で示している。ヒートマップは hit の多い順から並べている。

2. 卵母細胞レポーター遺伝子を抑制するガイド RNA ユニットの構築とその実験的検証

次に、体外再構築卵巣の培養系におけるガイド RNA ユニットによる標的遺伝子抑制の有効性を検証した。具体的には、卵母細胞レポーターSTELLA-CFP を標的とするガイド RNA を 4 種類設計し、これらを直列につないだ piggyBac ベクターを構築した。4 つのガイド RNA を発現するガイド RNA ユニットと dCas9-KRAB-MeCP2 を胚性幹細胞に導入し、薬剤選択により、ゲノム中にこれらが挿入された複数の胚性幹細胞クローンを得た。この中から dCas9-KRAB-MeCP2 の導入されたコピー数の多いクローンとより少ないクローンを選択した。

得られた 2 つの胚性幹細胞クローンからエピブラスト様の細胞を誘導したのちに始原生殖細胞様の細胞を誘導した。始原生殖細胞様の細胞をセルソーターにより分取したのちに胎齢 12.5 日の卵巣体細胞と凝集培養させた。凝集塊を培養膜上へと移し、培地交換の度に dCas9-KRAB-MeCP2 の発現を安定化させる薬剤を加え、気相-液相培養により 21 日間培養した（図 2a）。体外での卵巣の再構築系において、dCas9-KRAB-MeCP2 を薬剤依存的に発現させることが可能か、また薬剤依存的に STELLA-CFP の蛍光が減弱するかを検証した。卵巣培養 21 日目において、dCas9-KRAB-MeCP2 のコピー数に応じた STELLA-CFP 蛍光の減弱と薬剤依存的な抑制効果を確認した（図 2b）。以上、複数種類のガイド RNA を直列につないだガイド RNA ユニットと dCas9-KRAB-MeCP2 の薬剤依存的な発現により、卵母細胞の発生過程における標的遺伝子の発現抑制が可能な実験系を確立した。

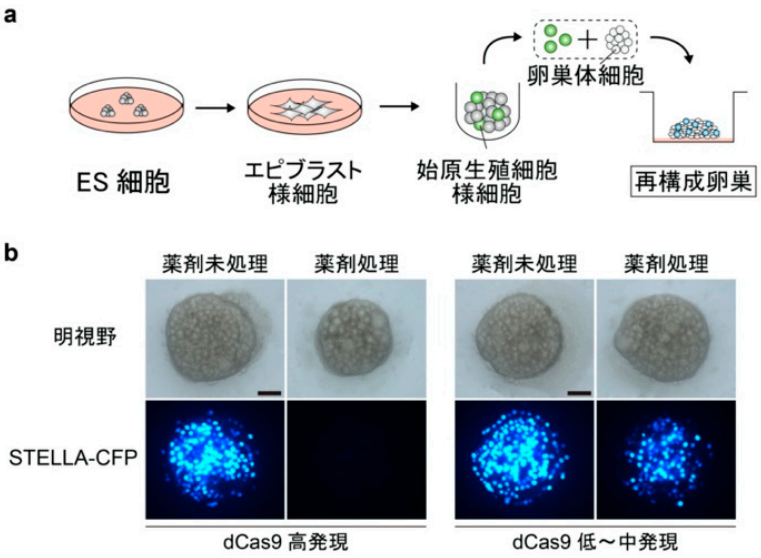


図 2. 体外培養系による卵巣の再構築と卵母細胞レポーター遺伝子の抑制

a) 胚性幹細胞を起点として、エピブラスト様の細胞を経て誘導された始原生殖細胞様の細胞と胎齢 12.5 日胚由来の卵巣体細胞を凝集培養して、培養膜上で培養して卵巣を体外で再構築する実験の流れを模式的に示す。

b) 胚性幹細胞を起点として、エピブラスト様の細胞を経て誘導された始原生殖細胞様の細胞を胎齢 12.5 日の卵巣体細胞と凝集培養を行い、培養膜上で 21 日間培養して構築した卵巣の明視野画像（上）と CFP の蛍光画像（下）を示す（スケールバー：500 μm）。

3. 卵母細胞におけるレトロトランスポゾンコピーの網羅的抑制を実現する胚性幹細胞の作出

2 において卵巣の体外再構築系における dCas9-KRAB-MeCP2 による抑制の有効性が実証されたため、1 において設計したガイド RNA を発現可能なガイド RNA ユニットをもつ piggyBac ベクターを作製した。2 と同様に卵母細胞レポーターSTELLA-CFP を保持する胚性幹細胞へと導入し、薬剤選択によりゲノム中にこれらが挿入された複数の胚性幹細胞クローンを得た。標的とするレトロトランスポゾンはゲノム中に 1,207 箇所あるため、dCas9-KRAB-MeCP2 のコピー数の多いクローンを優先して始原生殖細胞様の細胞へと誘導を試みた。しかしながら、予想に反してこれらのクローンは始原生殖細胞様の細胞への誘導効率が著しく低く、凝集培養へ供するための十分な数の始原生殖細胞様の細胞が得られなかった。そこで、誘導を試みたクローンよりも dCas9-KRAB-MeCP2 のコピー数の少ないクローンから始原生殖細胞様の細胞を誘導することで、体外で卵巣を再構築するのに十分な細胞を得ることができた。現在はこのクローンにおいて薬剤誘導性に dCas9-KRAB-MeCP2 を発現させ、卵母細胞発生の経時的な観察を行っている。

考　察

本研究では、複数種類のガイド RNA を直列につないだガイド RNA ユニットと dCas9-KRAB-MeCP2 により、胚性幹細胞を起点として体外で再構築した卵母細胞において特定の遺伝子を抑制可能な実験系を構築した。一方で、レトロトランスポゾンのゲノム網羅的な活性化阻害の実験系においては、dCas9-KRAB-MeCP2 のコピー数の多いクローンでは予想に反して始原生殖細胞様の細胞の誘導効率が著しく低下したため、よりコピー数の少ないクローンへと切り替えた。この細胞由来の卵母細胞（様細胞）が得られれば、標的のレトロトランスポゾンの抑制を RNA シークエンスで確認する予定である。一方で、このクローンではコピー数不足により、十分な抑制効果を期待できない可能性もある。また、始原生殖細胞様の誘導効率の低下は、組織特異性の低い CAG プロモーター制御下で dCas9-KRAB-

MeCP2 を発現させることによる dCas9-KRAB-MeCP2 の異所性結合が関わっていると推察される。今後は高い dCas9-KRAB-MeCP2 のコピー数を確保しつつ、その発現を卵母細胞に限定させるため、現行の CAG を卵母細胞特異的に発現する遺伝子のプロモーター配列へと置換することも視野に入れる。プロモーター置換により、卵母細胞に限定したより精度の高い網羅的なレトロトランスポゾンの抑制を実現できれば、その卵母細胞において生化学的な解析を実施する。

共同研究者・謝辞

本研究は大阪大学医学系研究科生殖遺伝学教室にて実施された。大学院生の高波裕喜氏と研究の方向性・技術面に至るまで数々なご助言を下さった林克彦教授および林研究室の皆様に感謝申し上げます。

文　献

1) Shirane K, Lorincz M. Epigenetic Mechanisms Governing Female and Male Germline Development in Mammals. Sex Dev. 2022;16(5-6):365-387. doi: 10.1159/000529336. Epub 2023 Jan 26. PMID: 36702107.
2) Shirane K, Miura F, Ito T, Lorincz MC. NSD1-deposited H3K36me2 directs de novo methylation in the mouse male germline and counteracts Polycomb-associated silencing. Nat Genet. 2020 Oct;52(10):1088-1098. doi: 10.1038/s41588-020-0689-z. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32929285.
3) Brind'Amour J, Kobayashi H, Richard Albert J, Shirane K, Sakashita A, Kamio A, Bogutz A, Koike T, Karimi MM, Lefebvre L, Kono T, Lorincz MC. LTR retrotransposons transcribed in oocytes drive species-specific and heritable changes in DNA methylation. Nat Commun. 2018 Aug 20;9(1):3331. doi: 10.1038/s41467-018-05841-x. PMID: 30127397; PMCID: PMC6102241.
4) Flemr M, Malik R, Franke V, Nejepinska J, Sedlacek R, Vlahovicek K, Svoboda P. A retrotransposon-driven dicer isoform directs endogenous small interfering RNA production in mouse oocytes. Cell. 2013 Nov 7;155(4):807-16. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.001. PMID: 24209619.
5) Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G, Obata Y, Hirao Y, Hamada N, Shimamoto S, Imamura T, Nakashima K, Saitou M, Hayashi K. Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. Nature. 2016 Nov 10;539(7628):299-303. doi: 10.1038/nature20104. Epub 2016 Oct 17. PMID: 27750280.
6) Hamazaki N, Kyogoku H, Araki H, Miura F, Horikawa C, Hamada N, Shimamoto S, Hikabe O, Nakashima K, Kitajima TS, Ito T, Leitch HG, Hayashi K. Reconstitution of the oocyte transcriptional network with transcription factors. Nature. 2021 Jan;589(7841):264-269. doi: 10.1038/s41586-020-3027-9. Epub 2020 Dec 16. PMID: 33328630.
7) Yeo NC, Chavez A, Lance-Byrne A, Chan Y, Menn D, Milanova D, Kuo CC, Guo X, Sharma S, Tung A, Cecchi RJ, Tuttle M, Pradhan S, Lim ET, Davidsohn N, Ebrahimkhani MR, Collins JJ, Lewis NE, Kiani S, Church GM. An enhanced CRISPR repressor for targeted mammalian gene regulation. Nat Methods. 2018 Aug;15(8):611-616. doi: 10.1038/s41592-018-0048-5. Epub 2018 Jul 16. PMID: 30013045; PMCID: PMC6129399.
8) Yusa K, Zhou L, Li MA, Bradley A, Craig NL. A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jan 25;108(4):1531-6. doi: 10.1073/pnas.1008322108. Epub 2011 Jan 4. PMID: 21205896; PMCID: PMC3029773.