

科学研究費助成事業「新学術領域研究（研究領域提案型）」 研究概要
〔令和6年度事後評価用〕

令和6年6月30日現在

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のゲノムは、受精後にゲノム再プログラム化を受け、「全能性（totipotency）」を獲得する。全能性は、最も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た。その結果、1 細胞期胚の前核がヒストンやヌクレオソームの分布が均質または不安定なナイーブ状態による一種に基底状態にあり、これが全能性を保証すること、そしてその特性が2 細胞期にかけて失われ、抑制性ヒストン主導による典型的な遺伝子発現制御エピゲノムと核内構造の獲得によって胚性遺伝子活性化が開始されること、この結果、徐々に全能性が喪失することが明らかになった。さらに、遺伝子ノックアウト、核移植クローン技術、trophoblast stem cell の解析など発生工学的手法により、正常胎盤を形成・維持する分子メカニズムを明らかにした。これらの実績の多くは、領域内共同研究によるものであり、新学術領域研究としての特長を最大限に発揮できた。また、若手研究者の多くが実績を挙げることができた。

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も、多くの独創的な成果を生み出す原動力となった。この中で周回遅れだっ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、我が国では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、全能性胚の操作はますます社会的な重要度が増している。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む新たな学問領域を開く機運が高まっていた。

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、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た。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。さらに、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た。

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. 研究の成果

本研究は当初の計画に沿って順調に進展した。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。研究項目および計画研究・公募研究の枠を超えて共同研究を精力的に進めたことが功を奏し、領域内共同研究論文は **29 件**（重複数えず）に達した。また、Science、PNAS、Nat Genet、Nat Commun、Nat Struct Mol Biol などに掲載された特に顕著な成果 54 件（いずれも corresponding author paper）については、HP で解説記事を掲載した。次世代を担う計画研究代表 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。本領域全員による全能性の解明に向けた 6 つの取組を図 1 に示した。以下、これらの成果について説明する。

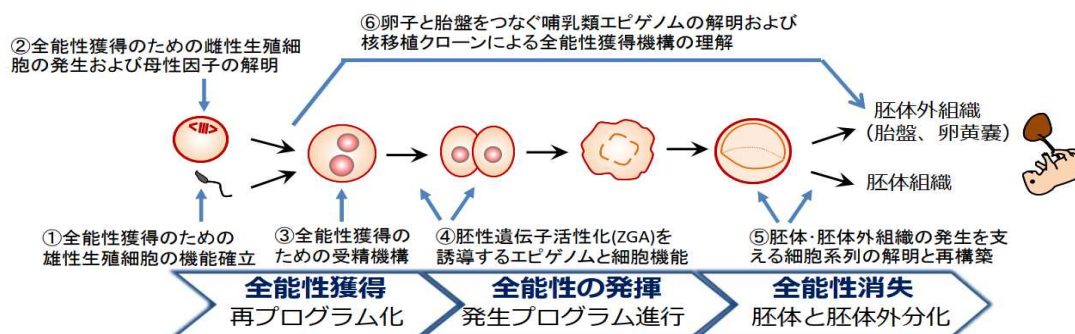


図 1. 本領域における全能性の解明に向けた取組

(1) 全能性獲得のための雄性生殖細胞の機能確立

伊川は、精巣網羅的遺伝子ノックアウトにより、276 系統ものノックアウトマウスを作出し、その表現型解析を進めた。精巣上体の精子成熟を制御するルミクリン機構 (Science 2020; Nat Commun 2023)、先体膜タンパク質の生合成を促進因子 (PNAS 2023)、先体反応必須因子 (Sci Adv 2023) など多数の業績を挙げた。また、篠原は、センダイウイルス F タンパク質をレンチウイルスベクターに発現させることで、精子幹細胞への効率的な遺伝子導入を可能にした (Stem Cell Rep 2020)。また、精細胞と精細管上皮構造のさまざまな因子を通じた相互作用など、多数の論文で発表した(篠原+小倉 PNAS 2020; Genes Dev 2021 など多数)。父性因子として、精原幹細胞の H3K4me3 の役割も示された(大保+小倉 Development 2021; 他投稿準備中)。また、一次精母細胞染色体が細胞質を少なくした未成熟卵子内で正常に減数分裂を進行させることが明らかになり、減数分裂停止ミュータント雄マウスからの産子作出に成功した(小倉+京極+日野 EMBO Rep 2022)。

(2) 全能性獲得のための雌性生殖細胞の発生および母性因子の解明

ゲノム編集マウスを用いて全能性に関連する卵側因子を探索し、OOSP1~3 因子は単独でもファミリーとしても必須でない一方 (伊川 Cells 2020)、PABPN1L が GV~MII 期の母性 mRNA 分解に重要であることを見出した (伊川 JRD 2024)。塩見と小倉らは、それぞれ独立に、哺乳類において PIWI-piRNA 系が機能的な卵子形成(母性因子の確立)に必須であることを示した(Nat Cell Biol 2021a; 2021b)。塩見はトランスポゾンや小分子 RNA 解析に必須な高精度ハムスターゲノム配列を発表し、現在世界中で利用されている(Nucleic Acids Res 2021)。また、Kitl を欠損して不妊症となる早発卵巣不全の卵巣に Kitl を発現するアデノ随伴ウイルスとアデノウイルスを導入すると自然交配によりマウス子孫を作出した。これは卵巣における不妊症治療の最初の報告で難治性の不妊症に対する新しい治療法となる可能性がある(篠原 Cell Rep Med 2022)。卵子のエピゲノム基盤では、DNA メチル化に H3K36me2 と H3K36me3 の両者が役割分担をしていること(石内 Nat Commun 2022)そして卵子型リンカーヒストン H1foo が卵子の成熟に必須であることを明らかにした(青木ら Reproduction 2022)。

(3)全能性獲得のための受精機構

伊川は、精子と卵の融合課程に必須な6因子を同定し(PNAS 2020a; 2020b; 2022; 2023, Commun Biol 2023)、また精子側の融合因子と言われた Izumo1 がラットでは精子-卵子結合因子であることを示した(Front Cell Dev Biol 2022)。小倉+本多は、ノックアウトハムスター作出技術を開発し、これまで機能が不明であった精子先体酵素アクロシンが精子の透明帯通過に必須であることを明らかにした(PNAS 2020)。また、篠原+小倉は、補助受精技術を繰り返すと子孫に奇形や行動異常の頻度が上昇することを明らかにした(J Clin Invest 2023)。

(4)前核期胚の特性と胚性遺伝子活性化(ZGA)を誘導するエピゲノムと細胞機能

受精後の前核形成から ZGA (胚性遺伝子活性化) (マウスは2細胞期) までは、全能性を維持しつつ、エピゲノムレベルおよび細胞レベルで劇的な変化が生じる時期であり、全能性理解の根幹を成す。本領域でも多数の班員がこの時期の分子メカニズムに挑戦した(図2)。前核期胚には、ヒストン H3.3 が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(石内+小倉 Nat Struct Mol Biol 2021)、ヒストン H2AX がクロマチンを弛緩させていること(青木ら Cell Death Discov 2024)、ヌクレオソーム位置に規則性がないという極めて特徴的なクロマチン状態にあることを発見した(石内 Genes Dev 2023)。前核には特有の重合化核アクチンの骨格構造が存在し、DNA 損傷修復を促していること(宮本 Cell Rep 2020; J Biochem 2020)、雌雄前核のサイズが核膜孔の密度およびヒストンメチル化状態と密接な関係にあること(京極ら投稿中)が示された。そして、このナイーブ状態から ZGA 開始に移行するメカニズムの理解も進んだ。その H3.3 の前核期のパターンに H3.1/3.2 が入ることが major ZGA の誘導に必須であること(青木 Nucleic Acid Res 2024)、この major ZGA が始まる2細胞期において一過的に核膜が物理的に柔らかくなることが必須であること(宮本+島本 投稿中)、そしてアンチセンスオリゴを用いて、この ZGA の初期に一過的に発現するレトロトランスポゾン(MERVL)が初期胚の発生に必須であり、タンパク質への翻訳は不要であることが初めて明らかにされた(塩見 Nat Genet 2023)。その他、ZGA 関連では、多数の Dux ファミリー遺伝子(青木+中村 Sci Rep 2020)、Obox3 (石内 Cell Rep 2024)、Obox4 (塩見+小倉 eLife 2024) が minor ZGA から major ZGA への移行制御を行っていることを示した。クローン胚の解析に基づく必須の ZGA 遺伝子(宮本+小倉 Life Sci Alliance 2023)等が明らかにされた。なお、2細胞期以降の全能性の消失については、PRC タンパク質の解析により、条件的(facultative)ヘテロクロマチンの確立を緩慢にすることで、クロマチンに可塑性を持たせているという重要な機構が示唆された(井上 投稿中)。また、ZGA で開始されるエンハンサーの制御機能については、深谷がショウジョウバエ初期胚の高解像度ライブイメージング技術を用いて転写バーストを可視化し、転写因子の挙動および転写活性の制御との関連について顕著な業績を挙げた(Mol Cell 2020; Curr Biol 2021; Nucleic Acids Res 2022; Nat Commun 2023; Mol Cell 2023; Sci Adv 2023)。以上により、ゲノム構造およびエピゲノム状態の解析により前核期核がナイーブな真の全能性状態を獲得していること、そして2細胞期核は定義上の全能性を有する(割球1個が完全に発生する)が、すでにナイーブ状態は脱していることが示された。

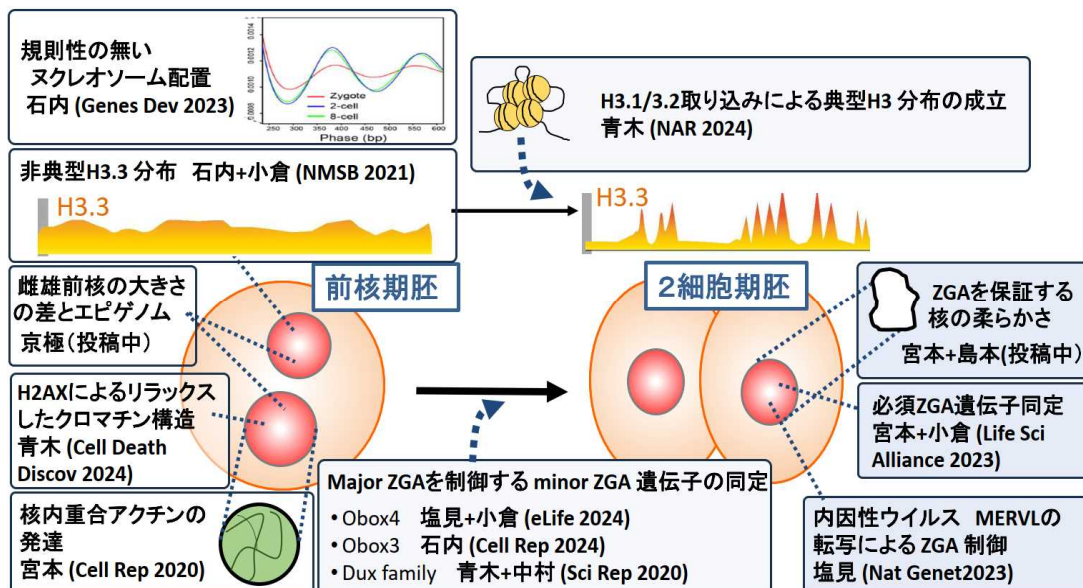


図2. 多くの班員によって、前核期のナイーブ状態から、2細胞期の胚性遺伝子発現活性化(ZGA)へ遷移するメカニズムが明らかにされた

(5)胚体・胚体外組織の発生を支える細胞系列の解明と再構築

哺乳類胚は、胚盤胞期に内細胞塊-胚体組織と栄養外胚葉-胚体外組織(胎盤)の2つの系列

に分化する。それぞれの系列からは ES 細胞および TS(trophoblast stem)細胞が樹立されるが、前者は多能性を有するのに対し、後者は胎盤系列のみに分化するという相違がある。そこで、ChIP-seq および shRNA 実験により、マウス TS 細胞の胎盤系列としての運命付けが、ゲノム中に存在する大規模な抑制性 H3.1-H3K9me3 ドメインに制御されていること、そしてこのドメインの除去により TS 細胞クローンマウスが誕生することを報告した(小倉+岡江 *Genes Dev* 2022)。一方、ヒト TS 細胞に関しては、その第一人者である岡江が、全胎状奇胎からの TS 細胞の樹立に成功し(PNAS 2020)、ES 細胞から TS 細胞への転換に霊長類特異的マイクロ RNA クラスター (C19MC) が必要であることを発見し(Nat Commun 2022)、さらに CRISPR スクリーニングによりヒト胎盤細胞の分化機構およびマウス胎盤細胞との対応を提示することができた(PNAS 2023)。そして岡江班の分担者である大日向は、マウスの機能的な原始内胚葉幹細胞(PrES 細胞)を世界に先駆けて樹立し、さらにそれを ES 細胞および TS 細胞とともに人工胚盤胞(ブラストイド)を作出し、着床させることに成功した(Science 2022)。初の人工胚盤胞からの産子作出に大きく一歩を踏み出したと言える。

(6) 卵子と胎盤をつなぐ哺乳類エピゲノムの解明および核移植クローンによる全能性獲得機構の理解

哺乳類特有の卵子と胎盤をつなぐエピゲノム機構の解明も進んだ。非典型ポリコーン抑制複合体 1 の欠損卵では、一部の遺伝子で H3K27me3 が欠落し、それが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 H3K27me3 依存的な(非典型)ゲノム刷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(井上 *Nat Genet* 2021)、その胎盤異常の責任遺伝子として *Sfmbt2* mRNA 群と *Slc38a4* を同定した(井上+小倉 *Genes Dev* 2022)。この卵子と胎盤をつなぐ非典型刷込み機構は、体細胞核移植クローン胚の発生にも影響を与えていることが明らかになった。マウス核移植クローンにおける胎盤過形成は 20 年以上にわたる謎であったが、偶然にもこの非典型刷込みの制御下にある *Sfmbt2* miRNA クラスターの loss of imprinting による両アレル性発現が原因であることが明らかになった(小倉 PNAS 2019; 小倉+本多 *Nat Commun* 2020)。また、小倉はマウスクローン胚の発生能改善も目指し、特異性の高い新規 G9a (ヒストンメチル化転移酵素) 阻害剤を従来の TSA (ヒストン脱アセチル化阻害剤) と組み合わせるだけで 10 倍近い出生率を達成した(*Stem Cell Rep* 2024)。この G9a 阻害剤は、マーマセットのクローンにも効果的であり、核移植由来 ES 細胞の樹立が可能となり、世界唯一のパーキンソン病モデルマーマセットの線維芽細胞から ES 細胞を樹立することにも成功した(小倉+佐々木 投稿準備中)。

5. 主な発表論文等(受賞等を含む)

雑誌論文(原著論文 393 件、総説 63 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。

- ◎Guo Y, Inoue, K, (略) *Ogura A, *Siomi H. Obox4 promotes zygotic genome activation upon loss of Dux. *eLife*. e95856 (2024)
- *Funaya S, Takahashi Y, Suzuki MG, Suzuki Y, *Aoki F. H3.1/3.2 regulate the initial progression of the gene expression program. *Nucleic Acids Res*. gkae214. (2024)
- Sakamoto M, Ito A, (略) *Ishiuchi T. Detection of newly synthesized RNA reveals transcriptional reprogramming during ZGA and a role of Obox3 in totipotency acquisition. *Cell Rep*. 43(4):114118. (2024)
- *Kubo N, (略) Sasaki H, *Ren B. H3K4me1 facilitates promoter-enhancer interactions and gene activation during embryonic stem cell differentiation. *Mol Cell*. 84: 1742-1752.e5. (2024)
- Yurimoto T, (略) Fujita T, Inoue T, *Sasaki E. Development of a 3D tracking system for multiple marmosets under free-moving conditions. *Commun Biol*. 7:216 (2024)
- ◎Kanatsu-Shinohara M, (略) Ogura A, *Shinohara T. Intracytoplasmic sperm injection induces transgenerational abnormalities in mice. *J Clin Invest*. 133(22): e170140 (2023)
- Sakamoto M, Abe S, Miki Y, Miyanari Y, Sasaki H, Ishiuchi T. Dynamic nucleosome remodeling mediated by YY1 underlies early mouse development. *Genes Dev*. 37(13-14):590-604. (2023)
- ◎Ihashi S, (略) Ogura A, Ikawa M, *Miyamoto K. Incomplete activation of *Alyref* and *Gabpb1* leads to preimplantation arrest in cloned mouse embryos. *Life Sci Alliance*. 6(11): e202302296 (2023)
- Kawasaki K, *Fukaya T. Functional coordination between transcription factor clustering and gene activity. *Mol Cell*. 83: 1605-1622. (2023)
- Hamamoto K, Umemura Y, Makino S, *Fukaya T. Dynamic interplay between non-coding enhancer transcription and gene activity in development. *Nat Commun*. 14(1):826. (2023)
- Sakashita A, Kitano T, (略) Murano K, *Siomi H. Transcription of MERVL retrotransposons is required for preimplantation embryo development. *Nat Genet*. 55(3):484-495. (2023)
- ◎Oura S, Hino T, (略) Ishiguro K, *Ikawa M. Trim41 is required to regulate chromosome axis protein dynamics and meiosis in male mice. *PLoS Genet*. 18(6): e1010241 (2022)
- ◎Takeuchi C, (略) Fukaya T, *Siomi H, *Iwasaki YW. Mod(mdg4) variants repress telomeric

retrotransposon HeT-A by blocking subtelomeric enhancers. *Nucleic Acids Res.*

50(20):11580-11599. (2022)

14. Yano S, *[Ishiuchi T.](#) (略) *Sasaki H. Histone H3K36me2 and H3K36me3 form a chromatin platform essential for DNMT3A-dependent DNA methylation in mouse oocytes. *Nat Commun* 13, 4440 (2022).
15. ©Matoba S, (略) [Ogura A.](#) *[Inoue A.](#) Noncanonical imprinting sustains embryonic development and restrains placental overgrowth. *Genes Dev.* 36(7-8):483-494 (2022)
16. ©Ogonuki N, [Kyogoku H.](#), [Hino T.](#) (略) *[Ogura A.](#) Birth of mice from meiotically arrested spermatocytes following biparental meiosis in halved oocytes. *EMBO Rep.* 23(7):e54992. (2022)
17. Kobayashi N, *[Okae H.](#) (略) Cavaillé J, *Arima T. The microRNA cluster C19MC confers differentiation potential into trophoblast lineages upon human pluripotent stem cells. *Nat Commun.* 13(1):3071 (2022)
18. *[Ohinata Y.](#) (略) Koseki H. Establishment of mouse stem cells that can recapitulate the developmental potential of primitive endoderm. *Science.* 375(6580):574-578 (2022)
19. ©Hada M, (略) [Okae H.](#), Miura K, Shikata D, Arima T, Shirahige K, Hiratani I, *[Ogura A.](#) Highly rigid H3.1/H3.2-H3K9me3 domains set a barrier for cell fate reprogramming in trophoblast stem cells. *Genes Dev.* 36(1-2):84-102 (2022)
20. ©Mori M, (略) Kitajima TS, *[Ikawa M.](#) RanGTP and the actin cytoskeleton keep paternal and maternal chromosomes apart during fertilization. *J Cell Biol.* 220(10): e202012001 (2021)
21. Tanaka M, *[Shimamoto Y.](#) Local body weight measurement of the spindle. *Dev Cell.* 56:871-872 (2021) (総説)
22. [Shintomi K.](#), *Hirano T. Guiding functions of the C-terminal domain of topoisomerase II α advance mitotic chromosome assembly. *Nat Commun.* 12:2917 (2021)
23. Hasuwa H, (略) Sasaki H, *[Siomi H.](#) Production of functional oocytes requires maternally expressed PIWI genes and piRNAs in golden hamsters. *Nat Cell Biol.* 23:1002-1012 (2021)
24. ©Morimoto H, (略) [Ogura A.](#), (略) Trumpp A, *[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)
25. Loubalova Z, Fulka H, (略) *[Ogura A.](#), *Svoboda P. Formation of hamster's spermatogonia and fertile oocytes requires piRNAs. *Nat Cell Biol.* 23:992-1001 (2021)
26. *[Fukaya T.](#) Dynamic regulation of anterior-posterior patterning genes in living Drosophila embryos. *Curr Biol.* 31:2227-2236 (2021)
27. ©*[Ishiuchi 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)
28. Susaki D, (略) *Higashiyama T, *[Kurihara D.](#) Dynamics of the cell fate specifications during female gametophyte development in Arabidopsis. *PLoS Biol.* 19:e3001123 (2021)
29. ©Kobayashi Y, Tomizawa SI, (略) [Ogura A.](#), *[Ohbo K.](#) Tsga8 is required for spermatid morphogenesis and male fertility in mice. *Development.* 148:dev196212 (2021)
30. Mei H, Kozuka C, (略) Kumon M, Koseki H, *[Inoue A.](#) H2AK119ub1 guides maternal inheritance and zygotic deposition of H3K27me3 in mouse embryos. *Nat Genet.* 53:539-550 (2021)
31. 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)
32. ©Kanatsu-Shinohara M, (略) [Ogura A.](#), *[Shinohara T.](#) Autologous transplantation of spermatogonial stem cells restores fertility in congenitally infertile mice. *PNAS.* 117:7837-7844 (2020)
33. Okuno T, (略) Grosse R, *[Miyamoto K.](#) Zygotic nuclear F-actin safeguards embryonic development. *Cell Rep.* 31:107824 (2020)
34. ©*Inoue K, (略) [Honda A.](#) (略) *[Ogura A.](#) Loss of H3K27me3 imprinting in the Sfmbt2 miRNA cluster causes enlargement of cloned mouse placentas. *Nat Commun.* 11:2150 (2020)
35. Hirose M, Honda A (公募班), (略) *Yanagimachi R, *[Ogura A.](#) Acrosin is essential for sperm penetration through the zona pellucida in hamsters. *PNAS.* 117:2513-2518 (2020)
36. Miyawaki S, [Kuroki S.](#), Maeda R, Okashita N, Koopman P, *[Tachibana M.](#) The mouse Sry locus harbors a cryptic exon that is essential for male sex determination. *Science.* 370:121-124 (2020)
37. 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)

ホームページ等

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

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