

【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 ユニートを 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

