

136. 生殖系列の成立に必須の因子 PRDM14 の動作原理解析

関 由行

*関西学院大学 理工学部 生命科学科

Key words : エピジェネティクス, 多能性幹細胞, 生殖細胞, リプログラミング

緒 言

多細胞生物を構成する細胞は、生殖細胞と体細胞の2つに大きく大別することができ、生殖細胞のみが次世代を再生産することができる‘分化全能性’と呼ばれる特殊な能力を保持している。興味深いことに、卵・精子の起源である始原生殖細胞は、生体内では卵もしくは精子のみに分化する単分化能を持った細胞であるが、体外に取り出し特定の培養条件で培養することで多能性幹細胞であるES細胞と同様の性質を持ったEG細胞へ脱分化することができる(潜在的多能性)¹⁾。また始原生殖細胞による多能性の潜在化が破綻すると胚細胞腫とよばれる癌が発症することも知られている。したがって、始原生殖細胞による多能性獲得とその潜在化機構を解明することは、基礎生物学分野のみならず再生医学及び生殖医学分野においても極めて重要な命題である。本研究では、生殖系列の成立に重要な転写制御因子PRDM14の機能解析を通して、始原生殖細胞による多能性獲得を制御する遺伝子カスケードとエピゲノム制御機構の解明を行った。

方法および結果

マウスES細胞はサイトカインであるLeukemia inhibitory factor (LIF)を添加することで未分化性を保った状態で増殖することが可能である(自己複製活性)。我々は以前、ES細胞へPRDM14を誘導的に発現させることで、多能性関連遺伝子領域においてメチルシトシンの酸化及び塩基除去修復経路を介した能動的脱メチル化反応が誘導されることを報告していた²⁾。そこで、まずPRDM14の高発現がES細胞のLIF非依存的な自己複製活性を誘導できるか否かの検証を行った³⁾。具体的には、野生型ES細胞及びPRDM14高発現ES細胞をLIF非添加の培養条件へ移行後、ES細胞の未分化性の指標となるアルカリフォスファターゼ染色を行った。その結果、野生型ES細胞がアルカリフォスファターゼ活性を消失し分化したのに対して、PRDM14高発現ES細胞はアルカリフォスファターゼ活性を維持していた(図1A)。次にLIF除去後における経時的な遺伝子発現変化をqRT-PCRを用いて解析し、野生型ES細胞及びPRDM14高発現ES細胞での比較を行った。その結果、野生型ES細胞では分化マーカーの発現上昇及び多能性関連遺伝子の発現減少が観察されたのに対して、PRDM14高発現ES細胞では分化マーカーの発現上昇は観察されず、また多能性関連遺伝子の発現も維持されていた(図1B)。そこで、LIF非存在下で長期間培養したPRDM14高発現ES細胞をヌードマウスの皮下へ移植し多分化能を検証したところ、3胚葉への分化が観察された(図1C)。これらの結果より、PRDM14をES細胞へ高発現することでLIFのシグナル非依存的に多能性制御に関わる転写因子ネットワークが安定することが明らかとなった。

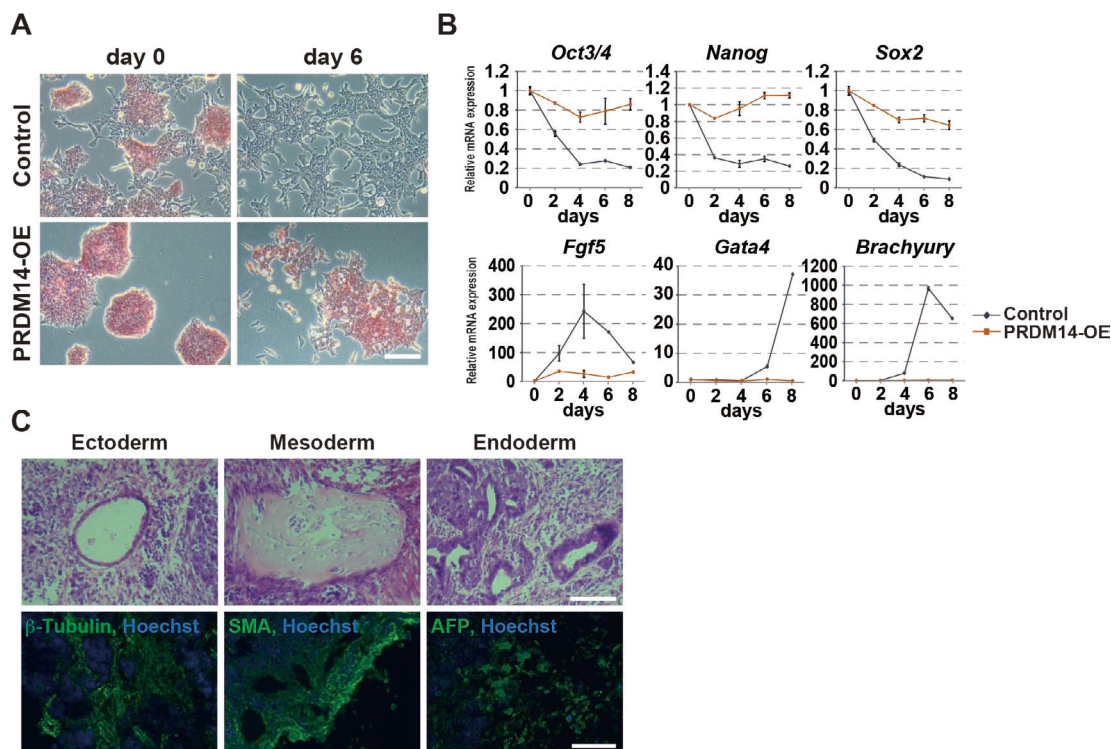


図1. PRDM14 による LIF 非依存的な ES 細胞の未分化性維持

(A) LIF 除去前及び除去後の野生型 ES 細胞及び PRDM14 高発現 ES 細胞のアルカリフォスファターゼ染色。Scale bar: 50 μ m. PRDM14 を高発現することで LIF 非存在下においても ES 細胞の未分化性が維持されている。(B) LIF 除去後における多能性関連遺伝子及び分化マーカーの発現変化 (qRT-PCR 法)。Error Bar: SD。(C) PRDM14 高発現 ES 細胞を LIF 非添加培地で長期間培養し、ヌードマウスの皮下に移植後 HE 染色及び免疫蛍光染色を行った。Scale bar: 1 mm.

次に PRDM14 による ES 細胞の未分化性維持における能動的脱メチル化反応の役割を解明するために、PRDM14 高発現 ES 細胞においてメチルシトシンの酸化酵素である TET1/TET2 のノックダウンを行い、LIF 非依存的な自己複製活性の検証を行った。その結果、PRDM14 による分化マーカーの発現抑制は維持されていたが、多能性関連遺伝子の発現維持が破綻し、アルカリフォスファターゼ活性が消失した (図 2A-C)。また、この条件における多能性関連遺伝子領域の DNA のメチル化状態を、野生型 ES 細胞と Tet1/Tet2 ノックダウン ES 細胞で比較した。野生型 ES 細胞に PRDM14 を発現させ LIF を除去して培養したところ、多能性関連遺伝子領域のメチル化レベルの上昇は起こらなかったが、Tet1/Tet2 ノックダウン ES 細胞の場合メチル化レベルが上昇することが明らかとなった (図 2D)。メチルシトシンは、TET タンパク質によってカルボキシルシトシンまで酸化された後に、塩基除去修復によって未修飾のシトシンに置き換わることで脱メチル化されることが報告されている⁴⁾。そこで、塩基除去修復経路に関わる分子である APE1 (エンドヌクレアーゼ) 及び PARP (ポリ ADP リボシル基転移酵素) に対する阻害を投与し同様の実験を行った結果、Tet1/Tet2 ノックダウン ES 細胞とほぼ同様の表現型が観察された (図 2E)。

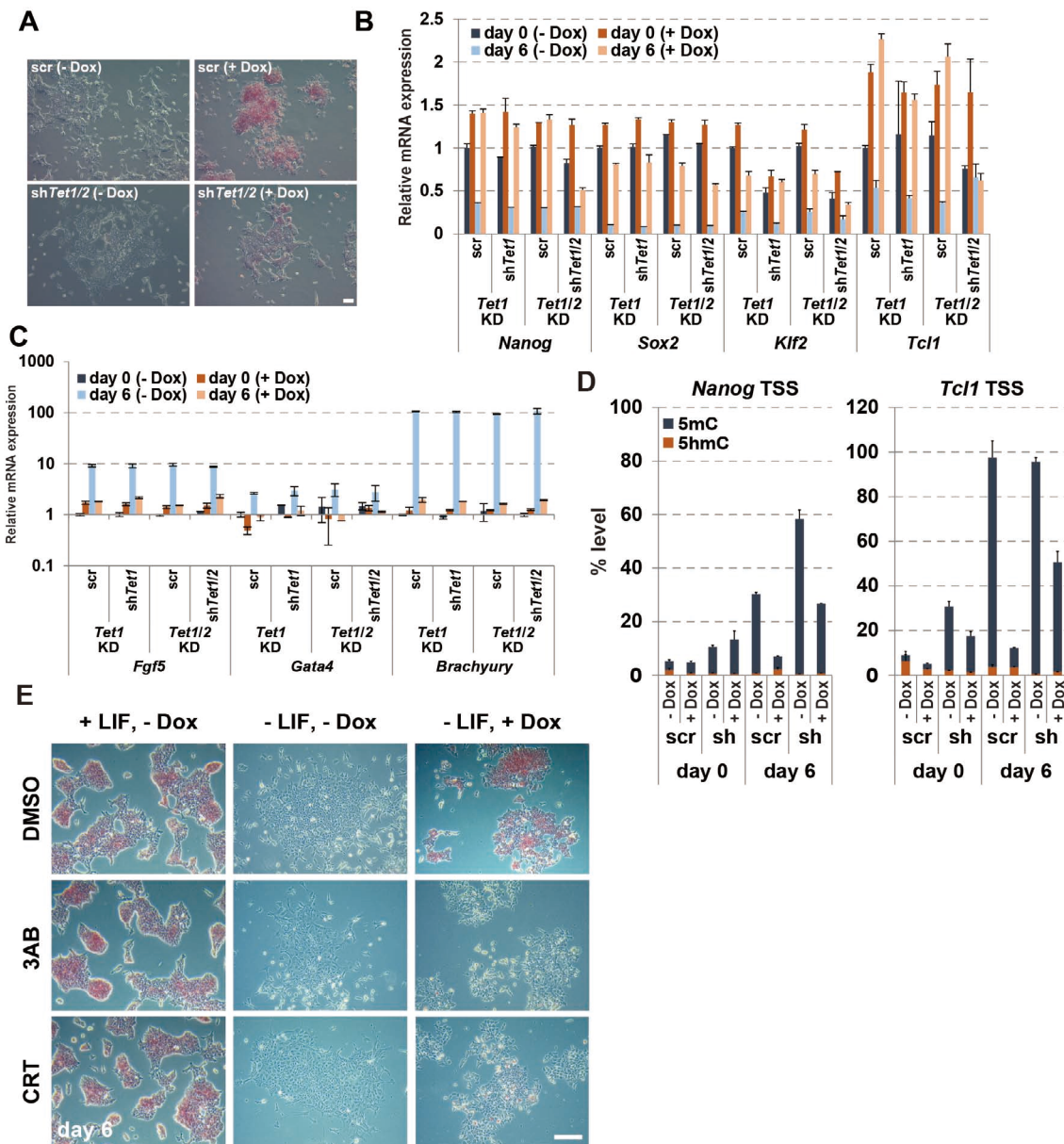


図2. PRDM14によるLIF非依存的なES細胞の未分化性維持におけるTET及び塩基除去修復経路の役割

(A) 野生型ES及びTet1/Tet2ノックダウンES細胞にPRDM14を発現させ、LIF除去前及び除去後のアルカリフォスファターゼ染色。Scale bar: 50 μ m。PRDM14によるES細胞の未分化性維持活性がTet1/Tet2のノックダウンで抑制されている。(B, C) 野生型ES細胞及びTet1/Tet2ノックダウンES細胞にPRDM14を発現させ、LIF除去後における多能性関連遺伝子及び分化マーカーの発現変化 (qRT-PCR法)。Error Bar: SD。(D) (B, C)の条件における多能性関連遺伝子Nanog、Tcl1領域のメチル化解析 (GlucMS-qPCR法)。Error Bar: SD。(E) PRDM14誘導後 (+ドキシサイクリン (Dox)) 塩基除去修復阻害剤 (3-AB及びCRT) を添加し、LIF除去6日間後のアルカリフォスファターゼ染色。Scale bar: 50 μ m。

これらの結果から、PRDM14はTET-塩基除去修復経路を介した能動的脱メチル化反応を促進することで、LIFを除去することにより付加される多能性関連遺伝子領域のメチル化を脱メチル化し、ES細胞の未分化性を維持していると考えられる。

考 察

マウス始原生殖細胞は、多能性関連遺伝子 (Nanog、Sox2 及び Klf2) の発現が消失したエピプラストに PRDM14 が発現することで形成される。ES 細胞では外的シグナルである LIF の働きによって多能性を制御する転写因子ネットワークが安定化されているが、始原生殖細胞では LIF シグナル非依存的にこのネットワークが維持されていることが報告されている⁵⁾。本研究結果から始原生殖細胞では PRDM14 が LIF 非依存的、すなわち内在的な多能性関連遺伝子の発現維持に寄与している可能性を示唆している。一方、マウスと異なりヒト ES 細胞及び始原生殖細胞の前駆細胞であるエピプラストにおいて PRDM14 の発現は高く保たれており、興味深いことにマウスで観察されるような始原生殖細胞特異的な発現上昇は起こらない。このことは、PRDM14 の機能が生殖細胞の形質を獲得するために働いているというよりも、むしろ多能性の獲得及び維持の方に大きく寄与している可能性を示唆しており、今回の我々の研究成果を裏付けている。また、始原生殖細胞の分化不全で発症する胚細胞腫において、PRDM14 の一塩基多型が観察されることも報告されている。したがって、始原生殖細胞が生殖細胞として正常に分化するためには、PRDM14 の発現減少に伴う多能性関連遺伝子の発現抑制が必要な可能性も考えられる。今後、生理条件下における PRDM14 の発現制御機構及びその破綻機構を解明し、胚細胞腫の発症との関係を詳細に解析する必要がある。

共同研究者

本研究の共同研究者は、関西学院大学理工学部生命科学科の岡下修己および阪下奈穂である。

文 献

- 1) Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*. 1992;70(5):841-7. PubMed PMID: 1381289.
- 2) Okashita N, Kumaki Y, Ebi K, Nishi M, Okamoto Y, Nakayama M, et al. PRDM14 promotes active DNA demethylation through the ten-eleven translocation (TET)-mediated base excision repair pathway in embryonic stem cells. *Development*. 2014;141(2):269-80. doi: 10.1242/dev.099622. PubMed PMID: 24335252.
- 3) Okashita N, Sakashita N, Ito K, Mitsuya A, Suwa Y, Seki Y. PRDM14 maintains pluripotency of embryonic stem cells through TET-mediated active DNA demethylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;466(1):138-45. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.122. PubMed PMID: 26325469.
- 4) He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*. 2011;333(6047):1303-7. doi: 10.1126/science.1210944. PubMed PMID: 21817016; PubMed Central PMCID: PMCPCMC3462231.
- 5) Molyneaux KA, Schaible K, Wylie C. GP130, the shared receptor for the LIF/IL6 cytokine family in the mouse, is not required for early germ cell differentiation, but is required cell-autonomously in oocytes for ovulation. *Development*. 2003;130(18):4287-94. PubMed PMID: 12900446.