

2014年度 博士論文要旨

PRDM14による始原生殖細胞特異的なエピゲノム調節とその機能

関西学院大学大学院理工学研究科

生命科学専攻 関研究室 岡下 修己

生殖細胞は特殊化した機能を持つ精子・卵子へ分化するにも関わらず、受精後、次世代の全細胞を生み出せる多能性を有している。近年、多能性幹細胞であるiPS細胞の解析により、多能性を消失した細胞が多能性を再獲得するためには、それを保証する「多能性関連遺伝子の発現誘導」と「エピゲノム情報の再編成」が重要であることが明らかとなった。生殖細胞の起源である始原生殖細胞(PGC)は中胚葉への分化誘導を受けた多能性を保証する転写因子群(多能性関連遺伝子)陰性のエピプラストから出現した後、多能性関連遺伝子を誘導し、潜在的な多能性を獲得する。遺伝子欠損マウスの解析から、PGC特異的に発現する転写因子PRDM14がPGC形成過程で起こる潜在的な多能性の獲得とゲノムワイドなエピゲノム情報の再編成(DNA脱メチル化)に必須であることが明らかとなった。しかし、PRDM14によるそれらの制御機構は未解明のままであった。本研究はPRDM14による(1)DNA脱メチル化機構と(2, 3)多能性獲得・維持機構の解明を目的とし、PRDM14によるDNA脱メチル化と多能性制御の関係を分子レベルで検証した。

(1) PRDM14による脱メチル化機構の解明

PRDM14は新規DNAメチル化酵素である*Dnmt3b*の転写を直接抑制することが明らかとなっていた。しかし、*Dnmt3b*欠損ES細胞にPRM14を高発現させるとDNAの脱メチル化が促進されることから、PRDM14は*Dnmt3b*の転写抑制だけでなく、別の経路も介してDNA脱メチル化を誘導している可能性が示唆された。近年、ヒドロキシメチル化酵素であるTETファミリーを介した能動的DNA脱メチル化機構の存在が明らかになったことから、PRDM14によるDNA脱メチル化にTETを介した能動的DNA脱メチル化機構が関与しているのか解析を行った。ES細胞にPRDM14を発現誘導したところ、PRDM14の発現上昇に伴い、生殖細胞特異的遺伝子、多能性関連遺伝子、ゲノム刷り込み遺伝子領域において速やかなメチル化シトシンの減少及び一過的なヒドロキシメチル化シトシンの上昇が観察された。さらに、PRDM14によるDNA脱メ

チル化は*Tet1/Tet2*をノックダウンしたES細胞において抑制されていたことから、PRDM14は*Dnmt3b*の転写抑制だけでなく、TET1/TET2を介した能動的DNA脱メチル化経路を促進することで脱メチル化を行っていることが明らかになった。

(2) PRDM14による多能性維持機構の解明

マウスES(mES)細胞の多能性及び未分化性はサイトカインである白血病阻止因子(LIF)による多能性関連遺伝子ネットワークの維持により保証されている。mES細胞をLIF非存在下で培養すると、多能性関連遺伝子ネットワークが維持できなくなり、mES細胞は分化する。mES細胞に始生殖細胞と同等の*Prdm14*を発現させ、LIF非存在下で培養したところ、*Klf2*、*Nanog*など多くの多能性関連遺伝子の発現が高く維持されており、長期にわたりES細胞としての性質を維持することができた。一方、*Tet1/Tet2*をノックダウンまたは能動的DNA脱メチル化経路において重要な役割を果たす塩基除去修復(BER)を阻害することで、PRDM14による多能性維持が観察できなくなった。以上の結果より、PRDM14は多能性関連遺伝子の発現を維持することでLIF非依存的にES細胞の多能性を維持しており、PRDM14による多能性維持には、TET1/TET2-BER経路を介した能動的DNA脱メチル化が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、その多能性維持に関わるPRDM14の機能領域を解析したところ、PRDM14のN末端領域及びPRドメインが重要であることも明らかとなった。

(3) PRDM14による多能性獲得機構の解明

ES細胞はActivin、bFGF存在下での培養によりエピブラスト様細胞(EpiLC)に分化させることができる。この多能性を消失したEpiLCにPRDM14を発現誘導したところ、*Klf2*、*Nanog*など多くの多能性関連遺伝子の発現上昇と分化関連遺伝子の発現減少が観察された。さらにPRDM14を発現誘導したEpiLCをES細胞培養条件下に移した結果、PRDM14を発現していない場合に比べES細胞様のコロニーが多く観察された。以上の結果より、PRDM14は多能性関連遺伝子の発現を誘導することでES細胞への脱分化を行っている可能性が示唆された。また、TET1/TET2はPRDM14による多能性関連遺伝子の発現誘導にも関わっており、*Tet1/Tet2*をノックダウンしたEpiLCではPRDM14によるES細胞への脱分化が阻害されたことから、TET1/TET2はPRDM14による潜在的な多能性獲得にも重要な役割を果たしていることが明らかとなった。