

令和 元年 9 月 9 日現在

機関番号：34504

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2015～2018

課題番号：15KK0262

研究課題名（和文）PRDM14による塩基除去修復を介した能動的脱メチル化機構の解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of base excision repaired-mediated DNA demethylation driven by PRDM14 (Fostering Joint International Research)

研究代表者

関 由行 (SEKI, YOSHIYUKI)

関西学院大学・理工学部・准教授

研究者番号：20435655

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,400,000円

渡航期間：7ヶ月

研究成果の概要（和文）：多能性幹細胞から始原生殖細胞（精子・卵の元になる細胞）への誘導機構の解明は、生殖補助医療や絶滅危惧種の保全などに繋がる極めて重要な研究である。本研究ではマウスの始原生殖細胞形成に必須の遺伝子であるPrdm14が進化的にいつゲノムに出現し、生殖細胞形成プログラムに挿入されたのかを解明することを目的に研究を行なった。その結果、Prdm14は原始的な2胚葉性動物（イソギンチャク）のゲノムから存在し、非羊膜類では運動ニューロンで使われていたが、羊膜類の出現前後に生殖細胞で使い回された可能性を発見した。現在、多能性細胞で使い回された分子の経緯、その生物学的意義の解明を行なっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多能性幹細胞から始原生殖細胞（精子・卵の元になる細胞）への誘導機構の解明は、生殖補助医療や絶滅危惧種の保全などに繋がる極めて重要な研究である。近年、これまで研究の蓄積があるマウスの知見とヒト生殖細胞形成機構が異なる可能性が指摘され始めている。今回、アホロートル胚におけるPRDM14の機能解析を行い、マウスよりもヒトでの機能に近いことが明らかとなった。したがって、今後、マウスとヒト間で保存されておらず、ヒトのみに存在する分子カスケードをアホロートル胚を用いて解析することで、ヒトの生殖補助医療に応用できる可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The study of the molecular mechanisms for the specification of germ cell fate from pluripotent stem cells is important to apply for assisted reproductive technology and the maintenance of endangered species. In this study, we searched the phylogenetic distribution of Prdm14, which is critical for the germ cell specification in mice, and tried to uncover the molecular evolution and expression pattern in early embryo among deuterostomes. In these results, we elucidated that Prdm14 existed at the genome of sea anemone, which is diploblastic organism and is distributed widely in deuterostomes. Furthermore, Prdm14 is expressed in motor neuron of amphioxus and zebrafish embryo, which suggest that Prdm14 is co-opted from motor neuron to pluripotent cells and primordial germ cells at around the emergence of amniotes during vertebrate evolution. We are trying to identify molecular mechanism of co-option and biological significances.

研究分野：進化発生生物学

キーワード：生殖細胞 有尾両生類 分子進化

## 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物は、個体の恒常性を維持する体細胞と次世代へ遺伝情報を伝達する生殖細胞の大きく分けると2種の細胞群によって構成されている。生殖細胞の決定様式には、受精卵の段階で生殖細胞の決定因子が非対称に分布し（生殖顆粒）、この生殖顆粒を取り込んだ細胞が生殖細胞へと分化する様式（Preformation）と一度体細胞と生殖細胞の両方に分化できる多能性細胞を形成し、この多能性細胞の中から外的因子を受け取った細胞が生殖細胞へと分化する様式（Epigenesis）が存在する。本研究開始当初我々のグループは、マウスの始原生殖細胞特異的に発現し、かつ始原生殖細胞の形成に必須の転写因子 PRDM14 の機能解析を行っていた。その過程で、PRDM14 はシトシンのメチル化を酸化酵素である TET タンパク質を標的遺伝子領域にリクルートすることで、能動的脱メチル化反応を促進することを明らかにしていた。また、マウスにおいて PRDM14 は生殖細胞特異的な発現を示すが、ヒトやサル胚を用いた解析結果では、始原生殖細胞よりその前駆細胞であるエピプラストで高発現していることが示され、マウスで観察される始原生殖細胞特異的な PRDM14 の機能はげっ歯類特有の現象の可能性が考えられていた。

## 2. 研究の目的

上記のような背景から、後生動物における PRDM14 の発現様式・制御機構及び分子機能の進化比較解析を行うことで、転写因子 PRDM14 が多能性細胞及び生殖系列で用いられるようになった進化的経緯及びその分子メカニズムの解明を目指した。具体的に研究項目は以下に挙げる通りである。

- (1) 後口動物における PRDM14 の発現比較及び分子進化解析
- (2) げっ歯類及びヒトにおける PRDM14 の発現制御機構の解明とその比較
- (3) 有尾両生類における *Prdm14* の発現及び機能解析

## 3. 研究の方法

- (1) 後口動物における PRDM14 の発現比較及び分子進化解析

*Prdm14* をノックアウトしたマウス ES 細胞にウニ、ナメクジウオ、ゼブラフィッシュ PRDM14 オルソログを発現させ、マウス PRDM14 の機能を補完できるか否か検証した。ナメクジウオ胚における *Prdm14* の発現パターンを *in situ* hybridization 法により解析した。

- (2) げっ歯類及びヒトにおける PRDM14 の発現制御機構の解明とその比較

公開 ChIP-Seq データを用いてヒト iPS 細胞及びマウス ES 細胞における PRDM14 のエンハンサー候補領域を同定し、CRISPR/CAS9 システムを用いたシス破壊実験でその機能を解析した。

- (3) 有尾両生類における *Prdm14* の発現及び機能解析

有尾両生類の実験は、イベリアトゲイモリとアホロートルの2種を用いて行った。*Prdm14* の発現解析に関しては、イベリアトゲイモリ胚の各ステージの mRNA を回収し、qRT-PCR を行った。*Prdm14* の機能解析に関しては、アホロートルを用いたモルフォリノアンチセンス実験を行った。

## 4. 研究成果

- (1) 後口動物における PRDM14 の発現比較及び分子進化解析

マウスにおいて転写因子 PRDM14 はパートナー分子である CBFA2T と複合体を形成することで、ES 細胞の多能性を維持している。そこで、マウス PRDM14 の多能性維持機能が進化的にどの段階で獲得されたのかを検証するため、まず後生動物のゲノムデータベースを活用し、*Prdm14* 遺伝子の系統分布を調べた。その結果、二胚葉性のイソギンチャク、サンゴ（刺胞動物）からその存在が確認され、後口動物全般に分布していた。次に、マウス *Prdm14* ノックアウト ES 細胞にウニ、ナメクジウオ、ゼブラフィッシュ PRDM14 オルソログを強制発現し、ES 細胞の未分化性維持活性を測定した。その結果、ウニ PRDM14 のみマウス PRDM14 の機能補完活性が観察されなかった。そこで、マウス PRDM14 の複合体パートナーである CBFA2T2 のウニオルソログをウニ PRDM14 と共発現したところ、マウス PRDM14-CBFA2T の機能を完全に補完することができた。したがって、PRDM14 は CBFA2T と分子共進化しながら、機能を発揮している可能性が推測できる。次に、ナメクジウオ胚における *Prdm14* の発現解析を行った。その結果、予想外にも生殖系列での発現は観察されず、運動ニューロンで発現していることが明らかとなった。*Prdm14* の運動ニューロンでの発現はゼブラフィッシュでも保存されていることから、四肢動物の出現前後に運動ニューロンから多能性・生殖細胞に「転用」された可能性が考えられる。

- (2) マウス及びヒトにおける PRDM14 の発現制御機構の解明とその比較

マウスでは、内部細胞塊で一過的に *Prdm14* は発現するがその後エピプラストへ分化する過程で発現は消失し、始原生殖細胞形成過程で再び活性化される。一方でヒト、サル及びブタにおいて、PRDM14 は ICM からエピプラストで継続的に発現しており、系統的に離れた霊長類と鯨偶蹄類でその発現パターンが保存されていることから、エピプラストでの継続的な発現が哺乳類全般で保存されており、げっ歯類特異的にエピプラストでの発現が消失した可能性が考えられる。

られる。

そこで、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞を用いて *Prdm14* のシス解析及びシス種間比較解析を行った。まず、公開 ChIP-Seq データを元にマウス ES 細胞及びヒト ES 細胞における *Prdm14* のエンハンサー候補領域の同定を行った。ヒト ES 細胞には羊膜類で配列が保存されている 1 つの領域にエンハンサーマークである H3K27Ac の集積が観察されたが、マウス ES 細胞では羊膜類で保存されている領域とは別にげっ歯類特異的領域 2 つに H3K27Ac の集積が観察された。次にマウス ES 細胞を用いて、羊膜類で保存されている領域とげっ歯類特異的領域を CRISPR/Cas9 によって欠損させ、*Prdm14* の発現に対する影響を解析した。その結果、興味深いことに単独のシス破壊ではげっ歯類特異的領域の欠損により *Prdm14* の発現が顕著に減少し、羊膜類で保存されている領域の破壊による影響は観察されなかった。また、羊膜類で保存されている領域とげっ歯類特異的領域の 2 重欠損によって *Prdm14* のさらなる発現減少が観察された。このことから、げっ歯類の進化過程でげっ歯類特異的なシス領域の挿入によって、羊膜類で保存されている領域からシス領域が進化的に移動したのではないかと考えられる。

次に、げっ歯類特異的シス領域内の転写因子の認識配列を検索したところ、初期 ICM で一過的に発現する転写因子 TF<sub>CP2L1</sub> の認識配列が存在した。そこで、この認識配列を CRISPR/Cas9 で削ったところ、PRDM14 の発現が減少した。また、マウス ES 細胞に外来的に *Prdm14* を発現させると、内在性 *Prdm14* の発現が減少するネガティブフィードバックが観察される。げっ歯類特異的領域内には PRDM14 の認識配列も存在したため、この認識配列を欠損させたところ、TF<sub>CP2L1</sub> の場合とは逆に *Prdm14* の発現が上昇した。

次に、羊膜類で保存されているシス領域内の転写因子認識配列を検索したところ、多能性細胞のマスター遺伝子である OCT4 (POU5F1) と SOX2 の認識配列の存在が確認できた。そこで、この領域の DNA 断片をルシフェラーゼベクターに挿入し、OCT4\_SOX2 配列に変異を入れたところ、ルシフェラーゼ活性が顕著に減少した。

これらの結果を合わせて考察すると、羊膜類の出現時期に *Prdm14* の遺伝子領域内に OCT4/SOX2 の認識配列を含むシス領域が出現したことで、多能性細胞で OCT4/SOX2 の下流に挿入され、多能性細胞で発現するようになった可能性が考えられる。さらに、げっ歯類と霊長類の共通祖先からげっ歯類に進化する過程で、げっ歯類特異的なシスエレメントが出現し、PRDM14 の発現が OCT4/SOX2 の制御から OCT4/SOX2/TF<sub>CP2L1</sub> に変化したことで、エピブラストでの発現を消失したのではないかと推測している。

### (3) 有尾両生類における *Prdm14* の発現及び機能解析

イベリアトゲイモリ初期胚の各ステージから mRNA を回収し、*Prdm14* の発現変動を qRT-PCR で解析した。その結果、マウスやヒトとは異なり未受精卵の段階から発現しており、胚性ゲノム活性化 (ZGA) が起きる時期に発現が上昇し、原腸陥入後期から発現が消失していくことが明らかとなった。次に *Prdm14* の機能解析を行うために、アホロートル胚を用いたモルフォリノノックダウン実験を行った。その結果、始原生殖細胞、生殖巣を含む後極腹側中胚葉組織が全欠損することが明らかとなった。アホロートルでは、多能性細胞から始原生殖細胞が直接誘導されるのではなく、ヒトと同様に中胚葉と多能性の両方の性質を持った「中胚葉性多能性細胞」から始原生殖細胞が誘導される。したがって、アホロートルでは始原生殖細胞形成ではなく、「中胚葉性多能性細胞」の誘導・維持に *Prdm14* が関与している可能性が考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kawaguchi M, Sugiyama K, Matsubara K, Lin CY, Kuraku S, Hashimoto S, Suwa Y, Yong LW, Takino K, Higashida S, Kawamura D, Yu JK, Seki Y, Co-option of the PRDM14-CBFA2T complex from motor neurons to pluripotent cells during vertebrate evolution., *Development*, 146(2), 2019, 1-14

Seki Y, PRDM14 Is a Unique Epigenetic Regulator Stabilizing Transcriptional Networks for Pluripotency., *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6(12), 2018, 1-5

Okashita, N., Suwa Y., Nishimura O., Sakashita N., Kadota M., Nagamatsu G., Kawaguchi M., Kashida H., Nakajima A., Tachibana M., Seki Y, PRDM14 drives OCT3/4 recruitment via active demethylation in the transition from primed to naïve pluripotency, *Stem Cell Reports* 7(6) 1072-1086, 2016, 1-15

〔学会発表〕(計8件)

関 由行、多能性ネットワークの起源と変容、第41回日本分子生物学会年会、2018年

Yoshiyuki Seki, CtBP1/2 is a gatekeeper for ground state pluripotency and totipotency, EMBO Workshop From epigenome towards epitranscriptome in cell fate choice, 2018年

関 由行、多能性ネットワークの起源と変容、日本遺伝学会第90回大会、2018年

関 由行、後口動物における多能性ネットワークの進化的起源と変容、第12回日本エピジェネティクス研究会、2018年

関 由行、後口動物における多能性ネットワークの進化的起源と変容、日本遺伝学会第89回大会、2017年

Yoshiyuki Seki, An evolutionarily conserved function of PRDM14 for the maintenance of pluripotency in deuterostome. Gordon Research Conference, Germinal Stem Cell Biology, 2017年

関 由行、始原生殖細胞によるエピゲノムリプログラミング機構の解明とその人為的制御、第11回日本エピジェネティクス研究会、2017年

関 由行、生殖細胞形成の動物種を超えた共通原理と種特異性、発生生物学会秋季シンポジウム、2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計1件)

名称：DNA脱メチル化誘導法及びその用途

発明者：関 由行

権利者：関西学院大学

種類：特許

番号：第6161261号

取得年：2017年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

[https://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/d\\_biomed/index.html](https://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/d_biomed/index.html)

## 6. 研究組織

研究協力者

アンドリュー ジョンソン(ノッティンガム大学)

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：アンドリュー ジョンソン

ローマ字氏名：Andrew Johnson

所属研究機関名：ノッティンガム大学

部局名：生命科学部

職名：教授

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。