

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：34504

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24681040

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

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism for base excision repair pathway-mediated active demethylation by PRDM14

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) 20,600,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物において、生殖細胞は次の世代を再生産できる唯一の細胞であり、その能力は分化全能性と呼ばれている。生殖細胞が分化全能性を発揮するためには、遺伝情報の付箋紙の役割を担う化学修飾(エピゲノム)を消去する必要がある。本研究では、生殖細胞特有のタンパク質であるPRDM14によるDNAの脱メチル化機構とその生理機能解明を行った。その結果、PRDM14がメチルシトシンの代謝反応を活性化することで、塩基除去修復を介した脱メチル化反応を促進すること、またこの能動的脱メチル化反応を介して、山中因子の一つであるOCT3/4の標的遺伝子への結合を促進し、分化型細胞の脱分化を誘導することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Germline cells are sole source of next generation in multicellular organism, which is called cellular totipotency. Germ cells erase genome-wide DNA methylation and histone modifications to acquire cellular totipotency during their development. In this study, we have tried to identify the molecular mechanisms and biological significance of base excision repair-mediated active demethylation by PRDM14. We have shown that PRDM14 regulates the activity of TET proteins to promotes active DNA demethylation in embryonic stem cells (ESCs). We have further demonstrated that PRDM14 converts epiblast-like cells (EpiLCs) to ESCs mediated by the enhancement of OCT3/4-binding at target locus through active DNA demethylation.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：多能性幹細胞 初期化 生殖細胞 再生医学

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞が持つ次世代を再生する能力(分化全能性)を制御する分子基盤の解明は、基礎生物学分野のみならず再生医学分野においても極めて重要な課題である。この生殖細胞による分化全能性の獲得において、ゲノムに対する後天的な化学修飾であるエピゲノムの再編成が中心的な役割を担うが、「いつ」「どのように」エピゲノムが再編成されるのかについて、研究開始当時は明らかになっていなかった。これはエピゲノムが再編成を受ける始原生殖細胞が少数かつ胎児期に一過的に存在するため、エピゲノム制御に関わる因子の階層性を高解像度で明らかにすることが実験的に困難であったためだと考えられる。

2. 研究の目的

生殖系列の成立に重要な転写因子 PRDM14 は、遺伝子破壊解析を用いた一連の研究によって、始原生殖細胞の形成及び ES 細胞の樹立に必須の機能を有していることが明らかとなっていた。しかしながら、PRDM14 の分子機能は研究開始当時ほとんど明らかになっていなかった。研究代表者は、研究開始当時 PRDM14 に DNA 脱メチル化誘導活性が存在することを示す研究結果を得ており、本研究提案では、PRDM14 による DNA 脱メチル化誘導に関わる詳細な分子機構とその生理的役割を解明することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

ドキシサイクリンの添加によって PRDM14 の発現を誘導できる ES 細胞を作製し、PRDM14 誘導後に脱メチル化される領域を MeDIP-seq により同定した。また、shRNA や阻害剤を用いて TET タンパク質及び塩基除去修復経路に関わるタンパク質の機能阻害を行い、PRDM14 による脱メチル化経路の同定を行った。

PRDM14 による DNA 脱メチル化誘導が持つ生理機能を同定するために、PRDM14 を高発現した ES 細胞を未分化性維持に関与するサイトカイン LIF 非存在下で培養し、ES 細胞の自己複製活性を測定した。

また、PRDM14 は生体内において胎生 6.5 日胚のエピプラストで発現し、始原生殖細胞への形成に関わることから、ES 細胞を *in vitro* でエピプラスト様細胞 (EpiL 細胞) へ分化誘導した後に、ドキシサイクリンの添加により PRDM14 誘導的に発現させ、*in vivo* における PRDM14 の機能を *in vitro* で再現した。

4. 研究成果

マウス ES 細胞における PRDM14 の発現量は極めて低く、始原生殖細胞では ES 細胞の数十倍の発現が観察される。そこで、ES 細胞において始原生殖細胞で観察される

PRDM14 の発現量をドキシサイクリンの添加依存的に誘導発現を行った。その結果、始原生殖細胞特異的に脱メチル化を受ける生殖細胞特異的遺伝子領域の脱メチル化が観察された。DNA の脱メチル化様式には、DNA 複製に依存して希釈される受動的脱メチル化とメチルシトシンの酸化を経て能動的に脱メチル化される 2 つの経路が存在する。そこで、PRDM14 による DNA 脱メチル化誘導がどちらの経路で起こっているか否か検証するために、DNA 複製の阻害、及びメチルシトシンの酸化経路の阻害実験(塩基除去修復経路の阻害剤及びメチルシトシンの酸化酵素 TET に対するロックダウン実験)を行った。その結果、PRDM14 はメチルシトシンの酸化酵素である TET タンパク質と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を明らかにした (Okashita et al., Development, 141, 269-280, 2014) (図 1)。

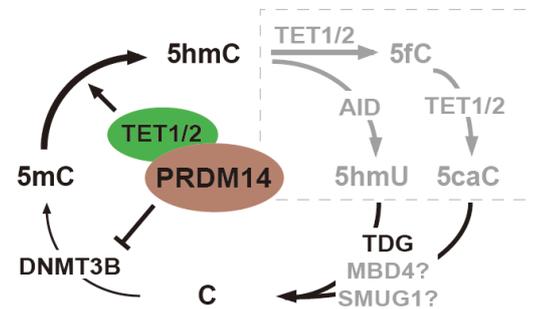


図 1. PRDM14 による脱メチル化誘導 (モデル図)

さらに、PRDM14 による能動的脱メチル化反応と ES 細胞の自己複製に関する研究を行った。マウス ES 細胞は、LIF の添加により自己複製を維持することができるが、PRDM14 を始原生殖細胞と同レベル発現した ES 細胞は LIF 非依存的な自己複製活性を獲得することを明らかにした。興味深いことにこの PRDM14 による LIF 非依存的 ES 細胞の自己複製活性は、ES 細胞で観察される内在性の PRDM14 の発現レベルでは不十分であり、始原生殖細胞での発現レベルで初めて獲得されることも明らかとなった。さらに、PRDM14 高発現による ES 細胞の LIF 非依存的自己複製活性は、能動的脱メチル化反応の阻害により消失したことから、PRDM14 は能動的脱メチル化反応を介して、多能性を制御する転写因子ネットワークを安定化している可能性が考えられる (Okashita et al., BBRC, 466(1), 138-145)。

上記に挙げる研究はすべて ES 細胞で PRDM14 を高発現させた実験を用いている。一方で、生体内において PRDM14 はエピプラストで発現することで始原生殖細胞への分化を誘導する。そこで、ES 細胞からエピプラスト様細胞 (EpiL 細胞) へ分化誘導した後に PRDM14 を誘導的に発現させ、その後

の細胞の性質の変化をモニターした。EpiL細胞に PRDM14 を発現させると、驚くべきことに ES 細胞様の細胞へ形態が変化し、網羅的な遺伝子発現パターンをマイクロアレイで解析したところ、ES 細胞と類似した遺伝子発現パターンを示した。さらに、この脱分化した ES 細胞様細胞をヌードマウスの皮下に移植したところ、3 胚葉への分化が観察されたことから、PRDM14 は EpiL 細胞を ES 細胞へ脱分化する活性を有していることが明らかとなった。次に、PRDM14 による EpiL 細胞から ES 細胞へ脱分化に能動的脱メチル化反応が関与している可能性を阻害剤及びノックダウン法を用いて検証した。その結果、TET タンパク質及び塩基除去修復経路が EpiL 細胞から ES 細胞への脱分化に必要であることが明らかとなった。ES 細胞から EpiL 細胞へ分化する過程で Klf2 などの多能性関連遺伝子の発現が減少し、PRDM14 の発現に伴い発現が上昇する。そこで、PRDM14 による Klf2 の発現誘導機構を詳細に解析したところ、PRDM14 が Klf2 のエンハンサー領域に存在する DNA メチル化を脱メチル化することで、OCT3/4 の結合が促進され、その結果 Klf2 の発現が上昇することを明らかにした。また、このような PRDM14 の結合-脱メチル化-OCT3/4 の結合-転写活性の一連の反応が他の遺伝子領域でも起きている可能性を検証するために、ChIP-seq で解析したところ、Klf2 以外の多くの多能性関連遺伝子の転写制御領域で同様の反応が誘導されることが明らかとなった。これらの結果は現在論文投稿中である。以上の結果から、PRDM14 は始原生殖細胞による潜在的な多能性獲得のマスター調節因子として機能する可能性が考えられる(図 2)。

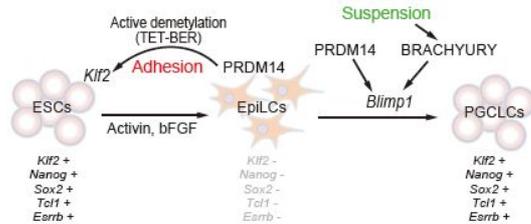


図 2. PRDM14 による脱分化誘導 (モデル図)

PRDM14 は、Klf2、Nanog などの多能性を制御する転写因子の発現が消失したエピプラストに発現し、始原生殖細胞への分化を誘導する。始原生殖細胞では、PRDM14 の発現誘導に伴い多能性関連遺伝子の発現が上昇し、潜在的な多能性を獲得する。今回の研究成果によって、始原生殖細胞の形成過程において PRDM14 が能動的脱メチル化を介して OCT3/4 の標的領域への結合を促進することで、潜在的な多能性を誘導している可能性が強く示唆される。また、この生理環境で誘導されるリプログラミングを、iPS 細胞の誘導などの人為的リプログラミングに応用する

ことで、新規細胞リプログラミング法の開発に繋がることを期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

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.*, 466(1) 138-45, 2015
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.122.

Okashita, N., Kumaki, Y., Ebi, K., Nishi, M., Okamoto, Y., Nakayama, M., Hashimoto, S., Nakamura, T., Sugawara, K., Kojima, N., Takada, T., Okano, M. and Seki, Y., PRDM14 promotes active DNA demethylation through the Ten-eleven translocation (TET)-mediated base excision repair pathway., *Development*, 141(2):269-80, 2014
doi: 10.1242/dev.099622.

Seki, Y. and Okashita, N., Epigenetic reprogramming in primordial germ cells in mice., *Journal of Mammalian Ova Research*, 30 (No.3), 2013
doi: 10.1274/jmor.30.95.

Ohno, R., Nakayama, M., Naruse., Okashita, N., Takano, O., Tachibana, M., Asano, M., Saitou, M. and Seki, Y., A replication-dependent passive mechanism modulates DNA demethylation in mouse primordial germ cells., *Development*, 140 (14):2892-903, 2013
doi: 10.1242/dev.093229.

Seki, Y., Serum-mediated transgenerational effects on sperm – evidence for Lamarckian inheritance? *Hepatology*, 57 (4):1663-5, 2013
doi: 10.1002/hep.26240.

Nakashima, H., Kimura, T., Kaga, Y., Nakatani, Y., Seki, Y., Nakamura, T. and *Nakano, T., Effects of Dppa3 on DNA methylation dynamics during primordial germ cell development in mice., *Biology of Reproduction*, 88 (5), 125:1-9, 2013
doi: 10.1095/biolreprod.112.105932.

[学会発表](計 15 件)

川口真範、橋本翔太、阪下奈穂、東田将大、河村大輔、大淵将克、諏訪喜昭、関由行、PRDM14 の分子進化解析に基づい

た機能ドメインの探索、第38回日本分子生物学会年会、神戸、日本、平成27年12月3日

中島絢香、岡下修己、谷直紀、中村輝、関由行、生殖系列の成立に重要な因子PRDM14の複合体成分の同定と機能解析、第38回日本分子生物学会年会、神戸、日本、平成27年12月3日

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、第108回日本繁殖生物学会大会、宮崎、日本、平成27年9月20日

関由行、PRDM14による能動的脱メチル化を介した多能性獲得機構の解明、第9回日本エピジェネティクス研究会年会、東京、日本、平成27年5月25日

阪下 奈穂、岡下修己、関由行、生殖系列の成立に重要なPRDM14の機能ドメインの同定、第37回日本分子生物学会年会、横浜、日本、平成26年11月25日

関由行、PRDM14による能動的脱メチル化を介した多能性獲得機構の解明、第32回日本受精着床学会総会、東京、日本、平成26年7月27日

Nakamura J., and Seki Y., PRDM14 promotes naïve pluripotency through TET-BER-mediated active demethylation., 47th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental biologists. 名古屋、日本、平成26年5月27日

Hashimoto S., and Seki Y., Conserved roles of PRDM14 orthologues in DNA demethylation and pluripotency in embryonic stem cells., 47th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental biologists. 名古屋、日本、平成26年5月27日

Seki Y., PRDM14 promotes active DNA demethylation through the TET-BER-mediated base excision repair pathway., 47th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental biologists. 名古屋、日本、平成26年5月28日

関由行、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、第8回日本エピジェネティクス研究会年会、東京、日本、平成26年5月26日

Seki Y., PRDM14 promotes active DNA

demethylation through the base excision repair pathway., Gordon Research Conference, Germinal Stem Cell Biology, Hong Kong, China, 平成25年7月16日

平野玄、蔵本梨絵、浦聖恵、関由行、始原生殖細胞特異的なDnmt3bの転写抑制機構の解明とその機能解析、第35回日本分子生物学会年会、福岡、日本、平成24年12月12日

Seki, Y., PRDM14 promotes active DNA demethylation through base excision repair pathway in embryonic stem cells., The 58th/60th NIBB Conference, Germline-Specification, Sex, and Stem cells- Okazaki, Japan, 平成24年7月18日

Seki, Y., PRDM14 promotes active DNA demethylation through base excision repair pathway in embryonic stem cells., Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, Kobe, Japan, 平成24年5月31日

関由行、PRDM14による塩基除去修復を介したDNA脱メチル化機構の解明、第6回日本エピジェネティクス研究会年会、東京、日本、平成24年5月15日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~seki/Seki_Lab_.html

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

