

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02422

研究課題名（和文）多能性細胞から生殖細胞への変換を制御する遺伝子ネットワークの進化的起源と変容

研究課題名（英文）Evolutional origin and transformation of transcriptional networks for the conversion from pluripotent cells into primordial germ cells

研究代表者

関 由行 (SEKI, YOSHIYUKI)

関西学院大学・生命環境学部・教授

研究者番号：20435655

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,000,000円

研究成果の概要（和文）：多細胞生物では、発生初期に生殖細胞を含む体を構成するすべての細胞を作り出すことができる多能性細胞が出現する。本研究では、多能性細胞から生殖細胞への分化を制御する転写因子ネットワークの種間比較を行った。まず、マウスにおいて始原生殖細胞の形成に必須の遺伝子であるPrdm14のイモリ胚における機能解析を行ったところ、マウスとは異なり初期発生に必須であることが分かった。また、ヒト多能性幹細胞から始原生殖細胞形成過程においては、一過的なPrdm14の発現抑制が始原生殖細胞形成に必要なことも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多能性細胞の成立・維持及び始原生殖細胞形成を制御する転写因子ネットワークにはマウスとヒトで保存されていない構成成分が多く存在する。本研究において、転写因子PRDM14がイモリにおいて初期発生に重要であることが明らかとなったため、四肢動物全般においてPRDM14は初期発生に重要である可能性及びマウス特異的に重要性が消失した可能性が考えられる。また、多能性幹細胞は哺乳類のみで樹立が成功しているが、本研究の成果は、有尾両生類の多能性幹細胞の樹立に繋がる可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The pluripotent cells are established in the early embryo during the development of multicellular organisms. In this study, we tried to compare the transcriptional networks for converting from pluripotent cells into primordial germ cells. We provided evidence that Prdm14, an essential factor for germ cell specification in mice, is critical for the early development of newt embryos. Furthermore, we identified that the transient downregulation of PRDM14 expression is vital for human germ cell specification.

研究分野：発生生物学

キーワード：多能性幹細胞 生殖細胞 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞の形成様式には、受精卵の段階で生殖細胞決定因子が非対称に局在する“Preformation”と呼ばれる様式と、発生初期に体細胞と生殖細胞の両方に分化できる多能性細胞を一旦作り、この多能性細胞から外的シグナルによって生殖細胞が選別される“Epigenesis”と呼ばれる様式の2つが存在する。研究開始当初、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエル及びマウスなどのいわゆる「モデル生物」を用いて、生殖細胞形成機構に関する研究が精力的に行われていたが、生殖細胞形成に必要な種を超えた共通原理の抽出には至っていなかった。何故か？研究代表者は、マウス以外のモデル生物が“Preformation”によって生殖細胞を形成することが一つの要因であると考え、生殖細胞形成機構の種を超えた共通原理を探索するために、“Epigenesis”で生殖細胞を形成する生物を用いた種間比較解析を行った。

2. 研究の目的

多能性細胞の成立に必要な転写因子ネットワークの「祖先型」とは？祖先型転写因子ネットワークが進化的にどのように変化したのか？また、ヒト多能性細胞から始原生殖細胞への変換を制御する転写因子ネットワークとは？この3つ問いを明らかにすべく、主に以下の3つ研究項目を遂行した。

- (1) 多能性の成立に必要な転写因子ネットワークの進化的起源と変容
- (2) 運動ニューロンから生殖系列へのPRDM14の発現様式の変化とその影響
- (3) ヒト多能性細胞から始原生殖細胞への変換を制御する転写因子ネットワークの同定

3. 研究の方法

- (1) 多能性の成立に必要な転写因子ネットワークの進化的起源と変容

四肢動物の祖先的形質をもつ有尾両生類イベリアトゲイモリを用いて哺乳類の多能性ネットワークのハブ転写因子である POU5F1 と多能性ネットワークの周辺に位置する転写因子 PRDM14 のイモリオーソログの発現（定量的 RT-PCR）及び機能解析（アンチセンスモルフォリノ）を行った。

- (2) 運動ニューロンから生殖系列へのPRDM14の発現様式の変化とその影響

イベリアトゲイモリにおける *Prdm14* の発現を定量的 RT-PCR 及び *in situ* hybridization を用いて解析した。また、マウス特異的な着床期エピブラストにおける *Prdm14* の発現消失機構を解析するために、ネズミ上科及びネズミ科特異的なシス領域を CRISPR/Cas9 システムで人為的に改変し、*Prdm14* の発現に与える影響を解析した。

- (3) ヒト多能性細胞から始原生殖細胞への変換を制御する転写因子ネットワークの同定

ヒト多能性幹細胞から始原生殖細胞形成過程における転写因子 *PRDM14* の発現消失の機能解析を行なった。具体的な方法としては、ドキシサイクリンで *PRDM14* の発現制御可能なヒト iPS 細胞を用いて、遺伝子発現変化及び始原生殖細胞への分化誘導効率を測定・比較した。

4. 研究成果

- (1) 多能性の成立に必要な転写因子ネットワークの進化的起源と変容

イベリアトゲイモリの多能性関連遺伝子の配列情報をアホロートルオーソログの配列情報を元に、イベリアトゲイモリのゲノム情報ポータルサイト iNewt を用いてイベリアトゲイモリ多能性関連遺伝子の mRNA 情報を取得した。この配列情報を用いて、イベリアトゲイモリ胚発生における多能性関連遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR で解析した。その結果、マウスとは異なり、*Prdm14* は未受精卵に蓄積しており、神経胚期前後までに発現が維持され、その後発現が完全に消失した。また、*Pou5f1* はイモリでは共通祖先遺伝子が遺伝子重複で出現したと考えられる *Pou5f1* と *Pou5f3* が存在する。*Pou5f1* は *Prdm14* と同様の発現パターンを示し、*Pou5f3* は *Nanog* や *Sox2* と同様に胚性ゲノム活性化が起こる、ステージ 8 付近に発現上昇が観察された。次に、*Prdm14* と *Pou5f1/3* のノックダウン実験を行なった。*Prdm14* ノックダウン胚は神経胚期前後に発生が完全

に停止したことから、始原生殖細胞特異的表現系を示すマウスとは異なり、イペリアトゲイモリにおいて*Prdm14*は初期発生に重要であることが明らかとなった(図1)。また、*Pou5f1*のノックダウン胚は原腸胚後期に、*Pou5f3*のノックダウン胚は神経胚期にそれぞれ発生が停止した。したがって、四肢動物の祖先では*Pou5f1*及び*Pou5f3*が独立の機能を持っており、哺乳類の出現過程で*Pou5f3*が初期発生において不必要となりゲノムから消失した可能性が考えられる。

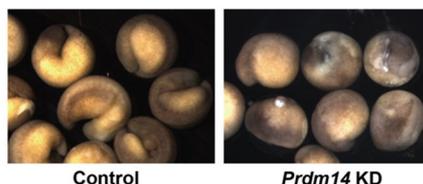


図1. *Prdm14* KD イモリ胚の表現系
コントロール胚は尾芽胚まで発生が進んでいるが、*Prdm14* KD 胚は神経胚期で発生が停止している。

(2) 運動ニューロンから生殖系列へのPRDM14の発現様式の変化とその影響

イペリアトゲイモリ胚における*Prdm14*の発現パターン解析

イペリアトゲイモリ胚における*Prdm14*の発現パターンを *in situ* hybridization で解析したところ、運動ニューロンと多能性細胞であるアニマルキャップの両方での発現が確認された。このことから、有尾両生類では運動ニューロンと多能性細胞の両方で*Prdm14*が機能している可能性が考えられる。

ネズミ科・ネズミ上科特異的シス領域による*Prdm14*の発現制御機構の解明

*Prdm14*のエンハンサー領域には羊膜類で保存されたシス領域とネズミ科・ネズミ上科特異的シス領域が存在した。そこで、CRISPR/Cas9システムを用いてマウスES細胞におけるネズミ科・ネズミ上科特異的シス領域の破壊を行った。その結果、ネズミ科・ネズミ上科特異的シス領域はES細胞における*Prdm14*の発現とエピプラストへの分化過程における*Prdm14*の発現消失の両方に必須であることが分かった。この結果から、ヒトとマウスの共通祖先からマウスへ進化する過程に新たに獲得したシス領域によって、マウス特有の*Prdm14*の発現パターンを獲得した可能性が考えられる。さらに、ネズミ科・ネズミ上科特異的を改変したES細胞をエピプラスト様細胞へ分化させたところ、ヒトと同様に*Prdm14*の発現が維持され、エピプラストの分化遅延が観察された(図2)。

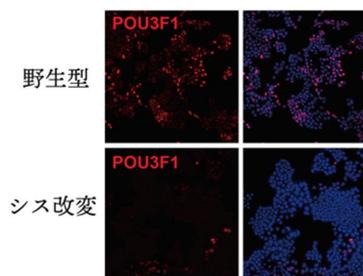


図2. ネズミ科・上科特異的シス領域の改変はエピプラストの分化遅延を引き起こす
赤の蛍光シグナルはエピプラストの分化マーカーであるPOU3F1の発現を示しており、シス領域を改変したエピプラストではPOU3F1の発現誘導遅延が起こる。

(3) ヒト多能性細胞から始原生殖細胞への変換を制御する転写因子ネットワークの同定

ドキシサイクリンの有無で人為的に*PRDM14*の発現を制御できるhiPSCを用いて、始原生殖細胞の前駆細胞である中胚葉性多能性細胞及び始原生殖細胞における*PRDM14*の機能解析を行なった。その結果、*PRDM14*は始原生殖細胞形成に必要な遺伝子を抑制する機能があり、始原生殖細胞形成過程に*PRDM14*を過剰発現することで、始原生殖細胞形成効率が減少することを突き止めた。この結果は、ヒト始原生殖細胞の形成過程における*PRDM14*の一過的な発現減少が、始原生殖細胞形成に必須であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maiko Yamamoto, Yoshiaki Suwa, Kohta Sugiyama, Naoki Okashita, Masanori Kawaguchi, Naoki Tani, Kazumi Matsubara, Akira Nakamura, Yoshiyuki Seki	4. 巻 133
2. 論文標題 The PRDM14-CtBP1/2-PRC2 complex regulates transcriptional repression during the transition from primed to naive pluripotency.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.240176	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masanori Kawaguchi, Kota Sugiyama, Kazumi Matsubara, Che-Yi Lin, Shigehiro Kuraku, Shota Hashimoto, Yoshiaki Suwa, Luok Wen Yong, Koji Takino, Shota Higashida, Daisuke Kawamura, Jr-Kai Yu and Yoshiyuki Seki	4. 巻 146
2. 論文標題 Co-option of the PRDM14-CBFA2T complex from motor neurons to pluripotent cells during vertebrate evolution.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.168633 STEM	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yukimasa Shibata, Yoshiyuki Seki, Kiyoji Nishiwaki	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Maintenance of cell fates and regulation of the histone variant H3.3 by TLK kinase in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/bio.038448	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 関 由行
2. 発表標題 多能性ネットワークの進化的起源と変容
3. 学会等名 第91回日本遺伝学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関 由行
2. 発表標題 胚性ゲノム活性化を保證するエピゲノム制御の階層性
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関 由行
2. 発表標題 多能性ネットワークの進化的起源と変容
3. 学会等名 日本遺伝学会第90回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiyuki Seki
2. 発表標題 CtBP1/2 is a gatekeeper for ground state pluripotency and totipotency
3. 学会等名 EMBO workshop From epigenome towards epitranscriptome in cell fate choice (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 早川 奈緒、関 由行
2. 発表標題 PRAMEL7を中心とした胚性ゲノム活性化機構の解明
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸谷 美結
2. 発表標題 基底状態ES細胞におけるDNA脱メチル化機構の解明
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>多能性幹細胞のプライム型からナープ型への変換機構の解明 https://www.kwansei.ac.jp/news/detail/4158 関研究室ホームページ https://seki-lab.wixsite.com/seki-lab</p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------