

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20770186
研究課題名（和文） 始原生殖細胞によるゲノム修飾の再構成と全能性の再確立
研究課題名（英文） Epigenetic reprogramming associated with specification and early development of primordial germ cells.
研究代表者 関 由行 (SEKI YOSHIYUKI) 関西学院大学・理工学部・専任講師 研究者番号：20435655

研究成果の概要（和文）：生命の誕生は精子と卵子の受精から始まり、複雑かつ緻密な体を、発生プログラムを通して正確に築き上げる。このような受精卵の能力を分化全能性と呼び、ゲノムに付与される後天的な修飾（エピゲノム）の調節が分化全能性を獲得する上で極めて重要である。本研究提案では、精子・卵子の元になる始原生殖細胞のエピゲノム調節機構の解明を目的に研究を行った結果、始原生殖細胞のみで使われる新規遺伝子 *Prdm14* の同定に成功し、*Prdm14* を欠損したマウスでは雄雌共に完全に不妊になることを突き止めた。

研究成果の概要（英文）：Birth of life commence with fertilization of sperm and oocyte. Fertilized eggs can from complex and compact body correctly through developmental program. The ability, which one cell can form individual, is called cellular 'totipotency', which is regulated by epigenetic mechanisms. In this research, we focused on epigenetic reprogramming in primordial germ cells to understand how germ cells acquire cellular totipotency. In this result, we identified new gene, *Prdm14*, and elucidated that *Prdm14* deficient mice have infertility in both male and female.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：生殖細胞、エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

受精卵が分化全能性を発揮するためには、エピゲノムが初期状態にリセットされている必要がある。研究開始時点において我々は、精子・卵子の起源である始原生殖細胞がゲノム全体のエピゲノム情報を消去する活性を持つこと突き止めていた。

2. 研究の目的

本研究では、始原生殖細胞によるエピゲノムリプログラミング機構を制御する分子基盤と分子カスケードの同定を目的としていた。

3. 研究の方法

(1) 始原生殖細胞特異的遺伝子Prdm14の同定と機能解析

① マウスゲノム上に存在する PR/SET ドメイン分子の探索を、データベース SMART を用いて行った。

② 始原生殖細胞特異的に発現するエピゲノム制御因子を同定するために、始原生殖細胞 1 細胞から cDNA を増幅し、定量的 RT-PCR 法により発現スクリーニングを行った。

③ ジーンターゲット法を用いて *Prdm14* のノックアウトマウスの作製を行った。

④ *Prdm14* 欠損マウスにおける遺伝子発現及びエピゲノム解析を定量的 RT-PCR 法及び免疫蛍光染色法により解析した。

⑤ *Prdm14* 欠損始原生殖細胞が EG 形成能を保持しているか否か検証するために、胎生 8.5 日胚由来の始原生殖細胞を bFGF, SCF, LIF 存在下で培養した。

(2) Blimp1, Prdm14 による Dnmt3b の転写抑制機構の解明

① Blimp1 及び *Prdm14* が Dnmt3a/b 及び GLP の発現を抑制するか否か検証するために、ES 細胞に Blimp1 及び *Prdm14* を一過的に導入し、導入細胞における Dnmt3a/b 及び GLP の mRNA レベルを定量的 RT-PCR 法により定量した。

② Blimp1 及び *Prdm14* が Dnmt3b の転写を直接抑制するか否か検証するために、*Dnmt3b* プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイを行った。また、Blimp1 及び *Prdm14* の作用領域を同定するために、様々な長さの *Dnmt3b* プロモーターを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。

③ CAGGS プロモーターにより転写される *Prdm14* プラスミドを ES 細胞に導入し、*Prdm14* 恒常的発現 ES 細胞を樹立した。*Prdm14* 恒常的発現 ES 細胞における *Dnmt3b* の発現を qRT-PCR により定量した。

④ *Prdm14* 恒常的発現 ES 細胞の *Dnmt3b* 遺伝子領域のヒストンメチル化状態を、メチル化ヒストンを特異的に認識する抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP) により解析した。

4. 研究成果

(1) 始原生殖細胞特異的遺伝子Prdm14の同定と機能解析

始原生殖細胞の cDNA を用いて、マウスゲノム上に存在する全 PR/SET ドメイン因子 (48 種類) の発現スクリーニングを行った結果、始原生殖細胞特異的に発現する *Prdm14* の同定に成功した。*Prdm14* は C 末端に DNA 結合ドメインである Zinc finger domain を持つことから、転写制御因子として機能する可能性が考えられた。そこで、*Prdm14* が転写因子として機能するか否か、GAL4-DBD-UAS ルシフェラーゼアッセイを用いて解析したところ、*Prdm14* は転写抑制因子として機能することを見出した。さらに *Prdm14* 欠損マウスを作製しその表現型解析を行った結果、精巣・卵巣内の生殖細胞が完全に消失しており、不妊であった (図 1)。

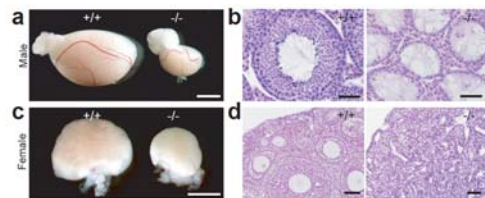


図 1. *Prdm14* 欠損マウスの表現型

Prdm14 欠損マウスの表現型をより詳細に解析したところ、*Prdm14* 欠損マウスでは既に初期の始原生殖細胞の時点から数が減少しており、生殖巣に到達する時期には始原生殖細胞はほぼ完全に消失していた。

次に *Prdm14* 欠損始原生殖細胞における遺伝子発現解析を行った結果、多能性関連遺伝子である *Sox2* の発現が顕著に減少していることが分かった。

また、*Prdm14* 欠損始原生殖細胞では、エピゲノムリプログラミングが不完全であったことから、*Prdm14* が始原生殖細胞によるエピゲノムリプログラミングの最上流で機能することが明らかとなった (図 2)。

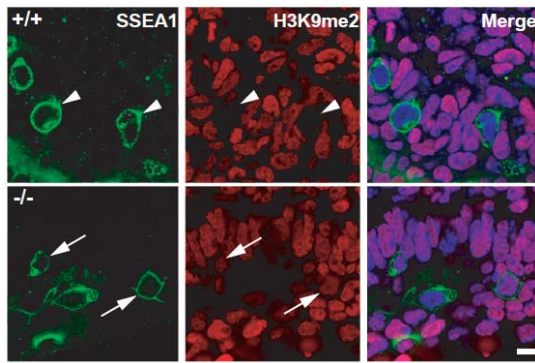


図2. Prdm14 欠損始原生殖細胞のエピゲノム解析

始原生殖細胞は特定の培養条件下で、多能性を獲得し胚性生殖細胞 (EG 細胞) を形成することができる。また、Prdm14 欠損始原生殖細胞では、多能性関連遺伝子である Sox2 の発現が顕著に減少していたことから、Prdm14 が始原生殖細胞の潜在的な多能性の獲得に関わっている可能性が考えられた。そこで、Prdm14 が始原生殖細胞の多能性獲得に必須の機能を担っているか否かを検証した結果、Prdm14 欠損始原生殖細胞は EG 細胞を形成することができなかつた (図3)。したがって、Prdm14 は始原生殖細胞が担うエピゲノムリプログラミングと多能性獲得の両方を制御していることが明らかとなった。

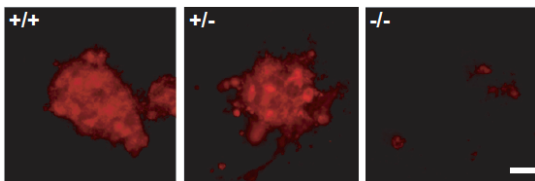


図3. Prdm14 欠損始原生殖細胞の EG 形成能の解析

また、始原生殖細胞は胚体外外胚葉からの Bmp4 シグナルにより形成が誘導されることが示されていた。そこで、Prdm14 の発現が Bmp4 シグナルに依存しているか否か、Bmp4 欠損胚における Prdm14 の発現解析を行った。その結果、Bmp4 欠損胚では Prdm14 の発現誘導が観察されなかつたことから、Prdm14 の発現は直接的もしくは間接的に Bmp4 シグナルに依存していることが明らかとなった。

(2) Blimp1, Prdm14 による Dnmt3b の転写抑制機構の解明

始原生殖細胞によるエピゲノムリプログラミングは、DNA メチル化及びヒストンメチル化酵素である Dnmt3a/b 及び GLP の特異的発現抑制が引き金となる。そこで、始原生殖細胞の形成に必須の転写抑制因子である

Blimp1 及び Prdm14 が Dnmt3a/b 及び GLP の転写を直接抑制しているか否かの検証を行った。その結果、Blimp1 及び Prdm14 は Dnmt3b の転写を単独で抑制する活性を持つことが明らかとなった。

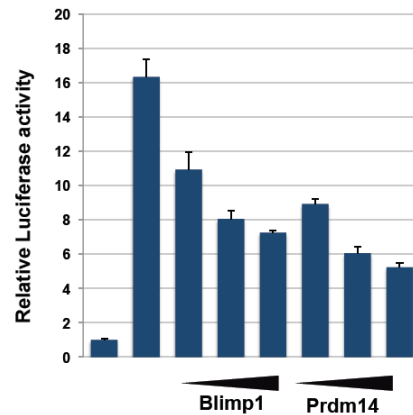


図4. Blimp1, Prdm14 による Dnmt3b の転写抑制

さらに、Dnmt3b プロモーターの deletion mutant を用いて解析を行ったところ、非常に興味深いことに、Blimp1 と Prdm14 は Dnmt3b 遺伝子領域内の異なる領域に作用することで、協調的に Dnmt3b の転写を抑制することも分かった。また、このような *in vitro* の解析を裏付けるように、Prdm14 欠損始原生殖細胞では Dnmt3b の脱抑制が高頻度で観察された。

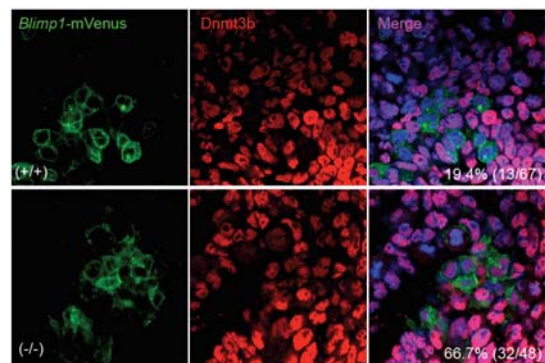


図5. Prdm14 胚における Dnmt3b の発現解析

次に Prdm14 による Dnmt3b の転写抑制機構をより詳細に解析するために、Prdm14 恒常的発現 ES 細胞を作製した。Prdm14 恒常的発現 ES 細胞では、顕著な Dnmt3b の転写抑制が観察された。Prdm14 は PR ドメインを持つことから、ヒストンメチル化活性を持つ可能性が考えられた。そこで、Prdm14 恒常的発現 ES 細胞の Dnmt3b 遺伝子領域におけるヒストンメチル化解析を行った。その結果、非常に興味深いことに、Dnmt3b 遺伝子領域では H3K27me1 が減少し、反対に H3K27me3 が上昇していることが明らかとなった。

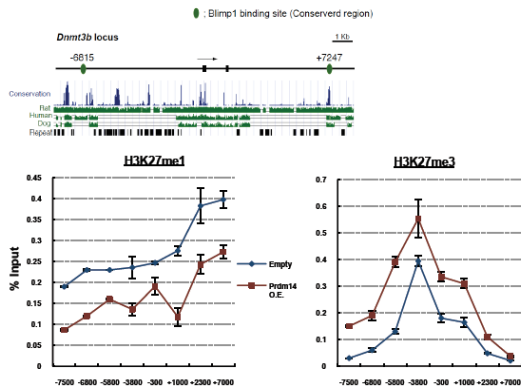


図6. Dnmt3b 遺伝子領域のヒストンメチル化解析

この結果は、Prdm14 が H3K27me1 を認識する活性と、H3K27me3 を付加する活性を持つ可能性を強く示唆している。

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2件)
(査読有)

- ① Kurimoto, K., Yamaji, M., Seki, Y. and Saitou, M. Specification of the germ cell lineage in mice: A process orchestrated by the PR-domain proteins, Blimp1 and Prdm14. Cell cycle 7(22), 2008
- ② Yamaji, M.*, Seki, Y.*, Kurimoto, K.*, Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M., Yamanaka, K., Ohinata, Y., and Saitou, M. Critical function of *Prdm14* for the establishment of the germ cell lineage in mice. Nature Genetics, 40(8), 1016-1022, 2008 (*: Equal contribution)

[学会発表] (計2件)

- ① 関 由行、始原生殖細胞において消えるエピゲノムと消えないエピゲノム、第82回生化学会大会、2009年10月23日、神戸ポートアイランド
- ② 関 由行、マウス始原生殖細胞によるDNA脱メチル化機構の解明、第3回エピジェネティクス研究会年会、2009年5月22日、学術総合センター、東京

[図書] (計1件)

- ① Seki, Y.* and Saitou, M*. Epigenetic reprogramming in primordial germ cell development. Genetical and epigenetical control of mammalian germ cell development and their function. Genetic and epigenetical control of mammalian germ cell development and function., Research Signpost, 13-36 2008 (* Corresponding Author)

[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・専任講師

研究者番号：20435655