

動物発生過程におけるPrdm遺伝子群の発現と機能に関する研究

江口, りえこ

<https://doi.org/10.15017/1500526>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（システム生命科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

氏 名 : 江口 りえこ

論文名 : 動物発生過程における Prdm 遺伝子群の発現と機能に関する研究

区 分 : 甲

論文内容の要旨

多細胞生物の複雑な体は、1 つの受精卵が分裂と増殖を繰り返し、様々な細胞へと分化することで形作られる。この細胞の分化過程においてゲノム DNA 配列は変化しないため、遺伝子の発現レベルでの制御が重要である。近年、DNA 配列の変化を伴わない遺伝子発現制御システムとしてエピジェネティック制御系が見出され、再生医療研究などの実用分野においては、エピジェネティック制御系のリプログラミングが重要な課題となっている。エピジェネティック制御の分子機構として、DNA のメチル化やヒストンタンパク質の化学修飾、例えば、リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化および ADP リボシル化などが知られている。また、細胞分化過程では、分化した個々の細胞内の遺伝子発現状態が細胞分裂を経ても維持される細胞記憶機構が研究課題とされ、その機構のひとつとしてヒストンタンパク質のメチル化修飾が注目されている。本論文では、メチル化修飾タンパク質をコードする Prdm 遺伝子群に着目し、それらの遺伝子発現と機能を解析した。

メチル化修飾を担う酵素には、アルギニン残基特異的な PRMT (Protein arginine N-methyltransferase) と、リシン残基特異的な SET (Su(var)3-9, Enhancer of zest(EZ), Trithorax(TRX)) の2つのタンパク質ファミリーが存在する。このうち、SET タンパク質は転写調節因子 SUV39H タンパク質に見出されたメチル基転移活性ドメインである SET ドメインを持つタンパク質であり、脊椎動物において 60 種類ほどが同定されている。また、ヒストンメチル化修飾活性に加えて、他のヒストン修飾タンパク質と相互作用する活性を有し、様々な機能を持つことが報告されている。Prdm タンパク質は SET タンパク質に属し、SET ドメインと相同なアミノ酸配列を有する PR (PRDI-BF1 and RIZ) ドメインに加えて、DNA 結合活性を有する zinc finger ドメインを持つことを特徴とするタンパク質である。そのため Prdm タンパク質は特異的な DNA 配列に結合し、その結合領域のクロマチン構造を変化させる機能を持つと推定されている。現在までに、ヒトで 16 種類、マウスで 15 種類の Prdm 遺伝子が同定されているが、詳細な機能解析は数種類の Prdm 遺伝子のみで行われているに過ぎない。よって、本論文では細胞分化過程や胚発生における Prdm 遺伝子群の機能を明らかにすることを目的とした。まず、アフリカツメガエル初期胚における Prdm 遺伝子群の発現を解析し、次に、マウス胚性腫瘍細胞株 P19 (P19 細胞)を用いて神経分化過程における Prdm 遺伝子群の発現と機能を解析した。アフリカツメガエル初期胚は受精以降の全過程が母体外で進行し、発生途中の胚は他の脊椎動物卵よりサイズが大きく操作が容易であるため、受精から器官形成過程における初期発生の研究が特に進み、形態形成のモデルとしてその分子メカニズムの解明に大きく貢献している。一方、P19 細胞は多能性を有した細胞株であり、ES 細胞に比べ高効率で神経や筋肉細胞への分化誘導が可能なモデル幹細胞である。

まず、アフリカツメガエル初期胚を用いて、初期発生過程における Prdm 遺伝子群の発現を半定量 PCR 法によって解析した。その結果、アフリカツメガエルが保持するすべての Prdm 遺伝子 15

種類が初期発生過程において発現していることが判明した。このうち、Prdm1、2、4、9、11 及び 15 遺伝子は母性成分として発現しており、受精直後から発生に関わることが明らかとなった。さらに、Whole mount *in situ* hybridization 法によって、発現組織の解析を行ったところ、すべての Prdm 遺伝子が様々な発生ステージで組織特異的に発現しており、各組織の分化や形成過程で機能していることが示唆された。特に、脊髄や目、耳、前脳、中脳、後脳、脳室などの神経組織において Prdm 遺伝子の発現は顕著であり、アフリカツメガエル初期胚の神経発生において Prdm 遺伝子は重要な機能を有する可能性が示された。

次に、神経細胞分化における Prdm 遺伝子の機能解析を行うために、P19 細胞の分化過程における Prdm 遺伝子群の発現を解析した。P19 細胞は、レチノイン酸 (RA) 曝露により神経細胞へ、ジメチルスルホキシド (DMSO) 曝露により心筋・骨格筋へ分化誘導可能な幹細胞である。RA 曝露によって神経細胞分化誘導後、経時的な遺伝子発現変化を DNA チップによって網羅的に解析した結果、Prdm8, 12 及び 13 遺伝子の発現が分化誘導 4 日目に一過的に誘導されることが明らかとなった。分化誘導 4 日目は神経細胞分化が開始する時期とされており、Prdm8, 12 及び 13 遺伝子は未分化細胞から神経細胞へ分化する初期反応に関与していることが示唆された。また、DMSO 曝露による心筋・骨格筋分化誘導過程における発現を解析したところ、Prdm6 遺伝子の発現が一過的に誘導されたことから、Prdm6 遺伝子は心筋・骨格筋分化に関与する可能性が判明した。

さらに、P19 細胞の細胞分化過程における Prdm13 遺伝子の機能を解明するために、Prdm13 遺伝子の過剰発現による神経分化への影響を解析した。Prdm13 発現プラスミドを P19 細胞に導入し、Prdm13 過剰発現後の P19 細胞の状態を経時的に解析した。P19 細胞は、ニューロンとグリア細胞の 2 種類の神経細胞に分化するため、ニューロンマーカーとして Ncam と、グリア細胞マーカーとして Gfap の発現を分化の指標とし、定量 PCR によって解析した。その結果、Prdm13 の過剰発現は Ncam の発現を誘導し、ニューロン分化を引き起こすことが判明した。一方、グリア細胞分化は Prdm13 過剰発現のみでは誘導されないことが示唆された。これらの結果から、P19 細胞の神経分化過程において Prdm13 はニューロン分化を特異的に誘導する機能を持つことが明らかとなった。

以上、本論文では、アフリカツメガエル初期胚と神経分化解析のモデル系であるマウス P19 細胞を用いて、メチル化タンパク質をコードする Prdm 遺伝子の発現と機能解析を行い、細胞分化、特に神経細胞分化過程において、Prdm 遺伝子が重要な機能を持つことを明らかにした。本論文の成果は、動物の発生過程における細胞分化の分子機構解明に重要な知見をもたらし、さらに、再生医療の進展に寄与することが期待される。