

ニワトリ始原生殖細胞の体細胞分化機構の解明 — 上皮間葉転換に着目して —

広島大学ゲノム編集イノベーションセンター・研究員 市川 健之助

■ 目的

ニワトリは鳥類で唯一、精子・卵の起源細胞である始原生殖細胞(PGC)の長期培養系が確立されている。このニワトリ PGC の培養系は、遺伝子改変ニワトリの作出と希少なニワトリ品種の保全の双方で重要な技術である。一方で、ニワトリ以外の鳥類では未だ PGC の長期培養ができない。そのため、あらゆる鳥類に適用可能な PGC の新規培養系の確立は、鳥類の学術研究の発展と生物多様性保全の実現の双方で求められている。ニワトリ以外の鳥類で PGC が培養できない主要な原因の一つに、PGC の体細胞分化が挙げられる。ニワトリの培養 PGC は、低頻度であるものの、体細胞への分化を生じる。他鳥類ではこの分化が頻繁に生じ、これが培養の障壁となる。我々はこれまでの研究から、この PGC の体細胞分化は、がん細胞が転移する際に生じる「上皮間葉転換」と類似した現象であることを発見した。そこで本研究では、あらゆる鳥類の PGC を維持できる新規培養系の確立を最終目標とし、ニワトリ PGC の上皮間葉転換様現象の分子機構の解明に着手した。

■ 方法

研究1 エピジェネティクス制御の評価

がん細胞の上皮間葉転換では、エピジェネティクス制御の大規模な変動を生じる。また、事前に行った RNA-seq 解析の結果から、PGC は体細胞分化に伴って転写抑制に関わるエピジェネティクス制御が変動し、その結果として体細胞関連因子が PGC で無秩序に発現することが推測されていた。そこで本研究では、未分化な PGC-体細胞分化した PGC 間でエピジェネティクス修飾の総量を比較した。

研究2 分化要因の評価

生体内における上皮間葉転換の主要な要因の一つに、細胞-基底膜間の相互作用が挙げられる。また、培養皿の底面に接触した PGC は体細胞分化が誘導されることを我々は予備的に見出していた。そこで本研究では、細胞外基質コート剤を用いた刺激試験を行った。

■ 結果および考察

研究1 エピジェネティクス制御の評価

DNA 修飾では、メチル化、およびヒドロキシメチル化シトシンに着目し、その総量をドットプロット解析により明らかにした。その結果、未分化な PGC-体細胞分化した PGC 間で、両修飾ともに統計的に有意な差は確認されなかった。一方ヒストン修飾では、主要な転写抑制マーカーとなる H3K9me2、H3K9me3、H3K27me3 の総量をウエスタンブロット解析により明らかにした。その結果予想に反して、いずれのマーカーも体細胞分化に伴う減少は確認されず、H3K27me3 は体細胞分化した PGC で増加傾向にあった。以上より、研究開始時の仮説とは反するものではあるが、体細胞分化時における局所的な転写抑制機構の存在が示唆された。

研究2 分化要因の評価

本研究では、分化率を定量するためのレポーターとして、未分化な PGC で特異的に緑色蛍光を呈する、*PRDM14^{esfp}* PGC を用いた。ここでは、*PRDM14^{esfp}* PGC を通常培養条件下、およびフィブロネクチンコート下でそれぞれ培養した。その結果、フィブロネクチンコート下では、体細胞分化した PGC の割合が継代回数に応じて増加することが、フローサイトメトリー解析により明らかになった。同様の傾向は、コラーゲンコート下でも確認された。以上のことから、PGC-培養皿間の接触が、体細胞分化の要因の一つであることが示唆された。

■ 結語

本研究では、PGC の体細胞分化に伴う遺伝子発現制御機構の解明には至らなかったものの、その分化要因の同定には成功した。今後は本研究をさらに発展させ、分化を抑制できる培養条件を検討することで、あらゆる鳥類由来の PGC に適応可能な新規培養系の確立を目指す。