

H O T P R E S S

PGC7の逆襲：Stellaウォーズ Episode 2

大阪大学大学院生命機能研究科・医学系研究科

仲野 徹

Toru Nakano

E-mail : tnakano@patho.med.osaka-u.ac.jp

知っている人は知っていると思うが、私は造血システム研究を長年の生業としている。しかし、10年ほど前、研究室を持った機会に新しいテーマを始めることにした。ご存知のように血液細胞は比較的短命で“ディスプレイ”な細胞である。それに対して、世代から世代へと遺伝情報を伝える細胞である生殖細胞は、遺伝情報を永続的に伝達する細胞である。ディスプレイと永続性の対比、そして、研究が非常に進んでいる血液細胞に比較して多くのことが秘密のベールで覆われたままの生殖細胞、そういったコントラストから、生殖細胞の発生・分化を新しいテーマに選んだ。その1つとして、発生の初期に生殖系列に運命付けられる始原生殖細胞 (primordial germ cell ; PGC) の成立機構に取り組むことにした。

PGCは、LIF、SCF、bFGFの存在下で培養すると、ES細胞と類似した多能性を持ったEG細胞 (embryonic germ cell, 胚性生殖細胞) へと“脱分化”することが知られている。そこで、当時、大学院生であった佐藤正岳君が、PGCとES細胞における遺伝子発現を網羅的に解析し、それぞれに特異的に発現する遺伝子のクローニングを行ってくれた。PGCに多く発現する遺伝子のうち、ES細胞に比較した相対的発現量が7番目に多い遺伝子、それがPGC7である。味気ない名前であるが、他にいい名前が思いつかなかったのと、ウルトラセブンみたいでいいか、という訳のわからない理由でこの名前になった。遺伝子発現を調べると、PGC7は初期胚とPGC、そして卵細胞において発現していることがわかった。この結果は、

Mechanisms of DevelopmentのGene Expression Patternsに発表し、佐藤君の学位論文となった¹⁾。

それから約3カ月後、生殖細胞の発生、ゲノムインプリンティングの大家であるケンブリッジのAzim Surani先生の研究室から、初期の始原生殖細胞の単一細胞クローニングにより、2つの遺伝子StellaとFragilisが単離され、NatureのArticleに報告された²⁾。Stellaは、はたしてPGC7と同じ遺伝子であった。そして、筆者らの論文は、目立たないところにひっそりと引用されていた。この論文の筆頭著者は、誰であろう、現在、神戸理研CDBのチームリーダーになっている斎藤通紀博士。斎藤君は、京都大学医学部時代、学部学生でまったくの素人であったところに研究指導をした旧知である。ちなみに、彼の結婚式では、故月田承一郎先生が涙を流して笑ってくれたような、すばらしいスピーチをしてやった仲である。斎藤君がすばらしい論文をものにしたことを心からうれしく思う反面、せめてちゃんとreferせよなあという気持ちがなかったとはいえない。土俵の恩は土俵で返す、と、恩を仇で返す、を足して2で割ったような話である。これが、世に言う、ほんとは誰も言わないけど、Stellaウォーズ、Episode 1である。

遺伝子ターゲティングの実験は、こちらの手際が悪く、完敗。PGC7/Stellaは、予想に反してPGCの運命付けには関与していないことが、Surani研から報告された。でも、ちゃっかり共著者にすべりこむことができた。PGC7/Stellaは、初期発生に必須な、卵細胞に含まれる母性因子であること

が明らかにされたわけである。どのようなメカニズムでPGC7/Stellaが初期発生に関与しているのか、一矢報いるべく、細々と逆襲を開始した。ここからがStellaウォーズ、Episode 2 “PGC7の逆襲”である。

まずは、TAP (tandem affinity purification) 法を用いて、PGC7/Stellaに結合するタンパク質の解析を行った。当時ポスドクであった増原正明君が、プロテオーム解析のエキスパート、徳島大学の谷口寿章先生の協力により得た結果は、PGC7/Stellaは核移行のキャリアタンパクの1つであるRanBP5と結合する、ということであった。PGC7/Stellaは、その局在が核内と細胞質に認められることがわかっていたので、まあ、そんなもんかなあ、という程度の結果であった。

学生に歯の削り方実習をしながら研究を続けるために明海大学歯学部へと増原君が移動した後、ポスドクの中村肇伸君が引き継ぎ、このテーマに根気よく取り組んでくれた。核移行の大家、米田悦啓教授 (大学の同級生なので、普段は呼び捨て) に相談し、関元敏博さんの協力を得ていろいろと実験をするも、いまひとつすっきりしたデータは出ない。そこで、PGC7/Stellaの核移行を人為的にコントロールしてみたら何かわかるのではないか、ということで、RanBP5とエストロゲン受容体のリガンド結合ドメインMERの融合タンパク質、RanBP5-MERを複製し、MERのリガンドである4-hydroxytamoxifen (4-OHT)の有無でRanBP5の細胞内局在をコントロールしてみようということになった。

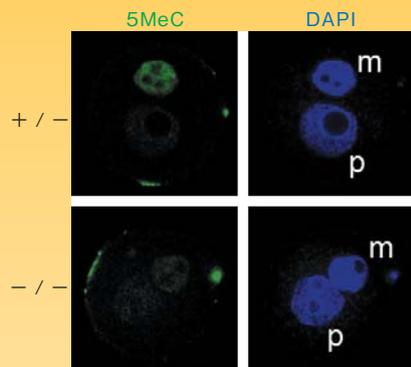


図1. 抗メチル化シトシンによる初期発生におけるゲノムDNAメチル化の免疫染色

コントロール卵では、父親由来の核 (p) のみが脱メチル化されているが、PGC7/Stella 欠損卵では、母親由来の核 (m) でも脱メチル化が生じている。5MeC が抗メチル化シトシン抗体による染色を示す。Nakamura T, et al: *Nat Cell Biol* (2006) in press より改変。

ところが、4-OHTがあろうがなかろうが、RanBP5-MERは細胞質に存在するのみであった。予定は狂ってしまったが、このRanBP5-MERを用いてPGC7/Stellaの機能障害実験を行うことにした。阪大微生物病研究所の岡部 勝先生の研究室の蓮輪英毅さんの協力を得て、未受精卵にRanBP5-MERのmRNAを注入し、初期発生に異常が生じるかどうかを調べてみた。その結果、RanBP5-MERを発現させた場合、PGC7/Stellaは細胞質内に留まったままになり、PGC7/Stella欠損卵を用いた場合と同じような異常が生じることがわかった。実際には、いろいろと緻密な実験をしてあるが、めんどろなので詳細は割愛。

この成果から、1つの重要な結論を導くことができた。PGC7/Stellaは、卵の成熟過程ではなく、受精後、それも、受精後きわめて早い段階において核に移行してその機能を発揮する、ということである。このことから、どの段階でどこに異常が発生するかのウィンドウを設定することができたのである。受精後早い段階における核内での大きな変化

といえば、DNAの脱メチル化である。PGC7/Stellaが卵に存在するタンパク質であることから、おそらく、受精によって持ち込まれた精子に由来する核、雄性前核の脱メチル化に何らかの異常があるのではないかと予想をたてて、抗メチル化DNA抗体を用いた免疫染色実験を行った。より正しく書くと、そうするように中村君を説得した。

“先生、思い通りの結果が出ませんでした”と中村君が持ってきたデータは、予想に反し、初期胚において、卵に由来する核、雌性前核のメチル化状態に異常がある、というものであった。受精後すぐに、雄性前核においても雌性前核においてもグローバルな脱メチル化が生じる。しかし、脱メチル化の生じ方に差があり、雌性前核より雄性前核の脱メチル化のほうが速やかに生じる。逆に言うと、母親由来のDNAは、何らかの理由で脱メチル化から保護されており、この現象はepigenetic asymmetryと呼ばれている。PGC7/Stellaは、この脱メチル化からの保護に機能しており、epigenetic asymmetryの成立に必須である、ということになる。予想とは逆であったが、感動的にクリアなデータであった(図1)。

ここで第1回目の投稿。思っていたとおり、レフェリーのの方々からは、免疫染色だけではわからんから、ちゃんとbisulfite法でメチル化を調べなさい、というお返事をいただいた。そこで、東大農学部の塩田邦郎教授にご相談申し上げ、田中 智さん、新井良和さんに無理をお願いして、技術的に難しい少量のサンプルからのbisulfite解析を行った。その結果、PGC7/Stella欠損卵からの受精卵では、明らかに一部の遺伝子でメチル化が低下していることがわかった。やはりPGC7/Stellaは脱メチル化を阻害するタンパク質である、と結論して、意気揚々とrevise原稿を送り返したものの、どうやって阻害してるかmolecular mechanismがわからなかったらあかんのよ、という

つれない返事がきて、あえなくreject.

しくしく泣きながらも、インプリンティング遺伝子のメチル化解析などをしこしこ続けて、雑誌のレベルをちょいと落として再投稿。レフェリーから厳しいご意見もあったが、おおむねクリアできるようなものであった。どうしても難しい実験だけは“堪忍してください”と泣きをいれながらreviseしたら、ほんとに堪忍してくれた³⁾。こうして、Episode 2は、筆者らの勝利をもって終幕を迎えた。revise中に学会で偶然お会いしたSurani先生にたずねたら、Stellaについての研究をほとんど続けてない、ということだった。こちらとしては逆襲のつもりであったが、先方はまったく戦闘態勢になかったという、すばらしくとほほなエンディングになったのだ。

今回の研究で明らかになったことは、PGC7/Stellaが、少なくとも、いくつかの遺伝子を初期発生の脱メチル化から保護している、ということである。しかし、その分子機構、保護が直接的なものなのか間接的なものなのかを含めて、はまったく不明のまま残された。Stellaウォーズは三部作ということになっているので(誰が決めたんや……)、もう一幕残っている。ここでは、PGC7/Stellaがどのような分子機構で機能しているか、が戦闘対象になるはずである。相手が反撃してくるかどうか不明であるが、何年後、皆様のご期待にこたえて、Episode 3を発表したいと考えている。誰も待っていないような気もするが、May the Force be with usということで。

- 文献 -

- 1) Sato M, et al: *Mech Dev* (2002) 113: 91-94
- 2) Saitou M, et al: *Nature* (2002) 418: 293-300
- 3) Nakamura T, et al: *Nat Cell Biol* (2006) in press