

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06068

研究課題名(和文) クロマチンリプログラミングに伴うDnmt1の機能変換機構とその意義の解明

研究課題名(英文) Mechanisms inducing functional switching of Dnmt1 initiated by chromatin reprogramming and its physiological function

研究代表者

多田 政子 (TADA, Masako)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：10524910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の正常な胚発生に不可欠な DNAメチル化は、マウスでは3種の新規メチル化酵素DNMT3A/3B/3Cと維持型DNMT1により制御されている。本研究では、DNMT1をDnmt1/3a/3b三重欠損胚性幹細胞(TKO ESCs)に強制発現させ、その特性を解析した。結果、外来性 DNMT1 は、アポトーシスと胚体外組織分化を抑制し、エピブラスト分化と続く中内胚葉分化を促進しTKO ESCs の分化能を回復させた。この過程で、クロマチン緩和とDNAメチル化が協調的に誘導された。本研究成果は、DNMT1 が着床胚のDNAメチル化増加に直接関与する可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子の本体はDNAであるが、正常胚発生や個々の体細胞機能の維持には、どの遺伝子を使いどの遺伝子を抑制するかといった遺伝子発現プログラムであるエピジェネティクス修飾の正確な制御が必須である。哺乳類では、卵子や精子由来のエピジェネティクスが連続的に消去されたり新たに構築されることが必須であり、これにはさまざまな酵素が関与している。本研究の成果は、本プロセスに必須なDNAメチル化酵素DNMT1の新たな機能を見いだしたことにある。DNMT1は大型の酵素であるが、核の構造が緩んで露出したDNAに作用して積極的にDNAメチル化増加をもたらし、結果、分化方向を規定できる可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation, essential for normal embryonic development in mammals, is regulated by three de novo DNA methyltransferases (DNMT 3A/3B/3C) and maintenance DNMT1. This study analyzed the characteristics of transgenic mouse embryonic stem cells (ESCs) in which DNMT1 was constitutively expressed in triple knockout ESCs of Dnmt1/3a/3b. During the cell differentiation process, de novo DNA methylation was induced with chromatin reprogramming. As a result, exogenous DNMT1 restored the differentiation potency of TKO ESCs by suppressing apoptosis and extraembryonic cell differentiation and promoting epiblast differentiation followed by mesendoderm differentiation. Our findings suggest that DNMT1 may be directly involved in the process of increasing DNA methylation during epiblast formation.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス DNAメチル化 ES細胞 マウス胚発生 リプログラミング DNMT1 クロマチン生殖系列

## 1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティクスは、哺乳類の胚発生、細胞分化、恒常性制御に必須である。マウス初期胚発生過程では、遺伝子活性の有無にかかわらずゲノム全体のエピジェネティクスの多くが消去されるゲノムリプログラミング現象が誘導される。しかし、そのプロセスの詳細は未だ明らかになっていない。卵子や精子は極めて高い DNA メチル化状態にあるが、受精直後からそれらのマークのほとんどが着床までに消去される。その後、胎盤になる細胞と胚体を形成するエピブラストに分化する。前者は、低い DNA メチル化状態にあり、エピブラストでは再び高度にメチル化される。そのエピブラストからは、中胚葉と内胚葉の前駆細胞である中内胚葉と生殖細胞の前駆細胞である始原生殖細胞(PGCs)が分化するが、これらの分化開始に先立ち再び DNA の脱メチル化が開始される。PGCs では、更にエピジェネティクス消去されゲノムの基底状態に至る (Tada, M et al, 1997)。このように、受精から次の世代の生殖細胞が形成されるまでの生殖系列の幹細胞では、DNA メチル化の増減を1セットとすると少なくとも2回のエピジェネティクスのリプログラミングが誘導される。本研究では、生殖系列の分化制御における DNA メチル化の役割とそのプロセスを制御する主要な酵素の機能を明らかにすることを目指した。

## 2. 研究の目的

遺伝子発現はエピジェネティクスと呼ばれる化学修飾によって可逆的に制御されている。とりわけ DNA シトシンのメチル化は、哺乳類の正常胚発生に必須である。その修飾を司る DNA メチル化酵素には3種の新規型酵素 DNMT3A/3B/3C と維持型酵素 DNMT1 がある。DNMT3C はマウス特異的かつ精子形成特異的にその機能を発揮する。DNMT1 は、精製された無修飾 DNA を新規メチル化できるがスクレオソーム構造内の DNA にはアクセスできない。我々は、DNMT3A/3B 欠損マウス ESCs を分化させると DNA メチル化レベルが増加することを見だし、DNMT1 が新規メチル化活性を示す可能性を検証することを目指した。方法として、*Dnmt1/3a/3b* の三重欠損 ESCs に複数種類の *Dnmt1* 発現プラスミドベクターを導入したトランスジェニック ESCs 株を樹立し、DNA メチル化が増加する発生段階のエピブラストと続く中内胚葉へと分化誘導した。この過程での DNA メチル化量の増減、その修飾領域、分化制御などに与える DNMT1 の働き、その活性が顕在化する要因を解析した。

## 3. 研究の方法

(1) 以下①~④の4種の *Dnmt1* 発現ベクター導入 *Dnmt1/3a/3b* 三重欠損(TKO)ESCs の作製

- ① DNMT1 全長 (FL) :正常 DNMT1 酵素
- ② 1-291 アミノ酸欠損 DNMT1 変異体(291): 維持メチル化活性の減少
- ③ 1-602 アミノ酸欠損 DNMT1 変異体(602): 維持メチル化活性とヘテロクロマチン集積能の欠損
- ④ 酵素活性欠損 DNMT1 変異体 (CI) : 1 アミノ酸置換による DNA メチル化活性の欠損

(2) ES 細胞の分化誘導 (7日間)

ESCs を胚様体形成させることで Wnt/ $\beta$  カテニンシグナルを抑制しエピブラスト様細胞へ分化させた。次いで、Activin A を加えて Activin/Nodal シグナル経路を活性化させ中内胚葉誘導した。

- (3) DNA メチル化修飾とその酸化体であるヒドロキメチル化修飾の日々変化の解析
  - ① 分裂中期染色体上の蛍光免疫染色
  - ② バイサルファイトシーケンス(WGBS, 次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析)
  - ③ MeDIP-seq と hMeDIP-seq を用いた全ゲノム解析
  - ④ イライザ法を用いた定量解析
- (4) DNMT1 が新規 DNA メチル化を誘導する要因の解析
  - ① クロマチン状態を変える化合物処理
  - ② DNA メチル化増加時期のクロマチン状態の解析
  - ③ 2種の N 末端欠損 DNMT1 と正常 DNMT1 発現 ESCs の特性比較解析
- (5) DNMT1 が誘導した DNA メチル化による分化制御
  - ① マイクロアレイによる 0 日から 7 日目の分化細胞特性から予測される DNMT1 機能
  - ② RNA-seq による初期分化制御における DNMT1 の機能

#### 4. 研究成果

以下、4 種の DNMT1 発現ベクターを *Dnmt1/3a/3b* 三重欠損(TKO)ESCs に導入しトランスジェニックマウス ESCs を準備、作製した。続いて、これらを分化誘導した細胞の特性解析から、以下の結果が得られた。

- (1) DNMT1 は酵素活性依存的に分可能のない *Dnmt1/3a/3b* TKO ESCs の分可能を回復できる。
- (2) DNMT1 は TKO ESCs で発現亢進している原始内胚葉(PrE)特異的遺伝子発現を抑制できる。
- (3) DNMT1 は TKO ESCs の分化誘導によって誘導される細胞死を抑制し、エピブラスト分化を促進できる。
- (4) DNMT1 は TKO ESCs の IAP レトロトランスポゾンの遺伝子発現抑制に働く。
- (5) N 末端欠損 DNMT1 は TKO ESCs の rDNA や CpG island を特にメチル化する。
- (6) いずれの DNMT1 もクロマチン構造の緩い領域から DNA メチル化が開始される。
- (7) DNMT1 発現 TKO ESCs は中内胚葉分化を進めることができる。
- (8) DNMT1 発現 TKO ESCs は中内胚葉誘導下で TET 酵素によるヒドロキシメチル化を受け、PGCs 様のリプログラミングを開始する。
- (9) N 末端欠損 DNMT1 は分化制御が不均質に進行する。
- (10) N 末端欠損 DNMT1 は維持メチル化とヘテロクロマチンのメチル活性を持たない。

以上の結果は、DNMT1 発現 TKO ESCs では、分化開始時に増強される Wnt/ $\beta$  カテニンシグナルの下流で発現する PrE 遺伝子が DNMT1 により誘導される DNA メチル化を介して抑制されることを示している。一方、エピブラストへの分化後に中内胚葉誘導すると、Activin/Nodal シグナルに高感受性を示し、エピブラストへの機能的成熟化を離脱して PGCs 様細胞へ脱分化することを示した。すなわち、DNMT1 が単独で誘導できる不活性状態は、エピブラスト機能の樹立・維持には不十分であるものの、マウス ESCs の分化進行に十分な DNA メチル化獲得に寄与できると考えられる (Kubiura-Ichimarui, M et al.,論文投稿準備中)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kubiura-Ichimarum Musashi、Ito Takamasa、Lefebvre Louis、Tada Masako	4. 巻 29
2. 論文標題 Cyclic DNA remethylation following active demethylation at euchromatic regions in mouse embryonic stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chromosome Research	6. 最初と最後の頁 145 ~ 157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10577-020-09645-y	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 Tada Masako、Hayashi Ayaka、Asano Yumi、Kubiura-Ichimarum Musashi、Ito Takamasa、Yoshii Miho、Kimura Hiroshi、Matsuda Yoichi、Oshimura Mitsuo	4. 巻 43
2. 論文標題 Evidence for divergence of DNA methylation maintenance and a conserved inhibitory mechanism from DNA demethylation in chickens and mammals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes & Genomics	6. 最初と最後の頁 269 ~ 280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13258-021-01046-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ooeda Keiko、Kubiura Ichimarum Musashi、Tsuji Saori、Okuyama Shota、Yamashita Mao、Mine Akari、Kawamura Fumihiko、Ueyama Takafumi、Tada Masako	4. 巻 8
2. 論文標題 A two dimensional multiwell cell culture method for the production of CYP3A4 expressing hepatocyte like cells from HepaRG cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmacology Research & Perspectives	6. 最初と最後の頁 e00652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/prp2.652	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okuyama Shota、Kawamura Fumihiko、Kubiura Musashi、Tsuji Saori、Osaki Mitsuhiro、Kugoh Hiroyuki、Oshimura Mitsuo、Kazuki Yasuhiro、Tada Masako	4. 巻 8
2. 論文標題 Real time fluorometric evaluation of hepatoblast proliferation in vivo and in vitro using the expression of CYP3A7 coding for human fetus specific P450	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmacology Research & Perspectives	6. 最初と最後の頁 e00642
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/prp2.642	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 多田 政子	4. 巻 52 (9)
2. 論文標題 DNA修飾酵素のアクセス許容度から追跡するクロマチンプログラミング	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊 細胞	6. 最初と最後の頁 32-35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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16件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Tada, M
2. 発表標題 DNA methylation dynamics through the cell cycle in mouse embryonic stem cells.
3. 学会等名 The 7th Asian Chromosome Colloquium (APCC7, Korea) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ito, T., Kubiura-Ichimarui, M, and Tada, M.
2. 発表標題 Epigenetic changes in DNMT1-null mouse embryonic stem cells expressing the catalytically inactive DNMT1.
3. 学会等名 The 7th Asian Chromosome Colloquium (APCC7, Korea) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤仁将、首浦武作志、Louis Lefebvre、多田政子
2. 発表標題 マウスES細胞におけるDNMT1とDNMT3sによる協調的DNAメチル化制御
3. 学会等名 第14回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 首浦武作志、三浦史仁、伊藤敬、Louis Lefebvre、多田政子
2. 発表標題 マウス初期胚発生におけるDNMT1の新規メチル化活性が持つ機能
3. 学会等名 第14回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ito, T., Kubiura-Ichimar, M, and Tada, M
2. 発表標題 Catalytically inactive DNMT1 recovers DNA methylation globally in DNMT1-null mouse embryonic stem cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kubiura-Ichimar, M., Miyazawa, T, Bogutz, A., Lefebvre, L., and Tada, M.
2. 発表標題 Extensive chromatin modulation induces DNMT1-coupled de novo DNA methylation.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Okuyama, S., Kubiura-Ichimar, M., and Tada, M
2. 発表標題 Real-time fluorometric evaluation of hepatoblast proliferation in vitro using the expression of the human fetal P450 gene CYP3A7
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 首浦武作志, 多田政子
2. 発表標題 染色体を用いたDNAメチル化とヒストン修飾の相互関係の解析
3. 学会等名 第70回染色体学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤仁将, 首浦武作志, 多田政子
2. 発表標題 マウス着床胚におけるゲノムリプログラミング開始を制御する機構の解明
3. 学会等名 第70回染色体学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多田政子
2. 発表標題 '染色体メチローム'でみる初期胚発生のエピゲノム動態
3. 学会等名 平成31年度遺伝研研究会「クロマチン・細胞核の形成とダイナミクスによるゲノム制御」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 首浦武作志, Aaron Bogutz, 木村博信, 田嶋正二, Louis Lefebvre, 多田政子
2. 発表標題 クロマチン状態によるDNMT1のde novoメチル化活性制御
3. 学会等名 第12回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下茉央, 奥山翔太, 多田政子
2. 発表標題 CYP3A4高発現HepaRG由来肝細胞様細胞を用いたハイコンテンツスクリーニング系の確立
3. 学会等名 第26回肝細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 首浦武作志, Aaron Bogutz, 木村博信, 田嶋正二, Louis Lefebvre, 多田政子
2. 発表標題 クロマチン状態によるDnmt1のde novoメチル化活性制御
3. 学会等名 第12回日本エピジェネティクス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥山翔太, 川村文彦, 首浦武作志, 辻咲織, 清水剛志, 豊村桃夏, 尾崎充彦, 久郷裕之, 押村光雄, 香月康宏, 多田政子
2. 発表標題 ヒト胎児性CYP3A7発現レポーターを導入したマウス個体および分化ES細胞における肝芽細胞増殖の高感度検出
3. 学会等名 第25回肝細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大枝慶子, 首浦武作志, 辻咲織, 奥山翔太, 川村文彦, 上山貴文, 多田政子
2. 発表標題 CYP3A4発現レポーター導入HepaRG細胞を用いた肝細胞機能増加器材の探索
3. 学会等名 第25回肝細胞研究会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 首浦武作志, 多田政子
2. 発表標題 クロマチン変化とDnmt1の機能的変化
3. 学会等名 第6回X染色体研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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		
カナダ	ブリティッシュコロンビア大学		