

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25112008

研究課題名(和文)卵および初期胚のエピゲノム制御機構

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of epigenome in oocyte and preimplantation development

研究代表者

東田 裕一(TSUKADA, Yuichi)

九州大学・稲盛フロンティア研究センター・教授

研究者番号：90444801

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 62,800,000円

研究成果の概要(和文): 哺乳類では、個体を構成する種々の細胞は分化の過程で異なる遺伝子発現プログラムを受け、細胞運命が決定される。分化した細胞では、遺伝子発現プログラムが固定されるが、一部の細胞ではリプログラミングされる。生体内で起こる究極のリプログラミングは、配偶子が受精を介して一個体を形成できる全能性を獲得するゲノムリプログラミング過程である。ゲノムリプログラミングでは、エピゲノム制御が果たす役割が非常に大きい。本研究では、卵・初期胚のエピゲノム制御因子の機能解析により、生殖細胞が受精により全能性を獲得するゲノムリプログラミングにおけるDNAとヒストンのメチル化修飾制御の役割を部分的に明らかにした。

研究成果の概要(英文): During life cycle of multicellular organisms, different cells and tissues acquire different programs of gene expression. For most of cell types in the body, programs for gene expression become fixed once the cells differentiate. However, some cells in the body undergo "reprogramming" of gene expression in normal developmental situation. In particular, the ultimate reprogramming happens after fertilization by which differentiated-cell gametes acquire totipotency as undifferentiated totipotent cells. Epigenome plays a major role in the reprogramming. In this study, we identified regulatory factors for DNA and histone methylation in mouse preimplantation embryos and partly revealed roles of these epigenome in the reprogramming.

研究分野：生命科学

キーワード：エピゲノム 初期胚 リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

我々ヒトを含めた哺乳類では、個体を構成する種々の細胞は分化の過程で異なる遺伝子発現プログラムを受け、細胞運命が決定される。分化した細胞では、遺伝子発現プログラムが固定されるが、一部の細胞ではリプログラミングされる。生体内で起こる究極のリプログラミングは、高度に最終分化した配偶子が、受精を介して一個体を形成できる全能性を獲得する過程である。このゲノムリプログラミング機構を理解することは、「生命とは何か」を解明すること、そして今後益々発展すると予想される細胞運命の人為的制御を用いた再生医療の発展に必要不可欠である。ゲノムリプログラミングでは、エピゲノム制御が果たす役割が非常に大きく、人為的ゲノムリプログラミング産物であるクローン動物、iPS 細胞では不十分なゲノムリプログラミングによるエピゲノム異常が明らかにされている。特に注目すべきは、エピゲノム異常の中心が DNA とヒストンのメチル化修飾という点である。エピゲノム変化では、クロマチン上の古い化学修飾の消去と新しい修飾の付加が起こるが、メチル化修飾の可逆性は近年まで不明であり大きな議論の的だったのである。そこで研究代表者は、エピゲノム制御機構の解明にあたり、まずヒストンのメチル化修飾消去機構の解明に取り組み、世界で初めて新規のヒストン脱メチル化酵素ファミリーとして JmJc ドメイン含有タンパク質ファミリーを同定し、ヒストンの脱メチル化が真核生物に共通したメチル化の制御機構であることを証明することで、エピジェネティクス研究にパラダイムシフトを起こした [引用文献 -]。

一方で、これらの研究から学んだのは、メチル化修飾消去機構をはじめ、エピゲノム制御は生物種、生理過程及び細胞の種類により異なるメカニズムを用いているということでもあった。特に、哺乳類のエピゲノム制御機構については体細胞を中心に研究が進められ、生殖細胞における制御機構はその生化学的解析の困難さと相俟って不明な点が多く残されている。生殖細胞では体細胞には存在しないような制御因子が存在するため、生殖細胞のエピゲノム制御機構を解明するには、生殖細胞特異的な制御因子の同定・機能解析が必要不可欠である

2. 研究の目的

本研究では、DNA とヒストンのメチル化修飾制御を中心とした卵・初期胚のエピゲノム制御因子の網羅的同定と機能解析により、生殖細胞が受精により全能性を獲得するゲノムリプログラミングにおけるエピゲノム制御機構の解明を試みた。

3. 研究の方法

生殖細胞が受精により全能性を獲得するゲノムリプログラミングにおけるエピゲノ

ム制御機構について、3つのステージ(卵細胞の能力獲得・ゲノムリプログラミングの中心的エピゲノム制御・エピゲノムによるクロマチン構造変換制御)に分けて、それぞれのステージにおける制御因子の機能解析(卵形成・受精・初期発生における生理的役割、エピゲノム制御機構における役割、活性制御機構)を下記のように行った。(図1)。

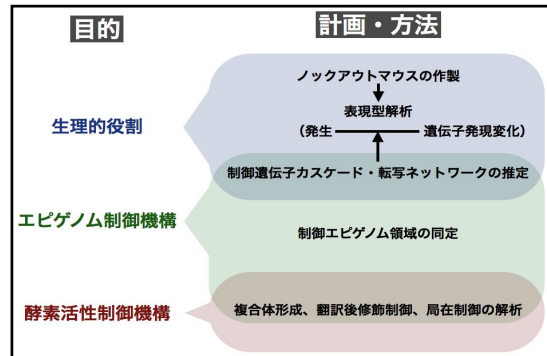


図1: 卵・初期胚特異的のエピゲノム制御因子の解析

4. 研究成果

(1) 雄性 DNA 脱メチル化(酸化)の発生およびエピゲノム制御機構における役割の解明

哺乳類では、受精後の1細胞期胚において、雄性 DNA のゲノムワイドな脱メチル化が起こる。最近、この DNA 脱メチル化には、メチル化 DNA の酸化が関与していることが報告され、メチル化 DNA 酸化酵素 TET3 がその責任分子である可能性が示唆された。申請者もそれらの報告と独立して同様の結果を見出していた。そこで、ゲノムリプログラミングの中心的エピゲノム制御機構と考えられていた雄性 DNA 脱メチル化(酸化)の発生およびエピゲノム制御機構における役割を解析した。

TET3 のエピゲノム制御機構について、TET3 の卵母細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析から、TET3 が受精卵における DNA 酸化の責任分子であることを確認した。

DNA 酸化酵素 TET3 の卵形成・受精・初期発生における役割について、TET3 の卵母細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスを作製し、TET3 欠損の胚発生への影響を調べた。その結果、TET3 の欠損は産仔数に顕著な影響を与えず、胚発生に必須ではないことを明らかにした。これは、これまでの概念と異なり、初期胚で起こるメチル化 DNA の酸化が発生に必須ではないことを示唆するものである。一方、TET3 の欠損により新生仔の死亡率は顕著に高くなることから、TET3 は新生仔の生存・成長に必要なことが示唆された。

TET3 の欠損胚では胚性遺伝子の転写が促進されることを見出し、TET3 が胚性遺伝子の発現を抑制する役割を果たし、遺伝子発現の fine tuning に寄与していることを明らかにした。

TET3 の活性制御機構について、特異的抗

体を用いた免疫染色を中心とした解析から TET3 がヒストン H3 のバリエーションが存在するクロマチン領域にリクルートされる可能性を見出した。

(2) 初期胚のクロマチン構造構築におけるエピゲノム制御機構とその役割の解明

上述の雄性 DNA の脱メチル化は、ゲノムワイドに起こるが、インプリンティング遺伝子を始めとする脱メチル化を免れる領域が存在する。研究代表者は、新たに核小体周辺の雄性 DNA が脱メチル化から免れる領域であることを見出し、この DNA 領域の脱メチル化からの防御機構に関与する分子として HDAC1-3 を同定した。1 細胞期胚では、この核小体周辺の雄性 DNA から major satellite repeats の転写が起こるが、これは chromocenter (セントロメアのヘテロクロマチン同士が会合し、多くの染色体が束ねられた集合体) の形成に関与し、初期胚のクロマチン構造構築に重要な役割を果たす。そこで、初期胚のクロマチン構造構築におけるエピゲノムの役割を解析した。

核小体周辺領域の雄性 DNA 脱メチル化 (酸化) 防御機構について、HDAC1-3 の特異的阻害剤とノックアウトマウスを用いた研究から、HDAC1-3 によるヒストンのアセチル化レベルの調整がヒストンバリエーションによる置換を阻害することで核小体周辺に存在する雄性 DNA 脱メチル化 (酸化) を防御していることを明らかにした。

雄性 DNA 脱メチル化 (酸化) 防御機構の転写制御における役割について、HDAC1-3 の特異的阻害剤を用いた研究から、メチル化 DNA の酸化レベルの調整が核小体周辺に存在する major satellite repeats の転写を適切なレベルに調節していることを明らかにした。

(3) ヒストン脱メチル化酵素の卵形成・初期発生およびエピゲノム制御機構における役割の解明

研究代表者は、JmJc ファミリーに属するヒストン脱メチル化酵素 KDM7 が卵母細胞に特異的に高発現し、発生に伴い発現が速やかに減少することを見出したため、KDM7 の卵形成・初期発生およびエピゲノム制御機構における役割を解析した。

ヒストン脱メチル化酵素 KDM7 の卵形成・受精・初期発生における役割について、KDM7 の卵母細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスを作製し、KDM7 欠損の産仔数への影響を調べた。その結果、KDM7 の欠損は産仔数に顕著な影響を与えないことを明らかにし、KDM7 が胚発生に必須ではないことが示唆された。

卵母細胞に特異的に発現する KDM7 の特異的阻害剤の開発に成功した。

生殖細胞が受精により全能性を獲得する

ゲノムプログラミングにおけるエピゲノム制御機構およびその生理的役割は解明が始まったばかりである。その中で、特筆すべき本研究の成果は、これまでゲノムプログラミングおよび発生に大変重要であると考えられてきた哺乳類受精卵における雄性 DNA 脱メチル化 (酸化) が、実は必須ではないことを明らかにしたことである。今後は、生殖細胞の受精による全能性獲得機構だけでなく、体細胞核移植胚の全能性獲得機構にまで対象を広げて研究を推進する予定であるが、エピゲノムの変化を誘導するメカニズムは重要であると考えられ、本研究を進展させた制御因子の同定・機能解析による研究の進展が期待できる。

<引用文献>

- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M. E., Borchers, C. H., Tempst, P., Zhang, Y.: Histone demethylation by a family of JmJc domain-containing proteins. *Nature (Article)*, 439: 811-816 (2006).
- Yamane, K., Toumazou, C., Tsukada, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J., Zhang, Y.: JHDM2A, a JmJc-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell*, 125: 483-495 (2006).
- He, J., Kallin, E. M., Tsukada, Y., and Zhang, Y.: The H3K36 demethylase Jhdm1b/Kdm2b regulates cell proliferation and senescence through p15Ink4b. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15: 1169-75 (2008).
- Tsukada, Y., Ishitani, T., and Nakayama, K. I.: KDM7 is a dual demethylase for histone H3 Lys 9 and Lys 27 and functions in brain development. *Genes Dev. (selected as cover)*, 24: 432-7 (2010).

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5件)

Someya, K., Nakatsukasa, H., Ito, M., Kondo, T., Tateda, K. I., Akanuma, T., Koya, I., Sanosaka, T., Kohyama, J., Tsukada, Y., Takamura-Enya, T., and Yoshimura, A.: Improvement of Foxp3 stability through CNS2 demethylation by TET enzyme induction and activation. *Int. Immunol.* (査読有り), 29, 2017, 365-375.

Tsukada, Y., Akiyama, T., and

Nakayama, K. I.: Maternal TET3 is dispensable for embryonic development but is required for neonatal growth. *Sci. Rep.*(査読有り), 5, 2015, 15876.

Hatanaka, Y., Inoue, K., Oikawa, M., Kamimura, S., Ogonuki, N., Kodama, E. N., Ohkawa, Y., Tsukada, Y., Ogura, A.: Histone chaperone CAF-1 mediates repressive histone modifications to protect preimplantation mouse embryos from endogenous retrotransposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(査読有り), 112, 2015, 14641-14646.

Shi, Y., and Tsukada, Y.: The discovery of histone demethylases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*(査読無し), 2013, doi:p11: a017947. 10.1101/cshperspect.a017947.

Suzuki, T., Ozasa, H., Itoh, Y., Zhan, P., Sawada, H., Mino, K., Walport, L., Ohkubo, R., Kawamura, A., Yonezawa, M., Tsukada, Y., Tumber, A., Nakagawa, H., Hasegawa, M., Sasaki, R., Mizukami, T., Schofield, C., Miyata, N.: Identification of the KDM2/7 Histone Lysine Demethylase Subfamily Inhibitor and its Antiproliferative Activity. *J. Med. Chem.*(査読有り), 56, 2013, 7222-7231.

〔学会発表〕(計 12 件)

Maemura, M., Developmental potential of single blastomere derived from pre-implantation embryo in mouse, Consortium of Biological Science 2017, 2017

束田裕一, マウス着床前初期胚に存在する全能性細胞の評価, さきがけ「エピジェネティクスの制御と生命機能」第 2 回終了領域研究会, 2017

Nakajima, Y., Developmental potential of single mouse blastomere, World Congress of Reproductive Biology 2017, 2017

束田裕一, マウス着床前初期胚に存在する全能性細胞の評価, さきがけ「エピジェネティクスの制御と生命機能」第 1 回終了領域研究会, 2016

中島友紀, マウス着床前初期胚が有する全能性の評価, 日本分子生物学会第 39 回年会, 2016

中島友紀, 生殖細胞を用いた遺伝資源保存システムの構築, 日本畜産学会サマーキャンプ, 2016

中島友紀, 哺乳類着床前初期胚でおこるメチル化 DNA 酸化の個体発生における役割, 日本分子生物学会第 38 回年会・日本分子生化学会第 88 回年会合同大会, 2015

Tsukada, Y., Chemical modifications of chromatin, 9th International Symposium on Nanomedicine, 2015

Tsukada, Y., Regulation mechanism of DNA oxidation in mammalian zygote, 8th Annual Conference of Asia Epigenome Alliance and 2nd Taipei Epigenetics and Chromatin Meeting, 2013

束田裕一, A unique regulatory phase of chromatin modification in the early mammalian embryo, 第 86 回日本生化学会大会, 2013

Tsukada, Y., Mechanism of epigenome regulation in early embryo development, The Fukuoka International Symposium on Genomics & Epigenomics 2013, -Expanding Frontiers of Genomic Science-, 2013

Tsukada, Y., Regulation of chromatin demethylation, The 8th International Symposium of the Institute Network, 2013

〔図書〕(計 8 件)

Kaneda, A., Tsukada, Y. (Editor), Springer Nature, DNA and Histone Methylation as Cancer Targets, 2017, 624

束田裕一(分担執筆), 羊土社, 実験医学, 2017, 2785-2789

束田裕一(分担執筆), 近代科学社, ナノバイオ・メディシン「細胞核内反応とゲノム編集」, 2017, 72-84

Shi, Y., Tsukada, Y.(分担執筆), Cold Spring Harbor Press, Epigenetics 2nd edition, 2015, 13-15

束田裕一(分担執筆), 東京化学同人, 遺伝子発現制御機構, 2017, 46-58

束田裕一(分担執筆), ナノ学会, The

Bulletin of the Nano Science and
Technology, 2014, 85-92

束田裕一(分担執筆), 医学書院, 生体
の科学, 2014, 349-356

束田裕一(分担執筆), 化学同人, エピ
ジェネティクス, 2013, 67-89

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tsukada-lab.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

束田 裕一 (TSUKADA, Yuichi)

九州大学・稲盛フロンティア研究センター・
教授

研究者番号：90444801

(2) 連携研究者

中島 友紀 (NAKAJIMA, Yuiki)

九州大学・稲盛フロンティア研究センター・
特任助教

研究者番号：50743126