

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18545

研究課題名(和文)新規DNA脱メチル化因子を用いたiPS細胞誘導時の体細胞リプログラミングの改善

研究課題名(英文)Functional analysis of newly identified DNA demethylation factors in mouse ES cells and its application to somatic cell reprogramming

研究代表者

畑中 勇輝(Hatanaka, Yuki)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・特別研究員

研究者番号：70719450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：受精卵のDNA脱メチル化に重要なGSEとその相互作用因子でH3R17me2a酵素Mettl23を、多能性細胞の樹立へ応用することを目的に、各KOES細胞を作製し機能解析を行った。ゲノムDNAを用いた各メチル化産物のドットプロット解析では、野生型と比べて大幅な変化は認められなかったが、特定の領域ではKOES細胞で5fCの量が有意に増加し、この変換に必須のTDGの蓄積量は減少していた。さらにH3R17me2阻害剤TBBD添加ES細胞ではGSEとH3.3の蓄積量の減少が認められた。以上より、特定の領域において、GSE及びMettl23はES細胞においてもDNA脱メチル化への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To explore the application to improvements of somatic nuclear reprogramming, we focused on GSE and H3R17me2a enzyme Mettl23 which are newly identified DNA demethylation factors in mouse zygotes. To this end, we first produced their KO mice and investigated the effect of GSE and Mettl23 deficient on the DNA demethylation in ESCs. The levels of 5mC and its oxidative products were not significantly different between wild type (WT) ESCs and these KO. Interestingly, the level of 5fC was significantly increased in their KOESCs on the promoter regions that undergo DNA demethylation in zygote. The loss of GSE and Mettl23 resulted in the impairment of recruitment of TDG, which excises 5fC and 5CaC. The treatment of TBBD (ellagic acid), which specifically inhibits methylation at H3R17, resulted in the reduction of recruitment of GSE and Histone H3.3 on the target regions. These results suggested that GSE and Mettl23 are responsible for DNA demethylation on defined regions in ESCs.

研究分野：分子発生生物学

キーワード：受精卵 ES細胞 DNA脱メチル化 エピジェネティックリプログラミング エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞樹立における体細胞リプログラミングの不完全な DNA 脱メチル化と受精卵の DNA 脱メチル化機構の違い

iPS 細胞は Oct4, Sox2, Klf4, 及び c-Myc を体細胞に強制的に発現させることで作製できる (Yamanaka et al., 2006)。しかし、ドナー体細胞によって DNA 脱メチル化状態が異なり、これが iPS 細胞から特定の体細胞への誘導効率に影響を与えることが知られている (Kim et al., 2010)。これは体細胞リプログラミング過程において、完全でない DNA 脱メチル化状態に起因している。さらに、リプログラミングには数週間必要であり、ヒストン修飾の変化の後、DNA 脱メチル化は day12 以降とすぐには引き起こされないことが知られている (Polo et al., 2012)。これに対し、受精卵の DNA 脱メチル化はリプログラミング開始後わずか数時間で正確に引き起こされることが知られている。

近年、受精卵において、酸化酵素 TET3 タンパク質による 5mC から 5hmC への変換 (5mC のヒドロキシル化) が能動的 DNA 脱メチル化を引き起こしていることが明らかになっている (Gu et al., 2011)。我々はこれまでに、母性 GSE タンパク質は TET3 依存の DNA 脱メチル化に重要な因子であることを明らかにし (Hatanaka et al., 2013)、さらに、最新の研究結果から、GSE タンパク質はヒストン H3.3 と相互作用し、さらに新規に同定したヒストン H3 における 17 番目のアルギニン残基の非対称性ジメチル化 (H3R17me2a) を修飾する酵素 Mett123 と相互作用し機能することで、DNA 脱メチル化を促進させることを見出した (Hatanaka et al., 査読中)。このように、受精卵の DNA 脱メチル化は、母性因子による DNA 脱メチル化のための足場として H3R17me2a 修飾によるエピジェネティックな制御が重要であることが示唆されている。

2. 研究の目的

(1) 新規 DNA 脱メチル化因子が ES 細胞における DNA 脱メチル化に果たす役割を調べる。

受精卵において DNA 脱メチル化に機能している GSE 及び Mett123 を、体細胞リプログラミング過程の DNA 脱メチル化へ応用するために、多能性細胞として最も品質の高いマウス ES 細胞において、GSE 及び Mett123、さらに H3R17me2a が DNA 脱メチル化に果たす役割について調べる。

(2) iPS 細胞の不完全な DNA 脱メチル化の改善

体細胞リプログラミング過程における DNA 脱メチル化の改善を目的として、(1) で明らかになった多能性細胞における GSE 及び Mett123 の制御機構を踏まえて、体細胞では発現していない GSE の過剰発現と Mett123 の

共強制発現を iPS 細胞誘導時に行うことで、iPS 細胞樹立時における DNA 脱メチル化状態の改善を目指す。

3. 研究の方法

(1) GSE 及び Mett123 欠損 ES 細胞を用いた解析

GSE 及び Mett123 のノックアウト (KO) ES 細胞を樹立し解析に用いる。これら ES 細胞における DNA 脱メチル化に及ぼす影響について調べるために、5mC やその酸化産物である 5hmC、5fC、及び 5CaC の Dot blot 解析を行う。また、受精卵において DNA 脱メチル化される領域である Oct4、Nanog、及び Dnmt3b のメチル化 DNA 免疫沈降 (Methylated DNA immunoprecipitation; MeDIP) 解析やクロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation; ChIP) 解析を行い、GSE や Mett123 が ES 細胞で果たす役割を詳細に調べる。その後、ゲノムワイドな解析を行い、受精卵と ES 細胞において GSE 及び Mett123 が DNA 脱メチル化に果たす役割の関係性について調べる。

(2) GSE 及び Mett123 強制発現体細胞の樹立とその細胞を利用した iPS 細胞樹立とその品質改善

多能性細胞における GSE 及び Mett123 の機能と制御領域を明らかにしたあと、これらノックアウトマウスの体細胞を用い iPS 細胞を誘導し、GSE 及び Mett123 が iPS 細胞樹立過程の DNA 脱メチル化に及ぼす影響を明らかにする。次に、野生型の体細胞に、GSE と相互作用因子 Mett123 を強制発現させることで、DNA 脱メチル化を促進できるかどうかを明らかにする。その後、樹立できた iPS 細胞の多分化能性の評価を行うと同時に、DNA 脱メチル化状態を調べる。

4. 研究成果

(1) GSE 及び Mett123KOES 細胞における Dot blot 解析

CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により GSE 及び Mett123 ノックアウト (KO) マウスを作製し (Hatanaka et al., 査読中)、KOES 細胞をそれぞれ樹立した。これら ES 細胞のゲノム DNA を用いた Dot blot 解析を行うために、まずコントロールとなる各シトシン産物を用いた抗 5mC、抗 5hmC、抗 5fC、及び抗 5CaC 抗体の特異性を調べた (図 1)。

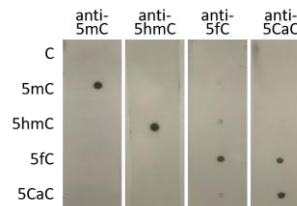


図1: 各抗体を用いたDotblot解析

その結果、5mC、5hmC、及び 5fC の抗体特異性が確認できたため、以下の実験では 5mC、5hmC、及び 5fC 抗体を用いた解析を行うこと

とした。GSE 及び Mett123KOES 細胞における Dot blot 解析を行ったところ、5mC と 5hmC 量は GSEKO (GKO) ES 細胞で野生型 (WT) よりも多い傾向にあった (図 2)。5fC 量は GKO 及び Mett123KO (MKO) ES 細胞で減少している傾向が認められた。受精直後の前核期胚において、GSE 及び Mett123 欠損は 5mC が増加し 5hmC が減少することから、ES 細胞における GSE 及び Mett123 の機能は初期胚とは異なることが示唆された。

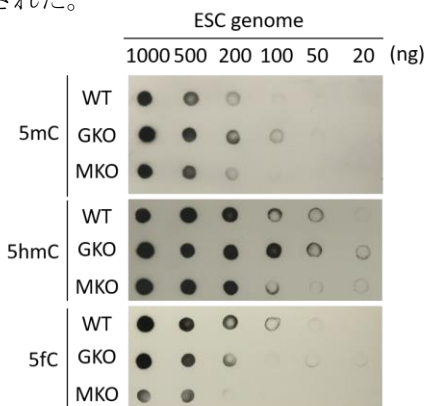


図2: WT, GSEKO, 及びMett123KOES細胞ゲノムを用いたDotblot解析

(2) GSE 及び Mett123KOES 細胞における MeDIP, hMeDIP 及び fMeDIP 解析

次に、GSE 及び Mett123 欠損が特定の領域における DNA メチル化レベルに及ぼす影響を調べるために、GSE 及び Mett123KOES 細胞を用いた MeDIP, hMeDIP 及び 5fC DIP 解析を行った。受精卵において DNA 脱メチル化される領域として知られる Oct4, Nanog, 及び Dnmt3b のプロモーター領域を調べた結果、WTES 細胞と比べて GKO 及び MKOES 細胞では特に 5fC 産物の蓄積量が有意に増加しているこ

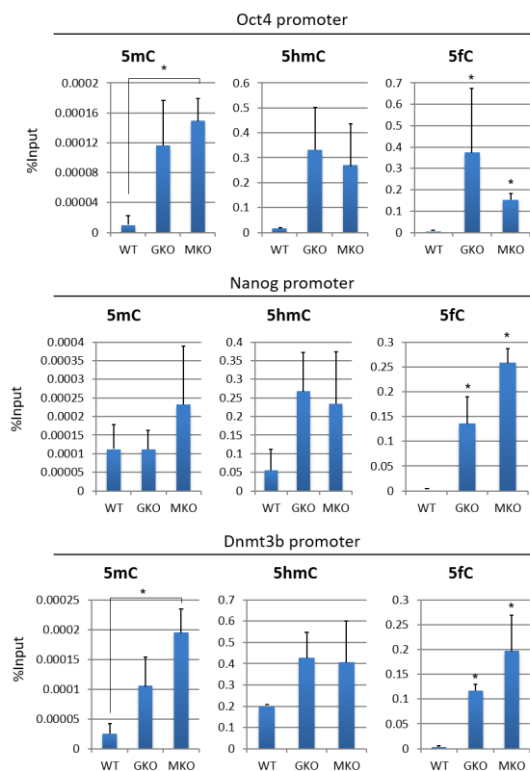


図3: 各プロモーター領域におけるMeDIP, hMeDIP, 及びfMeDIP解析

とが明らかになった (図 3)。ゲノムレベルの Dot blot 解析と MeDIP 解析において異なる傾向が観察されたことから、ES 細胞において GSE 及び Mett123 は領域特異的な DNA 脱メチル化制御に役割を果たすことが示唆された。
(3) GSE 及び Mett123KOES 細胞における TDG タンパク質の ChIP 解析

5mC は Tet タンパク質により 5hmC や 5fC などに酸化され、5fC や 5CaC などのメチル化中間産物は TDG タンパク質による塩基除去修復によりシトシンへと変換されることが知られる。そこで次の実験では GSE 及び Mett123 欠損が TDG タンパク質のリクルートに及ぼす影響について、5fC の蓄積が認められた Oct4, Nanog, 及び Dnmt3b 領域で調べた (図 4)。その結果、WTES 細胞に比べて GSE 及び Mett123KOES 細胞では、TDG の蓄積量がいずれの領域においても減少していることが明らかになった。このことから、GSE 及び Mett123 は特定の領域において TDG のリクルートを促進することにより DNA 脱メチル化を制御していることが示唆された。

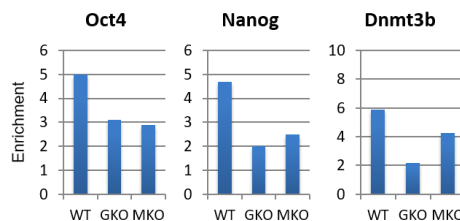


図4: 各プロモーター領域におけるTDGタンパク質のChIP解析

(4) H3R17me2 阻害剤 TBBD 添加 ES 細胞における GSE 及び H3.3 の ChIP 解析

Mett123 は H3R17me2a を触媒する酵素であることが明らかとなっている (Hatanaka et al., 査読中)。また、受精卵の雄性ゲノムにおいて、H3R17me2 が H3 バリエントのうち H3.3 の取り込みに重要であることを見出した (図 5; Hatanaka et al., 査読中)。

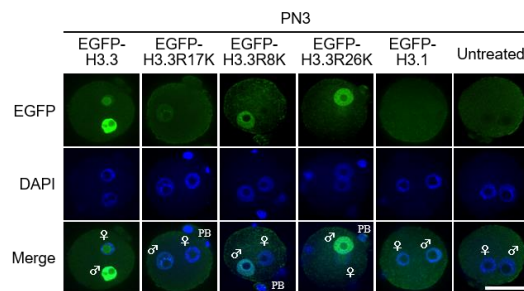


図5: H3.3R17の変異がH3.3のリクルートに及ぼす影響

そこで次の実験では、H3R17me2 阻害剤 TBBD 処理が ES 細胞における H3.3 のリクルートに及ぼす影響について調べた (図 6)。その結果、TBBD 添加した ES 細胞では、Oct4, Nanog, 及び Dnmt3b 領域において H3R17me2a の蓄積が減少し、GSE 及び H3.3 の蓄積量が減少していることが明らかになった。このことから、H3R17me2a は ES 細胞においても、少なくとも特定の領域への GSE タンパク質のリクルート

に重要であり、ヒストン H3 バリエントである H3.3 の取り込みに必要であることが示唆された。

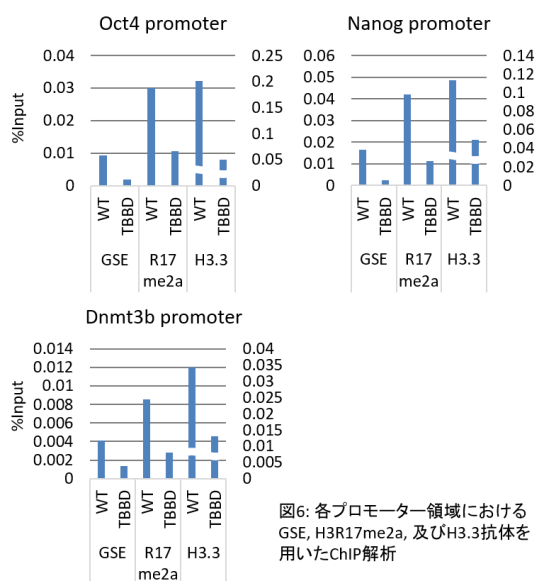


図6: 各プロモーター領域における GSE, H3R17me2a, 及び H3.3 抗体を用いた ChIP 解析

(5) まとめ

受精卵で DNA 脱メチル化に重要な機能を有する GSE と Mett123 が多能性細胞における DNA 脱メチル化に果たす役割について調べた。その結果、ゲノム DNA を用いた Dot blot 解析では、予想と反して、GSE と Mett123 は多能性細胞でも高品質とされるマウス ES 細胞では、受精卵とは異なる役割を果たしていることが示唆された。受精卵で DNA 脱メチル化される領域では、GSE 及び Mett123 欠損は TDG のリクルートを減少させ、それにより DNA 脱メチル化を抑制することが示唆されるデータを得た。さらに、Mett123 酵素により触媒される H3R17me2 の阻害は、特定の領域において GSE 及び H3.3 のリクルートを減少させることが明らかになった。

ES 細胞と受精卵で GSE と Mett123KO の表現型が異なったため、ES 細胞における DNA 脱メチル化機構を GSE と Mett123 の機能解析から明らかにするアプローチに切り替え実験をおこなった。今回の結果より、ES 細胞においても特定の領域では GSE 及び Mett123 は DNA 脱メチル化機能に関与していることが示された。今後、ES 細胞における GSE と Mett123 による DNA 脱メチル化の領域的な制御と、H3R17me2 依存のヒストン H3 バリエント H3.3 の取り込み制御との関係性を明らかにする必要があるが、受精卵において DNA 脱メチル化に必須な因子 GSE と Mett123 を、体外培養系で最も高品質な多能性細胞であるマウス ES 細胞を用いて解析することで、多能性細胞における DNA 脱メチル化機構の新たな知見の獲得が期待される。これにより得られる知見は、体細胞から多能性細胞を樹立する際に、受精卵や ES 細胞のように、より完全な DNA 脱メチル化の誘導に繋がる重要な知見となることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Inoue K, Hirose M, Inoue H, Hatanaka Y, Honda A, Hasegawa A, Mochida K, Ogura A. The rodent-specific microRNA cluster within the Sfbmt2 gene is imprinted and essential for placental development. *Cell Rep* (in press), 査読有。

2. Hirose M, Hasegawa A, Mochida K, Matoba S, Hatanaka Y, Inoue K, Goto T, Kaneda H, Yamada I, Furuse T, Abe K, Uenoyama Y, Tsukamura H, Wakana S, Honda A, Ogura A. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in wild-derived mice: generation of tamed wild-derived strains by mutation of the a (nonagouti) gene. *Sci Rep* 7:42476. (2017). 査読有. DOI: 10.1038/srep45285

3. Inoue H*, Ogonuki N*, Hirose M*, Hatanaka Y*, Matoba S, Chuma S, Kobayashi K, Wakana S, Noguchi J, Inoue K, Tanemura K, Ogura A. Mouse D1Pas1, a DEAD-box RNA helicase, is required for the completion of first meiotic prophase in male germ cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 478(2):592-8. (2016). 査読有. *:Equal contribution DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.07.109.

4. Hatanaka Y, Inoue K, Oikawa M, Kamimura S, Ogonuki N, Kodama EN, 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 U S A*. 112(47):14641-6. (2015). 査読有. DOI: 10.1073/pnas.1512775112.

5. Kurotaki YK, Hatanaka Y, Kamimura S, Oikawa M, Inoue H, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A. Impaired Active DNA Demethylation in Zygotes Generated by Round Spermatid injection. *Hum Reprod*. 30(5):1178-87. (2015). 査読有. DOI: 10.1093/humrep/dev039.

[学会発表] (計 6 件)

1. Hatanaka Y, Shimizu N, Morita K, Satoh M, Honda A, Hirose M, Kamimura S, Ogonuki N, Nakamura T, Inoue K, Hosoi Y, Nakano T, Matsumoto K, Ogura A, "Histone H3R17me2a mark recruits Tet3 to initiate active DNA demethylation in mouse zygotes" *Mouse Genetics* 2016, 2016年8月13~16日, フロリダ(米国)

2. 畑中勇輝, 越後貫成美, 廣瀬美智子, 本多新, 井上貴美子, 松本和也, 小倉淳郎「マウス受精卵における能動的 DNA 脱メチル化制御因子の役割」第 109 回日本繁殖生物学会、2016年9月12~15日、麻布大学(神奈川県・相模原)

3. 畑中勇輝, 井上貴美子, 及川真実, 上村悟氏, 越後貫成美, 児玉栄一, 大川恭行, 束田裕一, 小倉淳郎「着床前胚においてヒストンシヤペロン CAF-1 は抑制性ヒストン修飾を調節することでレトロトランスポゾン抑制に機能する。」第 38 回日本分子生物学会大会、2015 年 12 月 1~4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
4. 畑中勇輝, 井上貴美子, 及川真実, 上村悟氏, 越後貫成美, 児玉栄一, 大川恭行, 束田裕一, 小倉淳郎「マウス着床前胚におけるレトロトランスポゾン抑制機構の解明」第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月 17~19 日、宮崎大学 (宮崎市)
5. 畑中勇輝, 清水なつみ, 守田昂太郎, 佐藤学, 本多新, 廣瀬美智子, 上村悟氏, 越後貫成美, 中村肇伸, 井上貴美子, 細井美彦, 仲野徹, 松本和也, 小倉淳郎, 招聘講演 “Histone H3R17me2a Mark Recruits Tet3 to Initiate Active DNA Demethylation in mouse Zygotes” 第 40 回内藤コンファレンス、2015 年 9 月 15~18 日、シャトラーゼガトーキングダムサッポロ (北海道・札幌市)
6. 畑中勇輝, 招聘講演「受精卵における能動的 DNA 脱メチル化機構」第 60 回日本生殖医学会学術講演会、2015 年 4 月 26~29 日、パシフィコ横浜 (横浜市・神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑中 勇輝 (HATANAKA, Yuki)
国立研究開発法人理化学研究所・バイオリ
ソースセンター・特別研究員
研究者番号 : 70719450