

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570206

研究課題名（和文） 哺乳類の発生、分化とヒストン脱メチル化の研究

研究課題名（英文） Study of histone demethylation for mammalian development and differentiation

研究代表者

立花 誠 (TACHIBANA MAKOTO)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：80303915

研究成果の概要：ヒストンの脱メチル化による遺伝子発現制御機構を解明する目的で、それを触媒する酵素の機能解析を行った。ヒストン脱メチル化酵素、JHDM2 は A, B, C の 3 種があり、それぞれについてノックアウトマウスの表現型を調べた。そのうちで、JHDM2A 遺伝子改変マウス雄は不妊の表現型を示した。雄の不妊の原因をさらに詳細に調べた結果、減数分裂期のヒストン H3 のリジン 9 のメチル化が亢進していた。この事実によって、雄特異的な減数分裂期の積極的な脱メチル化反応が JHDM2A によって触媒されることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：生殖細胞、転写、クロマチン、ヒストン

1. 研究開始当初の背景

ヒストンのリジン残基のメチル化は、化学的に非常に安定な修飾であることから、

細胞分裂を経ても安定に継承されうる、言わば細胞の長期記憶を司る媒体として機能すると考えられていた。しかしながら、

近年相次いでヒストン脱メチル化酵素が同定されるに及び、実際には細胞の発生、分化に対応してダイナミックに変動していることが予想されている。ヒストン脱メチル化酵素は生化学的な性質は明らかになっているものの、未だ高等動物、特に哺乳類における発生や分化といった、高次生命現象にどのように機能しているのか、全く分かっていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、ヒストン脱メチル化酵素、JHDM2 と高次生体機能の関わりを解明する。また、成体でのモデル系として生殖細胞系列での機能解明も行う。具体的に 2 年間の研究期間で、以下のことを明らかにする。

- (1) ヒストン脱メチル化酵素 JHDM2A の遺伝子改変マウスの解析により、マウス胎児の発生への寄与の解明。
- (2) JHDM2A の生殖細胞特異的な遺伝子改変マウスの解析により、生殖細胞の発生分化に対する寄与の解明。

3. 研究の方法

H19 年度は JHDM2A 遺伝子改変マウスの作成と JHDM 特異的抗体の作成を行った。H20 年度では、H19 年度にて作成したマウスの表現型の解析を行った。まずは、JHDM2 遺伝子改変マウスの表現型、特に胎児発生に異常がないかを調べた。さらに成体において、生殖能力に異常が無いかを各 JHDM2A 遺伝子改変マウスにおいて調べた。各 JHDM 欠損マウスを交配して 2 重遺伝子破壊マウスを作成し、機能の重複性を調べた。

4. 研究成果

- (1) JHDM2 遺伝子単独欠損マウスの表現型の解析

JHDM2A 及び JHDM2C の遺伝子破壊マウスは、

メンデルの法則にしたがって生まれてくることが分かった。また、JHDM2A 欠損マウスは、生後 3-4 ヶ月から顕著に肥満の症状を示した。このことは、JHDM2A が通常では肥満を抑える働きを有していることを示した。一方で、JHDM2C の遺伝子破壊マウスには肥満傾向は見られなかった。これまでに JHDM2C の遺伝子破壊マウスに顕著な表現型は検出されていない。

JHDM2B の遺伝子破壊マウスは新生児の段階で、メンデルの法則から予想される数のおよそ 2 分の 1 程度しか生まれてこなかった。このことから、一部は胎生期に死亡していると考えられた。また、出生した仔のうち、約半数が離乳前に死亡した。成体に達したマウスな体重が対照の兄弟（ヘテロ接合型）の半分から 3 分の 2 程度であった。これらの事実は、JHDM2B が個体の発生に重要（必須ではない）であることを示した。成体に達した JHDM2B 遺伝子破壊マウスの雌雄ともに生殖能力を備えていた。

- (2) JHDM2 が生殖細胞の分化に果たす機能について

上述の通り、JHDM2B, C の欠損マウスは生殖能力に問題は無かったが、JHDM2A の欠損マウスは雄が不妊であった（雌は生殖能力を有している）。この事実を踏まえ、成体雄の精巢の切片、および生殖細胞の分化過程の解析を行ったところ、成熟精子が見られず、Round spermatid の段階で分化が停止していた。

- (3) JHDM2A-C の機能の重複性の解析

上述の通り、JHDM2A-C の各単独欠損マウスは成体までの成育が可能であった。次に、遺伝子機能の重複性を調べる目的で、AB、BC、CA の各 2 重遺伝子破壊マウスの表現型を調べた。その結果、AC、BC の 2 重破壊マウスは成体まで発育可能であった。このことは AC、BC 間には少なくとも発生に関しては、機能の

重複性がないことを支持する。反面、ABの2重破壊マウスは胎生致死であった。そればかりか、ABのどちらかがホモ接合型で、残りがヘテロ接合型のマウスも胎生致死であった。統計としてまとめたものを表1に示した。このことは、JHDM2AとBは互いに機能を補っており、また、胎児の発生に必須であることを示した。

2A	W			H			K		
2B	W	H	K	W	H	K	W	H	K
産仔数	5	13	0	13	15	0	9	0	0
産仔 (%)	9	24	0	24	28	0	16	0	0
予想 (%)	6	13	6	13	25	13	6	13	6

表1. JHDM2A、2Bの2重欠損マウスの表現型

JHDM2A、2Bの両アレルがヘテロであるマウス同士を交配させ、生まれた産仔の遺伝子型判別を行った。

2AはJHDM2Aの遺伝子型を示す。

2BはJHDM2Bの遺伝子型を示す。

産仔数は上記の遺伝子型を有した新生児の数を示す。

産仔(%)は総産仔数に占める、上記遺伝子型産仔数の割合。

予想(%)はメンデルの法則から予測される、上記遺伝子型の産仔数の割合。

図のピンク部に示すように、JHDM2A、2Bの遺伝子量が少ない産仔は生まれてこなかった。

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3件)

① A Jumonji (Jarid2) protein complex

represses cyclin D1 expression by methylation of histone H3-K9

Shirato H, Ogawa S, Nakajima K, Inagawa M, Kojima M, Tachibana M, Shinkai Y, and Takeuchi T.

J. Biol. Chem. 284:733-739, 2009 (査読有)

② G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription

Tachibana M, Matsumura Y, Fukuda M, Kimura H, and Shinkai Y.

The EMBO journal 27:2681-2690, 2008 (査読有)

③ Functional Dynamics of H3K9 Methylation During Meiotic Prophase Progression

Tachibana M, Nozaki M, Takeda N, and Shinkai Y.

The EMBO journal 26:3346-3359, 2007 (査読有)

[学会発表] (計4件)

① 立花 誠 (2008. 12. 7)、神戸、ヒストンメチル化酵素複合体による転写制御機構
第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会シンポジウム

② 立花 誠 (2008. 1. 8)、東京
ヒストンメチル化酵素複合体による転写調節機構
文部科学省科学研究費補助金「特定領域研究」2領域合同公開シンポジウム
「クロマチンシグナリングの分子機構」

③ 立花 誠 (2007. 12. 11)、横浜
ヒストンメチル化酵素複合体によるクロマチン構造変換
第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会 合同大会ワークショップ

「遺伝子発現に向けた核内シグナリング」

④立花 誠(2007. 7. 15)、東京

ヒストンのメチル化によるエピジェネティック制御機構

第28回、日本炎症、再生医学会ワークショップ「Epigenetic Control of Stem Cells」

[図書] (計1件)

牛島俊和ら、羊土社、

実験医学別冊、エピジェネティクス実験プロトコール、2008、286 ページ (180-185)

[その他]

home

page: <http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/mousemodel.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立花 誠 (TACHIBANA MAKOTO)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：80303915

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者