

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21249016

研究課題名（和文） 発生・分化におけるエピジェネティクス制御機構の解明

研究課題名（英文） Epigenetic Regulation in Development and Differentiation

研究代表者

仲野 徹 (NAKANO TORU)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：00172370

研究成果の概要（和文）：

エピジェネティクス制御は多細胞体の発生・分化においてきわめて重要なものであり、細胞分化は、エピジェネティクス状態が確立していく過程ととらえることも可能である。本研究では、① 初期発生の DNA メチル化制御因子 PGC7/Stella の解析、② 血液細胞分化におけるエピジェネティック制御、③ マウス PIWI ファミリー遺伝子の機能解析、についての研究をおこなった。

その結果、①では、PGC7/Stella は、初期胚において、ヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化 (H3K9me2) を介してクロマチンに結合すること、また、能動的脱メチル化の阻害は、メチル化シトシンをヒドロキシメチル化シトシンへと転換する酵素である Tet3 のクロマチンへの結合を阻害することによって生じること、が明らかとなった。② では、転写因子は、発現するタイミングにおいて機能が異なること、そして、その機能にはエピジェネティクス制御が関与すること、を明らかにした。また、③ では、マウス PIWI ファミリーの機能解析には GS 細胞 (Germline stem cell) が極めて有用であることを明らかにし、そのシステムを用いることにより piRNA の生合成に関与するタンパクを同定した。さらに、人為的な piRNA 誘導システムの開発をおこなった。

研究成果の概要（英文）：

Establishment of epigenetic state is critically important for development and differentiation of multicellular organisms. In this project, we carried out following three issues on the establishment of epigenetic status.

1. Function of PGC7/Stella, a regulator of DNA methylation in early embryos. : PGC7/Stella has the effect to prevent “active DNA demethylation” in early embryos. We identified that the binding of PGC/Stella to H3K9me2 (dimethylated lysine 9 of histone H3) is critically important for the function. During the course of this project, Tet protein plays critical roles in active DNA demethylation by converting 5-methyl cytosine to 5-hydroxymethyl cytosine. Based on this data, we revealed that the binding of Tet-3, the most abundant Tet protein in early embryos, to chromatin is inhibited by PGC7.
2. We analyzed the function of GATA-1 transcription factor using in vitro hematopoietic differentiation induction system from ES cells. Controlled expression of GATA-1 at different time points showed that the function of the factor is quite varied dependent on the time point and its different roles were controlled by epigenetic mechanisms.
3. We find that GS cells (Germline stem cells) are a quite useful resource for studying

the biogenesis of piRNA and that the initial phase of piRNA production is carried out in the cells. Using GS cells, we succeeded to identify a protein involved in piRNA biogenesis. In addition, we established a novel experimental system to induce piRNA and subsequent DNA methylation in the transgenic mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	13,400,000	4,020,000	17,420,000
2010年度	12,100,000	3,630,000	15,730,000
2011年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
年度			
年度			
総計	36,900,000	11,070,000	47,970,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、医化学一般

キーワード：DNAメチル化、ヒストン修飾、エピジェネティクス、クロマチン、遺伝子発現、悪性腫瘍

1. 研究開始当初の背景

多細胞体の発生・分化には、遺伝子発現制御が重要な役割を果たしている。そして、その制御には、塩基配列そのものの変化ではなく、DNAのメチル化、あるいは、DNAに結合するヒストンの修飾、といったエピジェネティックな制御が極めて重要である。その修飾酵素については次々と明らかにされつつあるが、細胞分化が進行するにつれて、いかにして特定の遺伝子が修飾をうけるのか、また、逆に、特定の遺伝子のエピジェネティック制御が、どのように細胞分化に関与しているのか、などは不明のまま残されている。さらに、DNAメチル化制御については、メチル化酵素だけではなく、脱メチル化酵素も存在すると考えられているが、その実体は全く明らかになっていない。本研究では、幹細胞システムを中心に、これらのエピジェネティックな遺伝子制御機構と、その生物学的意義の解明に挑戦するものである。

2. 研究の目的

我々の研究室では、初期胚および多能性幹細胞、血液細胞、そして、生殖細胞、の三つの幹細胞システムを対象に、細胞の分化機構についての研究をおこなってきた。全く異なった系において開始した研究であるが、そのいずれの成果もが、期せずして、エピジェネティック制御に直接的に関わるものであることが明らかとなってきた。そこで、本研究では、これまでの研究成果に立脚し、複数の幹細胞システムにおいて、エピジェネテ

ィック制御がどのようにおこなわれているのかを明らかにしていくことを主目的にした研究を展開する。下記のように、① 初期発生のDNAメチル化制御因子PGC7/Stellaの解析、② 血液細胞分化におけるエピジェネティック制御、③ マウスPIWIファミリー遺伝子の機能解析、についての研究をおこなう。

(1) 初期発生のDNAメチル化制御因子PGC7/Stellaの解析：PGC7/Stellaの機能解析ならびにDNA脱メチル化酵素のクローニングでは、単にDNAメチル化制御の解析にとどまらず、その成果を用いて、新たなDNAメチル化制御法の開発をめざすものであり、細胞分化のみならず、癌研究などにも波及効果をおよぼしうるものである。

(2) 血液細胞分化におけるエピジェネティック制御：血液細胞分化では、転写因子の欠損は、転写因子複合体の異常を引き起こし、それが血液細胞の産生異常をひき起こすと考えられていた。しかし、我々の予備的成果はそれを覆すものであり、「転写因子の欠損→エピジェネティック制御の破綻→血液細胞分化の異常」、という新しい観点から細胞分化をとらえなおす、極めてユニークなものである。

(3) マウスPIWIファミリー遺伝子の機能解析：新しいsmall RNAであるpiRNAは、DNAメチル化を含むエピジェネティックな制御に関与していると考えられ、精子形成を中心に精力的に解析が進められているが、その機

能はほとんどが不明なまま残されている。その piRNA を産生するための鍵になる PIWI ファミリータンパクの piRNA 産生および DNA メチル化における機能を解析する。

3. 研究の方法

(1) 初期発生の DNA メチル化制御因子 PGC7/Stella の解析: PGC7 がどのようにして、メチル化 DNA を初期胚において能動的 DNA メチル化から保護しているかを明らかにするため、ES 細胞および初期胚を用いて、種々の検討をおこなった。

(2) 血液細胞分化におけるエピジェネティック制御: ES 細胞から血液細胞への試験管内分化誘導法—OP9 システム—を用いて、GATA-1 のコンディショナルな欠損や誘導を駆使した解析をおこなった。

(3) マウス PIWI ファミリー遺伝子の機能解析: piRNA 生合成に関与する遺伝子の機能解析をノックアウトマウスや、GS 細胞 (Germline Stem Cell) を駆使しておこなう。また、新しい人為的 piRNA 誘導システムの開発を試みる。

4. 研究成果

(1) 初期発生の DNA メチル化制御因子 PGC7/Stella の解析

PGC7 が能動的脱メチル化を阻害する機構を解析するため、まず、PGC7 がクロマチンの何を認識して結合しているかの解析をおこなった。ノックアウト ES 細胞や、受精卵における mRNA マイクロインジェクションの研究をおこなった結果、ヒストン修飾、すなわちヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化 (H3K9me2) を介してクロマチンに結合することが明らかとなった。

能動的 DNA 脱メチル化の分子機構は長い間謎であったが、本研究期間中に、Tet タンパクがメチル化シトシンをヒドロキシメチル化シトシンに変換する過程が重要であるという論文があいついで報告された。そこで、初期胚において高発現している Tet である Tet3 に対する PGC7 の機能解析をおこなった。その結果、PGC7 は Tet3 と直接結合はしないが、Tet3 のクロマチンへの結合を阻害することが明らかとなった。

(2) 血液細胞分化におけるエピジェネティック制御: GATA-1 の機能は、その発現タイミングによって大きく異なること、また、その機能制御はエピジェネティック制御によるものであること、を明らかにすることができた。また、Runx1 遺伝子の造血における機能解析をおこなった。

(3) マウス PIWI ファミリー遺伝子の機能解析: piRNA の生合成を解析するための材料として、GS 細胞がきわめて有用であることを明

らかにした。また、MILI 欠損 GS 細胞を用いて、MILI が piRNA 生合成の早い段階において機能することを明らかにした。さらに、この方法を用いて、MILI と結合する piRNA 合成に重要なタンパクを同定することができた。

piRNA を介した DNA メチル化制御については、任意のトランスジーンに対して piRNA の合成を人為的に誘導するシステムの開発に成功した。また、このシステムでは、DNA のメチル化も誘導されることを明らかにした。

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 22 件) すべて査読あり

1. Nakamura T, Liu YU, Nakashima H, Umehara H, Inoue K, Matoba S, Tachibana M, Ogura A, Shinkai Y, Nakano T.

PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5MeC to 5HmC in early embryos
Nature, in press, 2012

2. Ohishi K, Nakano T.

Essential role of DPPA3 for chromatin condensation in mouse oocytogenesis.
FEBS J, 279:832-43, 2012

3. Liu YJ, Nakamura T, Nakano T.

Essential role of DPPA3 for chromatin condensation in mouse oocytogenesis.
Biol Rep, 86:1-8, 2012

4. Matoba S, Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Mizutani E, Ogonuki N, Nakamura T, Abe K, Nakano T, Ishino F, Ogura A.

RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos.
Proc Natl Acad Sci USA, 108:20621-6, 2011

5. Ichianagi K, Li Y, Watanabe T, Ichianagi T, Fukuda K, Kitayama J, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Yabuta Y, Seki Y, Saitou M, Sasaki H.

Locus- and domain-dependent control of DNA methylation at mouse B1 retrotransposons during male germ cell development
Genome Res, 21:2058-66, 2011.

6. Tanaka T, Hosokawa M, Vagin VV, Reuter M, Hayashi E, Mochizuki AL, Kitamura K, Yamanaka H, Kondoh G, Okawa K, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Sachidanandam R, Hannon GJ, Pillai RS,

- Nakatsuji N, Chuma S.
Tudor domain containing 7 (Tdrd7) is essential for dynamic ribonucleoprotein (RNP) remodeling of chromatoid bodies during spermatogenesis.
Proc Natl Acad Sci USA, 108:10579–10584, 2011
7. Sasaki M, Kawahara K, Nishio M, Mimori K, Kogo R, Hamada K, Itoh B, Wang J, Komatsu Y, Yang YR, Hikasa H, Horie Y, Yamashita T, Kamijo T, Zhang Y, Zhu Y, Prives C, Nakano T, Mak TW, Sasaki T, Maehama T, Mori M, Suzuki A
Regulation of the MDM2-P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11
Nat Med, 17: 944–951, 2011
8. Kitajima K, Minehata K, Sakimura K, Nakano T, Hara T
In vitro generation of HSC-like cells from murine ESCs/iPSCs by enforced expression of LIM-homeobox transcription factor Lhx2
Blood, 117:3748–3758, 2011
9. Watanabe T, Tomizawa S, Mitsuya K, Totoki Y, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Iida N, Hoki Y, Murphy PJ, Toyoda A, Gotoh K, Hiura H, Arima T, Fujiyama A, Sado T, Shibata T, Nakano T, Lin H, Ichiyanagi K, Soloway PD, Sasaki H.
Role for piRNAs and a novel non-coding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrf1* locus
Science, 332:848–852, 2011
10. Kimura T, Nakano T
Induction of pluripotency in primordial germ cells
Histol Histopathol, 26:643–650, 2011
11. Ikegami D, Akiyama H, Suzuki A, Nakamura T, Nakano T, Yoshikawa H, Tsumaki N
Sox9 sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through Pik3ca-Akt pathways
Development, 138:1507–1519, 2011
12. Watanabe T, Chuma S, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Totoki Y, Toyoda A, Hoki Y, Fujiyama A, Shibata T, Sado T, Noce T, Nakano T, Nakatsuji N, Lin H, Sasaki H
MitoPLD Is a Mitochondrial Protein Essential for Nuage Formation and piRNA Biogenesis in the Mouse Germline
Dev Cell, 20:364–375, 2011
13. Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, Marques J, Zakhartchenko V, Boiani M, Arand J, Nakano T, Reik W, Walter J
5-hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming
Nature Commun, 2:241, 2011
14. Tanaka SS, Yamaguchi YL, Steiner KA, Nakano T, Nishinakamura R, Kwan KM, Behringer RR, Tam PP
Loss of Lhx1 activity impacts on the localization of primordial germ cells in the mouse
Dev Dyn, 239:2851–9, 2011
15. Huang CL, Cheng JC, Kitajima K, Nakano T, Yeh CF, Chong KY, Tseng CP
Disabled-2 is required for mesoderm differentiation of murine embryonic stem cells
J Cell Physiol, 225:92–105, 2010
16. Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Takamatsu K, Chuma S, Kojima-Kita K, Shiromoto Y, Asada N, Toyoda A, Fujiyama A, Totoki Y, Shibata T, Kimura T, Nakatsuji N, Noce T, Sasaki H, Nakano T.
MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons
Genes Dev, 24:887–892, 2010
17. Yamano N, Kimura T, Watanabe-Kushima S, Shinohara T, Nakano T.
Metastable primordial germ cell-like state induced from mouse embryonic stem cells by Akt activation
Biochem Biophys Res Commun, 392:311–316, 2010
18. Shoji M, Tanaka T, Hosokawa M, Reuter M, Stark A, Kato Y, Kondoh G, Okawa K, Chujo, Suzuki T, Hata K, Martin S, Noce T, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Sasaki H, Pillai RS, Nakatsuji N, Chuma S.
The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline
Dev Cell, 17:775–787, 2009
19. Yoshimura T, Toyoda S, Kuramochi-Miyagawa S, Miyazaki T, Miyazaki S, Tashiro F, Yamato E, Nakano T, Miyazaki J.
Gtsf1/Cue110, a gene encoding a protein with two copies of a CHHC Zn-finger motif,

is involved in spermatogenesis and retrotransposon suppression in murine testes.

Dev Biol, 335:216-217, 2009

20. Kojima K, Kuramochi-Miyagawa S, Chuma S, Tanaka T, Nakatsuji N, Kimura T, Nakano T.

Associations between PIWI proteins and TDRD1/MTR-1 are critical for integrated subcellular localization in murine male germ cells.

Genes Cells, 14:1155-1165, 2009

21. Unhavaithaya Y, Hao Y, Beyret E, Yin H, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Lin H. MILI, a piRNA binding protein, is required for germline stem cell self-renewal and appears to positively regulate translation.

J Biol Chem, 284:6507-6519, 2009

22. Sakai E, Kitajima K, Sato A, Nakano T. Increase of hematopoietic progenitor and suppression of endothelial gene expression by Runx1 expression during in vitro ES differentiation.

Exp Hematol. 37:334-345, 2009.

[学会発表] (計20件)

国際学会、シンポジウムのみ記載

1. Nakano T, DNA Methylation and Hydroxymethylation, MBSJ 2011, Dec.16, 2011, Yokohama, Japan

2. Nakano T, Epigenetic Gene Regulation and GATA factors. Tohoku University Global COE 1st International Symposium. Dec.8, 2009, Sendai, Japan

3. Nakano T, Epigenetic Gene Regulation and GATA factors. International Society of Experimental Hematology. Sep.11, 2009, Athens, Greek

4. Nakano T, DNA Methylation in Early Embryogenesis. Epigenetics: New Horizons in Japan and Scandinavia, Sep. 6, 2009, Stockholm, Sweden

5. Nakano T, DNA Methylation in Early Embryogenesis. From Imprinting to the Epigenome. Sep.4, 2009, Cambridge, UK

6. 研究組織
(1) 研究代表者

仲野 徹 (NAKANO TORU)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：00172370

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：