

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29日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700451

研究課題名（和文）ヒストン修飾因子変異マウスが不妊症を呈するメカニズムの解析

研究課題名（英文）Analyses of mutant mice lacking histone modification factors.

研究代表者

成瀬 智恵（NARUSE CHIE）

金沢大学・学際科学実験センター・助教

研究者番号：30372486

研究成果の概要（和文）：我々が作製したHP1 γ 変異マウスを解析した結果、減数分裂の進行時にHP1 γ はセントロメア近傍におけるヒストン修飾因子のリクルートに必須であることが明らかになった。また、減数分裂以前の始原生殖細胞（PGC）の増殖にもHP1 γ が必須であることを明らかにした。さらに、ヒストン脱メチル化酵素の変異マウスは骨格の発生に異常を起こして出生直後致死となること、骨格の発生異常はHox遺伝子の発現制御の異常によることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We generated HP1 gamma mutant mice and found that histone methylation at pericentromeric heterochromatin was reduced in the mutant germ cells at meiosis. Next, we found that HP1 gamma is essential for cell cycle progression of primordial germ cells (PGC). Moreover, we found that histone demethylase regulates expression of Hox genes, and the demethylase-deficient mice died perinatally.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：実験動物学、発生生物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：発生・分化、生殖細胞、マウス、ヒストン修飾、遺伝子改変動物

1. 研究開始当初の背景

近年、DNAのメチル化やヒストンの修飾によって、転写因子または転写抑制因子のDNAへの結合能が変化することにより、遺伝子の発現様式が制御されることがわかってきた（Bioessays 22:836-45, 2000; Science 293:1074-80, 2001）。この制御機構は、DNA塩基配列の変化を伴わずに子孫や分裂後の娘細胞に伝達され（エピジェネティック制御）、特に、細胞の多能性の維持や分化、そ

の性質の維持に重要な役割を担うことがわかってきた。

また、DNAのメチル化やヒストンの修飾が、生殖細胞の分化においても重要であることが、遺伝子変異マウスを用いた研究から明らかになってきた。ヒストンリジンメチル化を担うSuv39hやMeisetz, G9aの変異マウスでは、精母細胞の第一減数分裂期に染色体が完全に分配されずに生殖細胞が死滅してしまう（Cell 107:323-37, 2001; Nature

438:374-8, 2005; EMBO J 26:3346-59, 2007)。これらの変異マウスではヒストンメチル化の低下が観察されているが、そのことと生殖細胞の異常との関係は不明であった。我々は、ヒストン修飾因子の1つである HP1 γ の変異マウスを用いて、セントロメア周辺のヒストンメチル化が減数分裂開始時の染色体対合に必須であることを見出した。しかし、精原細胞の維持や分化とヒストン修飾の関係は不明であった。

一般的にヒストン H3 の 27 番目のリジン (H3K27) のメチル化は転写抑制的に働くと考えられている。ES 細胞などの幹細胞では、分化した細胞に発現する遺伝子のプロモーター部位を H3K27 メチル化修飾することによって、これらの発現を抑制しており、分化の際に遺伝子を活性化するためには H3K27 脱メチル化酵素が必要であると考えられている (Nat Rev Genet 8: 9-22, 2007; Cell 125: 315-26, 2006)。また、免疫染色の結果から、未分化精原細胞では H3K27me₂, me₃ のシグナルがドット状に強く観察されるが、分化が進むにつれて染色強度が弱くなるのが観察されている (Dev Biol 293: 461-72, 2006) ので、精原細胞の発生の進行には H3K27 脱メチル化が必要であることが予想された。

2. 研究の目的

(1) HP1 γ 変異マウスにおいて PGC の増殖に異常が起こる分子メカニズムの解析と、(2) H3K27me₃ の脱メチル化酵素の変異マウスまたはコンディショナル変異マウスの生殖細胞の解析を行うことで、ヒストン修飾が生殖細胞発生に及ぼす影響の一端を解明することを目的とした。

(1) については、精原細胞において、HP1 γ はエピジェネティック制御因子として遺伝子発現制御を行っていることが予想されるので、PGC の遺伝子発現プロファイリングを行い、HP1 γ が欠損したことによる遺伝子発現変化を網羅的に調べて、PGC の正常な細胞増殖に必要な遺伝子群を検索した。また、その時のヒストン修飾の変化や、これらにリクルートされる因子の変化についても調べ、PGC におけるヒストン修飾関連因子の相互関係を明らかにしようと試みた。

(2) についてはマウスにおける H3K27me₃ 脱メチル化酵素は 2 つあるので、それぞれの単独およびダブル変異マウスを作製して、生体内での H3K27me₃ 脱メチル化酵素の機能を明らかにすることを試みた。致死となる場合は Jmjd3、Utx 生殖細胞特異的変異マウスを用いて生殖細胞の発生への影響を調べることにした。

3. 研究の方法

(1) について HP1 γ 変異 PGC を用いて発現ア

レイ解析を行った。PGC を用いたタンパク質の解析は、PGC の数が数百-数千個と非常に少なく困難であったので、培養系を用いての解析を試みた。HP1 γ は PGC 及び PGC 周辺の体細胞である生殖隆起にも発現しているため、どちらの細胞において HP1 γ が欠損していることが PGC の細胞周期に影響しているのか判断できなかった。そこで、PGC の培養系を用いて、PGC のみが増殖できる環境下で HP1 γ 変異 PGC が増殖可能かどうかを検討した。また、発現アレイ解析によって、PGC では発現せず、分化した細胞に発現するような遺伝子の発現が上昇していたので、PGC の未分化性が失われている可能性が考えられた。そこで、PGC から EG 細胞の樹立を試み、アルカリフォスファターゼ染色によって EG 細胞を確認することで、PGC の性質が変化していないかどうかを調べた。

(2) について 2 つのうちの 1 つのヒストン脱メチル化酵素の変異マウスを作製したところ、単純変異マウスは出生直後致死となった。そこで、原因を調べるために組織学的に観察した。骨格の異常が認められたので、骨格形成に関係の深い Hox 遺伝子などについて野生型と変異胚での発現を調べて比較した。さらに、非常に小さな組織である尾芽における Hox 遺伝子座のヒストン修飾を、クロマチン免疫沈降法を用いて調べた。

4. 研究成果

(1) HP1 γ 変異マウスの解析

2 年間の研究により、HP1 γ 変異 PGC の数が減少しているのは細胞周期が G1 期で停滞し、HP1 γ 変異 PGC では p21 陽性の細胞が増加していることがわかった。また、フィーダー細胞を用いた培養実験により、PGC 周辺組織ではなく PGC そのものでの HP1 γ の変異が原因であることを明らかにした。さらに HP1 γ 変異 PGC を培養すると EG 細胞を形成することから PGC の性質は変化していないことを明らかにして論文にまとめた (Abe et al., Biology of Reproduction 2011)。また、減数分裂のパキテン期に染色体の対合異常により成熟精子および成熟卵子が形成できないことを明らかにした。減数分裂の初期より HP1 γ 変異生殖細胞のセントロメア周辺では H3K9me₂ が減少しており、H3K9 をジメチル化する G9a もリクルートされなかった。また、G9a 変異生殖細胞における表現型は HP1 γ 変異生殖細胞とよく似ていた。対照的に、H3K9me₃ は変化しなかったことから、HP1 γ は生殖細胞において H3K9me₃ があるクロマチン領域に G9a をリクルートし、H3K9me₂ の修飾を入れることが示唆された (Takada and Naruse et al., Development 2011)。

(2) ヒストン脱メチル化酵素の欠損マウスの作製

2つあるヒストンH3K27脱メチル化酵素遺伝子のうち1つについて解析を進めた。この遺伝子の単純ノックアウトでは出生直後致死であり、遺伝子発現パターンを解析した結果骨格形成、形態形成に必須な遺伝子群の制御に異常があることを明らかにした。発現量に変化の見られたHox遺伝子領域のヒストン修飾を調べた結果、遺伝子発現を負に制御するヒストン修飾が遺伝子変異胚では残存しており、脱メチル化が効率よく行われていないことがわかった。また、それらの遺伝子の上流因子も調べたが野生型と遺伝子変異胚で違いが認められなかったため、この脱メチル化酵素が直接Hox遺伝子群の発現を制御していることが示唆された。

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) 全て査読あり

1. Takada Y*, Naruse C*, Costa Y* (*equal contribution), Shirakawa T, Tachibana M, Sharif J, Kezuka-Shiotani F, Kakiuchi D, Masumoto H, Shinkai Y, Ohbo K, Peters AH, Turner JM, Asano M and Koseki H. "HP1 γ links histone methylation marks to meiotic synapsis in mice." *Development* 138 4207-17, Oct 2011 doi: 10.1242/dev.064444

2. Abe K, Naruse C, Kato T, Nishiuchi T, Saitou M and Asano M. "Loss of Heterochromatin Protein 1 gamma reduces the number of primordial germ cells via impaired cell-cycle progression in mice." *Biology of Reproduction* 85 1013-24, Nov 2011 doi:10.1095/biolreprod.111.091512

3. Nishie T, Hikimochi Y, Zama K, Fukusumi Y, Ito M, Yokoyama H, Naruse C, Ito M, Asano M. "Beta4-galactosyltransferase-5 is a lactosylceramide synthase essential for mouse extra-embryonic development." *Glycobiology* 20: 1311-22, Oct 2010 doi: 10.1093/glycob/cwq098

[学会発表] (計9件)

1. 阿部 可奈恵、成瀬 智恵、斎藤 通紀、浅野 雅秀「始原生殖細胞の発生と分化における HP1 γ の機能解析」ポスター発表 第4回日本エピジェネティクス研究会年会、2010年

5月28日、米子市文化ホール(鳥取県米子市)

2. 目黒-堀家牧子、宮野勝、杉原一司、成瀬智恵、久郷裕之、押村光雄、浅野雅秀、堀家慎一「ヒト15番染色体を保持したトランスクロモソミックマウスの作出」ポスター発表 第4回日本エピジェネティクス研究会年会、2010年5月28日、米子市文化ホール(鳥取県米子市)

3. Kanae Abe, Chie Naruse, Tomoaki Kato, Takumi Nishiuchi, Mitunori Saitou, Masahide Asano 「The role of heterochromatin protein 1 (HP1) γ in primordial germ cells」 poster presentation the Mouse Development, Genetics & Genomics meeting 2010, Oct. 27th 2010 (Cold Spring Harbor Laboratory, USA)

4. Toshikazu Nishie, Yoko Hikimochi, Kota Zama, Yoshiyasu Fukusumi, Mitutoshi Ito, Haruka Yokoyama, Chie Naruse, Makoto Ito, and Masahide Asano 「 β 4-galactosyltransferase-5 is a lactosylceramide synthase essential for mouse extra-embryonic development」 poster presentation BMB2010, Dec. 10th 2010, Kobe Portisland (Kobe Convention Center, Kobe, Hyogo)

5. Kanae Abe, Chie Naruse, Tomoaki Kato, Takumi Nishiuchi, Mitunori Saitou, Masahide Asano 「Heterochromatin protein 1 γ is essential for primordial germ cells proliferation」 poster presentation, ポスター発表 分子生物学会第11回シンポジウム、2011年5月25日、石川県立音楽堂(石川県金沢市)

6. 阿部可奈恵、成瀬智恵、斎藤通紀、浅野雅秀「HP1 γ 欠損による PGC の減少は細胞周期進行の異常による」ポスターおよび口頭発表 生殖サイクル若手勉強会、2011年7月15日、大阪アカデミア(大阪府大阪市)

7. 成瀬智恵、柴田進和、阿部可奈恵、川口隆之、浅野雅秀「Kdm6b 欠損マウスの解析」ポスター発表 生殖サイクル若手勉強会、2011年7月14日、大阪アカデミア(大阪府大阪市)

8. 阿部可奈恵、成瀬智恵、加藤智明、西内巧、斎藤通紀、浅野雅秀「HP1 γ 欠損による PGC の減少は細胞周期進行の異常による」特定領域研究「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」口頭発表 第4回公開シンポジウム、2011年11月17日、千里ライ

フサイエンスセンター（大阪府豊中市）

9. 成瀬智恵、柴田進和、阿部可奈恵、川口隆之、浅野雅秀「マウス Kdm6b の欠損はホメオティックトランスフォーメーションを引き起こす」ポスターおよび口頭発表 第34回分子生物学会年会、2011年12月13日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

〔その他〕

ホームページ

<http://kiea.w3.kanazawa-u.ac.jp/tglab/tganimHP>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成瀬 智恵 (NARUSE CHIE)

金沢大学・学際科学実験センター・助教

研究者番号：30372486

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし