

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：34204

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770224

研究課題名（和文）メチル化制御因子 PGC7 の分子機能の解析

研究課題名（英文）Analysis of molecular function on DNA methylation regulator PGC7

研究代表者

中村 肇伸 (NAKAMURA TOSHINOBU)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・講師

研究者番号：80403202

研究成果の概要（和文）：本研究では、受精卵の雄性ゲノムにおいて、5メチル化シトシン（5mC）の消失に伴い、5ヒドロキシルメチル化シトシン（5hmC）が蓄積することを明らかにした。また、PGC7は9番目のリジンがジメチル化されたヒストンH3を認識してクロマチンと結合することにより、受精卵において雌性ゲノムを5mCから5hmCへの変換から保護することを見出した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) accumulated in the paternal genome along the rapid disappearance of 5-methylcytosine (5mC). In addition, we revealed that PGC7 binds di-methylated histone H3K9 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in maternal genome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：クロマチン、受精卵、DNAメチル化、ヒストンメチル化

1. 研究開始当初の背景

DNAのメチル化状態は、初期発生においてダイナミックに変化する。受精後すぐに、精子に由来する雄性ゲノム、卵子に由来する雌性ゲノム、いずれにおいても、大規模なDNAの脱メチル化が生じる。この過程において、雌性ゲノムでは、DNA複製にともない受動的な脱メチル化が生じるのに対して、雄性ゲノムではDNAの複製が開始される以前から、能動的な脱メチル化が生じる。このDNA脱メチル化のタイミングの「ずれ」は、エピジェネティック不均等性とよばれ、正常な発生に必須と考えられている。また、雄性ゲノムと雌性ゲノムが区別される現象であるゲノムインプリンティングも哺乳類の発生・分化に必須であり、この現象もDNAのメチル化により制御されている。しかし、これらの現象におい

て、どのようにDNAメチル化が制御されているかについては、DNAメチル化酵素（DNA methyl transferase; DNMT）が関与すること以外、その重要性にもかかわらず、ほとんど未知のまま残されていた。

PGC7 (Stella, Dppa3) は、初期胚、始原生殖細胞、卵細胞において特異的に発現し、受精後に細胞内局在が細胞質から核へと変化するタンパク質である。申請者は、PGC7を欠損する卵では、雌性ゲノムが雄性ゲノムと同じ時期に脱メチル化され、発生が正常に進行しないこと、インプリント遺伝子のDNAメチル化が十分に維持されないこと、を見いだした (Nakamura, T. et al. Nature Cell Biol. 2007)。この結果は、PGC7は、雌性ゲノムのDNAメチル化を能動的脱メチル化から保護する機能を有し、エピジェネティック不

均等性の形成に必須であることを示している。しかし、雌雄両方の前核に存在する PGC7 がどのようにして雌性ゲノムを特異的に能動的 DNA 脱メチル化から保護しているのかは不明のまま残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、分子生物学的、生化学的、および発生工学的手法を用いることにより、PGC7 の分子機能を解明し、受精卵における能動的 DNA 脱メチル化の分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ES 細胞を用いた PGC7 の機能解析

野生型の ES 細胞、PGC7 を欠損する ES 細胞、H3K9 のメチル化酵素 G9a を欠損する ES 細胞、および DNA のメチル化酵素である Dnmt1/3a/3b を欠損する ES 細胞を実験材料として用いた。

PGC7 とクロマチンの *in vitro* での結合は、上記 ES 細胞から精製したクロマチンと大腸菌で発現、精製した PGC7 を用いてゲルシフトアッセイを行うことにより検討した。

PGC7 とクロマチンの *in vivo* での結合は、上記 ES 細胞と PGC7、修飾ヒストン特異的抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行うことにより検討した。

PGC7 がヌクレアーゼ活性に及ぼす影響は、上記 ES 細胞と Micrococcal nuclease (MNase) を用いて MNase アッセイを行うことにより検討した。

(2) PGC7 の分子機能の解析

野生型および PGC7 を欠損する卵子から得た受精卵を材料として用いた。受精卵は、パラホルムアルデヒド (PFA) で固定した後、特異的抗体を用いて免疫蛍光染色法により解析した。

4. 研究成果

(1) ES 細胞を用いた PGC7 の機能解析

受精卵の雌性クロマチンには、5-メチルシトシン (5mC) と 9 番目のリジンがジメチル化されたヒストン H3 (9H3K9me2) が存在しているのに対して、雄性クロマチンではこれらの修飾がほとんど認められない。そこで、PGC7 が H3K9me2 を認識することにより、雌性クロマチンと特異的に結合しているという仮説を立て、研究を行った。まず、H3K9me2 がほとんど存在しない G9a ノックアウト ES 細胞を用いて PGC7 とクロマチンの結合に H3K9me2 が影響を与えるかどうかを調べた。その結果、G9a ノックアウト ES 細胞から精製したクロマチンは、野生型の ES 細胞から精製したクロマチンに比べて PGC7 との結合が有意に弱まることわかった。次に、PGC7 ノ

ックアウト ES 細胞および PGC7 を発現させた PGC7 ノックアウト ES 細胞を用いたクロマチン免疫沈降実験を行い、PGC7 が H3K9me2 を含むクロマチンと特異的に結合することを明らかにした。また、競合的ヒストンペプチド結合実験から、PGC7 は H3K9me2 と最も強く結合することがわかった。このことから、PGC7 は直接ヒストンテールに結合していることが示唆された。さらに、クロマチン免疫沈降実験から、野生型の ES 細胞において PGC7 は H3K9me2 が存在する Magea2 と Wfdc15a 領域に結合するが、H3K9me2 が存在しない Oct3/4 領域には結合しないことがわかった。一方、G9a ノックアウト ES 細胞では、PGC7 の Magea2 と Wfdc15a 領域への結合が認められなくなった。これらのことから、PGC7 は *in vivo* で H3K9me2 が存在するクロマチンと特異的に結合していることが明らかとなった。

PGC7 と H3K9me2 との結合が機能的であるかどうかを調べるために、PGC7 がクロマチン DNA を基質とする酵素である MNase 活性に与える影響を検討した。その結果、PGC7 を発現させた野生型の ES 細胞において、MNase 活性が阻害されることがわかった。しかし、この阻害効果は G9a ノックアウト ES 細胞では全く認められなかった。また、G9a ノックアウト ES 細胞に G9a を発現させた場合には、PGC7 による MNase 活性の阻害が回復した。これらのことから、PGC7 は H3K9me2 依存的にクロマチン DNA を保護することが示された。

(2) PGC7 の分子機能の解析

通常の免疫染色法では、サンプルを PFA 等で固定した後、TritonX-100 等で処理を行う。しかし、この方法では核内に存在するタンパク質は、クロマチンとの結合の有無に関係なく同じように染色される。そこで、サンプルを TritonX-100 で前処理することにより、クロマチンとの結合が弱いタンパク質を洗い流した後、免疫染色を行った。その結果、通常の免疫染色では、雌雄両方の前核に検出される PGC7 が TritonX-100 で前処理を行った場合には、雌性前核にのみ検出されるようになった。すなわち、PGC7 は雌性クロマチンと強く結合していることが明らかとなった。次に、この結合が H3K9me2 を介したものであるかどうかを検討するために、受精卵に H3K9me1/2 に特異的な脱メチル化酵素である Jhdm2a (Kdm3a) を強制発現させた。その結果、Jhdm2a を発現させた場合には H3K9me2 が脱メチル化され、PGC7 と雌性クロマチンの結合が解除された。さらに、Jhdm2a を発現させた受精卵において、雌性ゲノムの 5mC が 5hmC へと変換されることがわかった。これらのことから、PGC7 は H3K9me2 を認識して雌性クロマチンと結合することにより、雌性ゲノムを特異的に 5mC から 5hmC への変換から保護し

ていることが明らかとなった。

これまでの研究から、受精卵における 5mC から 5hmC への変換には Tet3 が関与することが明らかにされていた。そこで、ES 細胞を用いて PGC7 が Tet3 のクロマチンへの結合に与える影響を検討した。PGC7 ノックアウト ES 細胞に Tet3 を単独で発現させたところ、Tet3 はクロマチンと結合することがわかった。一方、PGC7 ノックアウト ES 細胞に PGC7 と Tet3 を共発現させた場合には、PGC7 はクロマチンに結合していたが、Tet3 はクロマチンと結合していなかった。このことから、PGC7 は Tet3 のクロマチンとの結合を阻害することがわかった。次に、C 末端を欠質させた PGC7 Δ C 変異体を用いて同様の実験を行ったところ、PGC7 Δ C はクロマチンとは結合したが、Tet3 のクロマチンへの結合は阻害しないことがわかった。さらに、PGC7 Δ C は全長の PGC7 とは異なり MNase 活性を阻害しないことが示された。

PGC7 による Tet3 の阻害の分子機構には、PGC7 と Tet3 のクロマチンへの競合的結合、PGC7 による立体障害、PGC7 によるクロマチンのコンフォメーション変化、の 3 つの可能性が考えられる。しかし、PGC7 Δ C がクロマチンと結合するにも関わらず、Tet3 のクロマチンと結合を阻害しなかったことから、PGC7 が Tet3 と競合してクロマチンと結合している可能性は否定された。次に、PGC7 (約 17kDa) は、コアヒストン (約 100kDa) に対して小さいこと、PGC7 がヒストンのテールに結合するにも関わらずヌクレオソームのリンカー部を優先的に切断する MNase の活性を阻害すること、から、PGC7 による立体障害の可能性も低いと考えられる。これらのことから、PGC7 は N 末端側でクロマチンと結合することにより、クロマチンのコンフォメーション変化を誘起し、Tet3 を阻害している可能性が高いと考えられる。

本研究により、PGC7 が H3K9me2 を認識してクロマチンと結合することで、受精卵の雌性ゲノムに存在する 5mC を Tet3 による 5hmC への変換から保護することが明らかとなった。しかし、最近 5hmC は Tet によりさらに 5-ホルミルシトシン (5fC)、5-カルボキシルシトシン (5caC) へと変換されることが報告されている。今後のさらなる解析によって、これらの塩基の生理的な役割や生物学的な意義が解明されることが期待される。

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 7 件)

① Nakashima H, Kimura T, Kaga Y, Nakatani

T, Seki Y, Nakamura T, Nakano T., Effects of Dppa3 on DNA Methylation Dynamics During Primordial Germ Cell Development., *Biol Reprod.*, 88, 2013, 1-9. doi: 10.1095/biolreprod.112.105932

② Shiromoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Daiba A, Chuma S, Katanaya A, Katsumata A, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Nakamura T, Yoshinaga K, Asada N, Nakamura S, Yasunaga T, Kojima-Kita K, Itou D, Kimura T, Nakano T., GPAT2, a Mitochondrial Outer Membrane Protein, in piRNA Biogenesis in Germline Stem Cells., *RNA*, 19, 2013, 803-810. doi: 10.1261/rna.038521.113

③ 中村 肇伸、PGC7 はヒストン H3K9me2 との結合を介して受精卵における 5mC から 5hmC への変換を阻害する、*細胞工学*、31、2012、1038-1039

④ 中村 肇伸、母性因子 PGC7 はヒストン H3 の 9 番目のリジン残基のジメチル化との結合を介し受精卵における 5-メチルシトシンから 5-ヒドロキシメチルシトシンへの変換を阻害する、*ライフサイエンス新着論文レビュー*、2012、URL: <http://first.lifesciencedb.jp/archives/5093>

⑤ Nakamura T, Liu YJ, 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*, 486, 2012, 415-419. doi: 10.1038/nature11093

⑥ Liu YJ, Nakamura T, Nakano T., Essential Role of DPPA3 for Chromatin Condensation in Mouse Oocytogenesis., *Biol Reprod.*, 86, 2012, 1-8. doi: 10.1095/biolreprod.111.095018

⑦ 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 U S A.*, 108, 2011, 20621-20626. doi: 10.1073/pnas.1112664108

〔学会発表〕(計 18 件)

- ① 中谷 庸寿、木村 透、小田 昌朗、中島 啓行、中村 肇伸、仲野 徹、マウス受精卵における 5mC から 5hmC への変換の制御機構、第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会、2013 年、5 月 31 日、奈良
- ② 舟木 壮一郎、中村 肇伸、奥村 明之進、仲野 徹、エピジェネティクスな変化と癌 - ゲノムの低メチル化が細胞の腫瘍化に及ぼす影響 -、第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 11 日、福岡
- ③ Nakamura T, Imadome G, Nakano T, Nakamura T, Yamagata Y, Expression and purification for protein crystallography of a DNA methylation regulatory protein, International Symposium on Target recognition and expression mechanism of intrinsically disordered protein, 2013 年、1 月 23 日、横浜
- ④ 舟木 壮一郎、中村 肇伸、中島 啓行、奥村 明之進、仲野 徹、ゲノムワイドな DNA 低メチル化と発癌との関連、第 33 回日本分子生物学会年会、2012 年、12 月 11 日、福岡
- ⑤ 中村 肇伸、受精卵における能動的メチル化消去の制御機構の解明、「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」第 5 回公開シンポジウム (招待講演)、2012 年 11 月 21 日、京都
- ⑥ 中村 肇伸、メチル化制御因子 PGC7 の機能解析、第 28 回 配偶子制御セミナー (招待講演)、2012 年 11 月 13 日、横浜
- ⑦ Taga T, Kagawa T, Bizen N, Yamaguchi Y, Kokubu Y, Hattori S, Takao K, Miyakawa T, Inazawa J, Nakamura T, Nakano T, Regulation of mouse brain development by DNA and histone methylation: From molecular basis to cognitive, behavioral, and motor abnormalities in gene-manipulated model mice, The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Symposium on Epigenetics and neuropsychiatric disorders, 2012 年 9 月 19 日、名古屋
- ⑧ Nakamura T, Nakano T, PGC7/Stella binds to histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos, Cold Spring Harbor Laboratory meeting EPIGENETICS & CHROMATIN, 2012 年、9 月 13 日、米国
- ⑨ 中村 肇伸、受精卵における能動的 DNA 脱メチル化の制御機構の解明、生殖サイクル若手勉強会 2012 (招待講演)、2012 年、7 月 25 日、仙台
- ⑩ 田賀 哲也、鹿川 哲史、備前 典久、山口 雄平、国分 康博、服部 聡子、高雄 啓三、宮川 剛、稲澤 譲治、中村 肇伸、仲野 徹、DNA/ヒストンのメチル化制御による中枢神経系の発生制御：分子機構からヒト精神運動異常様行動を示す遺伝子変異モデルマウスまで、第 33 回日本炎症・再生医学会、2012 年 7 月 5 日、福岡
- ⑪ Taga T, Kagawa T, Bizen N, Yamaguchi Y, Kokubu Y, Hattori S, Takao K, Miyakawa T, Inazawa J, Nakamura T, Nakano T, Epigenetic regulation of neural stem cell differentiation and brain development, ISSCR 10th Annual Meeting, 2012 年、6 月 1 日、淡路
- ⑫ Bizen N, Kagawa T, Nakamura T, Nakano T, Taga T, 5-methylcytosine hydroxylase TET3-mediated acquisition of astrocytic competence of midgestational neural stem cells, 10th Stem Cell Research Symposium, 2012 年、6 月 1 日、淡路
- ⑬ 中村 肇伸、受精卵における能動的 DNA 脱メチル化の制御機構の解明、第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会 (招待講演)、2012 年 5 月 15 日、東京
- ⑭ Toshinobu Nakamura, Soichiro Funaki and Toru Nakano, Global DNA hypomethylation and transformation., The 15th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference on Epigenetics in Cancer (招待講演), 2012 年 2 月 23 日、

米国

- ⑮ Toru Nakano and Toshinobu Nakamura, Relationship between DNA modification and histone modification in early embryos., The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演), 2011年12月16日, 横浜
- ⑯ 中村 肇伸、Mark Wossidlo、立花 誠、眞貝 洋一、Jörn Walter、仲野 徹、受精卵における 5MeC から 5HmC への変換制御機構の解明、文部科学省科学研究費補助金 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」第4回公開シンポジウム、2011年11月18日、大阪
- ⑰ Toshinobu Nakamura, Mark Wossidlo, Makoto, Tachibana, Yoichi Shinkai, Jörn Walter and Toru Nakano, Reciprocal regulation of DNA methylation and hydroxymethylation in early embryos by histone modification, The 84th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (招待講演), 2011年9月22日, 京都
- ⑱ 中村 肇伸、受精卵における 5-メチルシトシンから 5-ヒドロキシメチルシトシンへの変換、生殖サイクル若手勉強会 2011、2011年7月13日、大阪

[その他]

ホームページ等

中村肇伸講師がエピジェネティクス研究会奨励賞を受賞

http://www.nagahama-i-bio.ac.jp/news/news/2012/05/post_185.html

哺乳類初期発生における「エピジェネティック制御」の謎を解明!

http://www.osaka-u.ac.jp/ja/news/ResearchRelease/2012/06/20120604_1

中村肇伸講師らの共同研究が『ネイチャー』に掲載されました

http://www.nagahama-i-bio.ac.jp/news/news/2012/06/post_190.html

中村肇伸講師が文部科学大臣表彰若手科学者賞を受賞しました

http://www.nagahama-i-bio.ac.jp/news/news/2013/04/post_233.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 肇伸 (NAKAMURA TOSHINOBU)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・
講師

研究者番号：80403202