

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24613004

研究課題名(和文)生殖系列でのメチル化インプリント初期化機構の解明

研究課題名(英文)Erasure mechanisms of parental imprints during primordial germ cell development in mice

研究代表者

多田 政子(Tada, Masako)

鳥取大学・染色体工学研究センター・教授

研究者番号：10524910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胚発生過程では、着床前胚と始原生殖細胞(PGCs)形成過程でゲノム全体のDNAシトシンのメチル化が劇的に減少する。この時期のPGCsゲノムでは、初期胚では決して起きないメチル化インプリントの消去が起き、生涯最も初期的な状態に戻る。我々は、マウス胚性幹細胞ESCとESCから分化誘導したPGC様細胞をそれぞれのモデルとして、山中4因子以外の初期化因子の同定を目指している。PGC様分化細胞で、ESCにはないヘテロクロマチン領域における5-ヒドロキシメチル(5hmC)化現象を見いだした。よって、PGCsでは、固いヘテロクロマチンの性質を緩和する機構が最初に働くと考えられる。

研究成果の概要(英文)：DNA cytosine methylation (5mC) is involved in important regulatory mechanisms of gene expression and development in mammals. Genome-wide DNA demethylation occurs in preimplantation embryos and primordial germ cells (PGCs) during mouse embryonic development. Although erasure of the DNA methylation imprints never occurs during embryonic reprogramming, it occurs in PGCs. At the same time, PGC genomes return to the default state. By comparing DNA modification profiles of mouse embryonic stem cells (ESCs) with those of ESC-derived PGCs, we tried to examine which factors excluding Yamanaka's 4 factors were primarily responsible for the erasure of parental imprints. In ESC-derived PGCs, we found an extensive conversion of 5mC to 5-hydroxymethylation (5hmC) at condensed heterochromatic regions, but it was not detected in undifferentiated ESCs. Therefore, decondensation of heterochromatin may initiate the further reprogramming during PGC development, leading to the erasure imprints.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：DNAメチル化 5-ヒドロキシメチル化 ES細胞 クロマチン リプログラミング 始原生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスは遺伝子発現を制御する化学修飾である。マウス胚発生過程では、ゲノム全体の DNA シトシンのメチル化 (5mC) が劇的に減少する時期が 2 回ある。着床までの初期胚と 11-12 日齢胚の始原生殖細胞 (PGCs) で起きるこの現象は、エピジェネティックリプログラミングと呼ばれる。この時期の PGC ゲノムでは、初期胚では決して起きないメチル化インプリントの消去が起き、生涯最も初期的な状態に戻る。このインプリント消去関連因子として Tet1 酵素が上げられている。Tet1 は、5mC を酸化し 5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) に変換することで DNA の脱メチル化を誘導するが、その遺伝子発現は PGCs 特異的ではない。Tet1 は、インプリントを維持しているマウス ESCs でも高発現している。よって、未だインプリント消去機構の全体像は明らかになっていないと言える。

2. 研究の目的

山中 4 因子として知られるリプログラミング因子以外の新たな PGCs 型初期化因子同定を目指している。

3. 研究の方法

(1) 初期胚細胞のモデルとしてマウス ESCs を、PGCs のモデルとして ESCs から誘導した PGC 様分化細胞 (PGC-LCs) を用いて、PGCs 特異的エピジェネティクスがどのように制御されているのか解析した。ネガティブコントロールとして 3 種の DNA メチル化酵素 (Dnmt) を欠損した ESCs (TKO) を用いた。TKO ESCs では、5mC も 5hmC も検出されない。
 (2) DNA ドットプロットや GT アッセイによる 5mC と 5hmC 量解析、定量性 RT-PCR による遺伝子発現解析、各種抗体を用いた染色体上の DNA やヒストンタンパク質修飾の領域特異的変換の同定を行った。
 (3) Dnmt3a/3b KO ES 細胞 (DKO) や Dnmt1 KO ESCs を用いて、ESCs における脱メチル化後の再メチル化制御の解析も同時に実施した。

4. 研究成果

(1) マウス ESCs では、遺伝子活性の高いユークロマチン領域 (ヒストン H3K4me2/3 陽性、R-band、S 期早期複製領域) で 5mC から 5hmC への変換が起きていた。一方、ヘテロクロマチン領域 (ヒストン H3K9me3 陽性、G-band 陽性、S 期中-後期複製領域) では、5hmC 変換が起きず 5mC が維持されていた (図 1)。よって、Dnmts による DNA のメチル化は散在的であるが、ヘテロクロマチン領域に Tet 酵素が働かないよう制限され、5hmC のユークロマチン局在が制御されている可能性を示した (〔雑誌論文 1〕 Kubiura, M et al., 2012)。
重要性: これまで不活性型ヒストン修飾酵素がヘテロクロマチン領域特異的に Dnmt3a/3b をリクルートすることで領域特異的に制御さ

れていると考えられてきた。我々の結果は、ESCs の 5mC パターンは、5hmC 非変換領域として間接的にも制御されていることを示すものである。

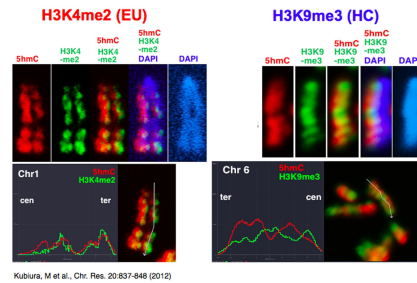


図 1.

(2) マウス ESCs では、5hmC 変換によって DNA 修飾が失われず一定に保たれていることから、Dnmts による DNA の再メチル化と Tet による 5hmC 変換が連続しておき、一定の DNA メチル化パターンが維持されていることを見いだした (図 2)。これまで全く注目されてこなかった ESCs での DNA の再メチル化に關与する Dnmts の同定と細胞周期依存的活性制御について現在詳細に解析中である (継続解析中)。

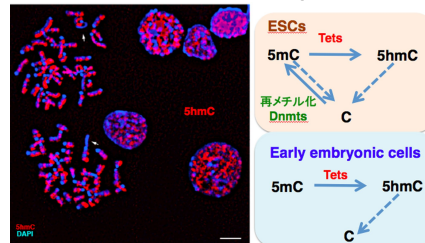


図 2.

(3) Dnmt1 KO ESCs の分裂中期染色体の免疫染色により、5hmC は DNA 修復で失われるよりも細胞分裂によって稀釈され、細胞周期 2 回目で再び 5mC 化される可能性が高いことを見いだした (未発表)。
 (4) ESCs から PGC-LCs を分化誘導し、その分化度を定量性 RT-PCR で確認した。この PGC-LCs では、未分化な ESCs で維持されていた動原体近傍および G-band 陽性領域の 5mC が 5hmC 化されることを可視化した。また、免疫染色レベルの 5hmC 化領域の拡大とゲノム全体の 5hmC 量増加に対応がみられた (未発表)。この 5hmC 領域の拡大は、PGC-LCs 化によりヘテロクロマチン領域がユークロマチン化された結果であると考えられる。**重要性:** PGCs でのインプリント領域を含むヘテロクロマチン領域の 5hmC 化は、従来言われているように Tet 酵素活性の増加によるものではなく、クロマチンの緩和により Tet 酵素作用領域の拡大の結果であると言える。よって、動原体近傍の不活性型クロマチン修飾 H3K9me3/2 を消去する、または、H3/H4 のアセチル化によりクロマチン構造の緩和を加速化する因子の存在が想定される (図 3)。同時に DNA の再メチル化を抑制する機構があると考えられる (継続解析中)

* (2)(3)のデータは論文発表準備中のため、非公開とさせていただきます。

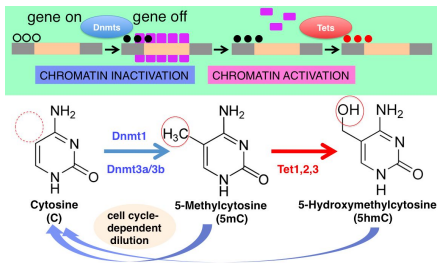


図 3.

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. Kubiura, M., Okano, M., Kimura, H., Kawamura, F., Tada, M.: Heterochromatin restricts 5mC to 5hmC conversion to euchromatin. *Chromosome Research*, 20 (7): 837-48, 2012.
2. Otsuji, T.G., Kurose, Y., Suemori, H., Tada, M.*, Nakatsuji, N.: Dynamic Link between Histone H3 Acetylation and an Increase in the Functional Characteristics of Human ESC/iPSC-Derived Cardiomyocytes. *PLOS ONE* 7(9): e45010, 2012. *correspondence
3. Takehashi M, Tada M., Kanatsu-Shinohara M, Morimoto H, Kazuki Y, Oshimura M, Tada T, Shinohara T.*: Hybridization of testis-derived stem cells with somatic cells and embryonic stem cells. *Biol Reprod*. 86(6): 178, 2012.

[学会発表](計 30 件)

1. 多田政子: 「マウス胚性幹細胞が持つエピジェネティックなリプログラミング活性」染色体学会賞受賞講演(倉敷市芸文館) 2014.10.24.
2. 多田政子: 「マウスおよびニワトリ初期胚でのクロマチン再プログラム化による5mCから5hmCへの変換制御」第36回日本分子生物学会年会(パシフィコ横浜) 2014.11.27.
3. 多田政子: 「マウスES細胞およびニワトリ初期胚細胞での5mC化と5hmC化の制御」第35回日本分子生物学会年会(神戸) 2013.12.4.
4. 多田政子: 「性染色体における5mC化と5hmC化」第35回日本分子生物学会年会(福岡)2012. 12. 14.
5. Masako Tada: Cyclic conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine during the cell cycle in mouse embryonic stem cells. (RIKEN CDB, Kobe, Japan) 2014.09.09.
6. 多田政子: 「マウスES細胞における細胞周期依存的DNAメチル化変換」霊長類への展開に向けた幹細胞・生殖細胞・エピゲノム研究(京都大学霊長類研

究所) 2014.8.26.

7. Masako Tada: Cyclic conversion of 5mC to 5hmC through cell cycles in mouse and chicken embryonic cells. (The University of British Columbia, Vancouver, Canada) 2014.06.18.
8. 多田政子: 「マウスES細胞、ニワトリおよびカエル初期胚細胞での5mCと5hmCの連続変換」大阪大学蛋白質研究所セミナー、DNAメチル化の制御機構—メチル化模様形成、維持と消去(大阪大学蛋白質研究所) 2013.11.1-2.
9. 多田政子: 「Mechanisms of cytosine methylation and 5mC to 5hmC conversion in chicken (*Gallus gallus*). 第2回X染色体研究会(札幌市)2013.3.2.
10. 多田政子: 基調講演「iPS細胞がもたらす未来」中国・四国&九州地区愛徳会合同秋季例会(米子市) 2012.10.25.
11. Kubiura, M., Okano, M., Kimura, H., Tajima, S., Kimura, H., and Tada, M.: Coordinated regulation of re-methylation by Dnmt1 and Dnmt3a/3b after demethylation through 5-hydroxymethylation in mouse embryonic stem cells. ISSCR (Vancouver, Canada). 2014.06.18.
12. Tada, M., Kubiura, M., Okano, M., Oshimura, M.: Dynamic link of 5-hydroxymethylcytosine with DNA replication during early S-phase in mouse embryonic stem cells and somatic cells. ISSCR (Yokohama, Japan) 2012.6.13-16.
13. 林礼佳、首浦武作志、松田洋一、多田政子: 「ニワトリ染色体の可逆的クロマチン構造変化」染色体学会第65回年会(倉敷市芸文館)2014.10.25.
14. 浅野有美、林礼佳、多田政子: 「ニワトリ染色体の核内配置のライブイメージング」染色体学会第65回年会(倉敷市芸文館) 2014.10.25. BP(ベストプレゼンテーション)賞受賞
15. 林礼佳、首浦武作志、松田洋一、多田政子: 「ニワトリ初期胚細胞でのDNA脱メチル化制御機構の解明」染色体学会第64回年会(富山市、富山大学黒田講堂) 2013.11.8-10.
16. 首浦武作志、岡野正樹、多田政子: 「マウスES細胞における5mCおよび5hmCの活発な変換制御機構の解明」染色体学会第64回年会(富山市、富山大学黒田講堂)2013.11.8-10. BP(ベストプレゼンテーション)賞受賞
17. 首浦武作志、岡野正樹、木村宏、押村光雄、多田政子: 「マウスES細胞およびヒト分化細胞におけるH3K9me3領域ゲノムワイドな非5hmC化」第84回日本遺伝学会大会(博多市、九州大学医学部) 2012.9.24.
18. Hayashi, A., Kubiura, M., Oishi, I., Tada,

- M.: Properties of highly methylated chromosomal regions in the chicken (*Gallus gallus*). 染色体学会第 63 回 (2012 年度) 年会 (旭川市、大雪クリスタルホール国際会議場) 2012.10.6.
19. Kubiura, M., Okano, M., Kimura, H., Kawamura, F., Tada, M.: Absence of 5-hydroxymethylcytosine from heterochromatin in mouse ES and human differentiated cells. 染色体学会第 63 回 (2012 年度) 年会 (旭川市、大雪クリスタルホール国際会議場) 2012.10.6.
20. 首浦武作志、木村博信、田嶋正二、多田政子: 「マウス ES 細胞での 5hmC 化を介した脱メチル化後の Dnmt1 の役割」第 36 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜) 2014.11.27.
21. 林礼佳、首浦武作志、浅野有美、松田洋一、深川竜郎、木村宏、多田政子: 「ニワトリマクロ染色体の初期胚でのエピジェネティックなリプログラミング」第 36 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜) 2014.11.27.
22. 林礼佳、首浦武作志、浅野有美、松田洋一、深川竜郎、木村宏、多田政子: 「ニワトリ初期胚発生過程での染色体レベルのダイナミックな DNA メチル化変化」平成 26 年度エピジェネティクス研究会 (東京大学伊藤国際学術研究センター) 2014.5.25-27.
23. 首浦武作志、岡野正樹、木村博信、田嶋正二、多田政子: 「マウス ES 細胞における 5mC と 5hmC の連続変換によるメチル化制御」平成 26 年度エピジェネティクス研究会 (東京大学伊藤国際学術研究センター) 2014.5.25-27.
24. Kubiura, M., Okano, M., Tajima, S., and Tada, M.: Cyclic conversion of 5mC to 5hmC and remethylation in mouse ES cells. 第 35 回日本分子生物学会年会 (神戸) 2013.12.3-6.
25. Hayashi, A., Kubiura, M., Kimura, H., Matsuda, Y. and Tada, M.: Chromosome-wide regulation of 5mC to 5hmC conversion in chicken embryonic cells」第 35 回日本分子生物学会年会 (神戸) 2013.12.3-6.
26. 多田政子、首浦武作志、岡野正樹、押村光雄
「マウス ES 細胞および体細胞における 5hmC と S 期早期 DNA 複製部位との密接な関連性」第 6 回エピジェネティクス研究会年会 (東京都、学術総合センター) 2012. 5.14-15.
27. Kubiura, M., Okano, M., Kimura, H., Kawamura, F., Tada, M.: Exclusion of 5-hydroxymethylcytosine from heterochromatin in mouse ES cells. 第 35 回日本分子生物学会年会(福岡) 2012. 12. 11.

28. 多田政子: 「5mC から 5hmC への変換から探るニワトリ胚発生における段階的リプログラミング」第 3 回 X 染色体研究会 (近畿大学農学部) 2015.3.26-27.
29. 首浦武作志、木村博信、田嶋正二、多田政子: 「5mC から 5hmC への変換から探るマウス PGC 分化における Dnmts の役割」第 3 回 X 染色体研究会 (近畿大学農学部) 2015.3.26-27.
30. 多田政子: Mechanism of cytosine methylation and 5mC to 5hmC conversion in chicken (*Gallus gallus*). 第 2 回 X 染色体研究会 (北海道大学学術交流会館) 2014.3.21-22.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ
<http://matada.wix.com/cerc-tottori-univ>

6. 研究組織
(1)研究代表者
多田 政子 (TADA, Masako)
鳥取大学染色体工学研究センター・教授
研究者番号：10524910

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：