

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24613005

研究課題名(和文)ゲノムインプリンティングにおいてUHRF1が果たす役割の解明

研究課題名(英文)A role of UHRF1 in establishment and maintenance of genomic imprinting

研究代表者

鷓木 元香 (UNOKI, MOTOKO)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：30525374

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)：ゲノムインプリンティングとは父母の配偶子形成過程でエピジェネティックな情報(DNAメチル化やヒストン修飾)がゲノムに刷り込まれ、受精後生涯を通して由来するゲノムにより遺伝子発現に差が出る現象であり、その異常はヒトの先天性異常の原因ともなる。本研究では、ゲノムインプリンティングの分子基盤の理解を深めるために、UHRF1というエピジェネティック制御因子がインプリンティングの確立・維持に果たす役割を調べた。その結果、UHRF1は卵子におけるインプリンティングの確立には関与しないが、着床前胚におけるインプリンティングの維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Genomic imprinting is the epigenetic phenomenon by which certain genes are expressed in a parent-of-origin-specific manner based on imprinted information such as DNA methylation and/or histone modifications established during gametogenesis. Abnormal genomic imprinting can cause human congenital disorders. In this research, we examined whether UHRF1, which is one of important epigenetic regulators, has a role in establishment and/or maintenance of genomic imprinting, and found that UHRF1 is not involved in establishment of genomic imprinting during oogenesis, but has a critical role in maintenance of it during pre-implantation development against global DNA demethylation.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：DNAメチル化 ゲノムインプリンティング UHRF1 発生 生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノムインプリンティング (以下インプリンティング) とは父母の配偶子形成過程でエピジェネティックな「情報」がゲノムに刷り込まれ、受精後生涯を通して由来するゲノムにより遺伝子発現に差が出る現象である。刷り込まれる「情報」は DNA メチル化であることが多いが、胎盤 (胚体外組織) において一部例外も存在し、ヒストン修飾の関与も示唆されている。インプリンティングは哺乳類の正常な発生に必須で、その異常はヒトの先天性異常の原因ともなる。DNA メチル化依存的インプリンティングでは、ICR (Imprinting Control Region) と呼ばれる特定ゲノム領域のメチル化状態が、父母のどちらに由来するかで異なることが知られている。ICR は胎仔体内の始原生殖細胞で脱メチル化され、成長期卵もしくはプロ精原細胞において *de novo* メチル化酵素 DNMT3A と DNMT3L の複合体によりメチル化が「確立」される。そしてこのメチル化は受精直後に起こる広範なゲノムの脱メチル化に抗して「維持」されることが知られており、これには維持メチル化酵素 DNMT1 が必須である。

(2) 以前、研究代表者は UHRF1 をメチル化 DNA に結合するタンパク質として同定した (Unoki *et al.*, *Oncogene*, 2004)。その後の研究により UHRF1 は ① ヘミメチル化 DNA に結合し、DNMT1 をリクルートして DNA メチル化を娘細胞に伝達するのに必須であること、② *de novo* メチル化酵素 DNMT3A や DNMT3B と結合すること、③ ヒストン H3 のメチル化された 9 番目のリジンとメチル化されていない 2 番目のアルギンを認識することなどが明らかにされ、UHRF1 はエピジェネティック制御機構における主要因子の 1 つであることが明らかにされてきた。

これまでに *Uhrf1* ヘテロ (*Uhrf1*^{+/+}) マウスの交配により *Uhrf1* ノックアウト (*Uhrf1*^{-/-}) 胚は作製されているが、このノックアウト胚は胎生 10.5 日前後に致死であるため、*Uhrf1* が成長期卵およびプロ精原細胞において ICR のメチル化「確立」に関与するかどうかは調べられていなかった。また *Uhrf1* ヘテロ雌マウスが産生するノックアウト卵子の細胞質には、減数分裂前に野生型アレルから発現した *Uhrf1* が存在する。そのため、*Uhrf1* ヘテロマウス同士の交配で作られた *Uhrf1* ノックアウト着床前胚には卵子からの *Uhrf1* の持ち込みがあり、受精直後の ICR のメチル化「維持」機構における *Uhrf1* の役割は調べられていなかった。

2. 研究の目的

(1) *Uhrf1* が胎盤における DNA メチル化非依存的なインプリンティングに関与するのかわかを明らかにする。

(2) *Uhrf1* がプロ精原細胞および成長期卵において DNA メチル化依存的なインプリンティングの「確立」に関与するのかわかを明らかにする。

(3) *Uhrf1* が着床前胚において DNA メチル化依存的なインプリンティングの「維持」に関与するのかわかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *Uhrf1* が胎盤における DNA メチル化非依存的なインプリンティングに関与するのかわかを明らかにするため、遺伝的背景の異なる 2 系統の *Uhrf1*^{1lox/+} マウスを用いた検討をおこなった。具体的には、古関明彦先生 (理化学研究所) から譲渡して頂いた *Uhrf1*^{3lox/+} マウスに EII-Cre 発現マウスを交配することで *Uhrf1*^{1lox/+} マウスを作製し (図 1)、このマウスを野生型の C57BL/6 マウス (*Mus musculus domesticus*) および JF1 マウス (*Mus musculus molossinus*) と数世代戻し交配することによって、遺伝的背景の異なる 2 系統の *Uhrf1*^{1lox/+} マウスを得た。これらのマウスの交配により、*Uhrf1* ノックアウト (*Uhrf1*^{1lox/1lox}) 胎仔を作製し、胎仔が致死となる前の胎生 9.5 日の胎盤を採取し (図 2)、RNA を抽出、DNA メチル化非依存的に片親性発現をしていることが報告されている遺伝子 (*ASCL2*, *KCNQ1*, *CD81*) の発現量を定量的 RT-PCR で検討した。この時、父母で異なる一塩基多型 (SNP) を利用し、RT-PCR 後に制限酵素断片長多型 (RFLP) およびシーケンシングの蛍光波長の強さで、由来アレルを区別した。

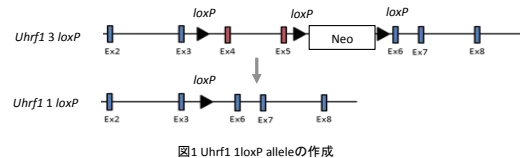


図1 *Uhrf1* 1loxP allele の作成

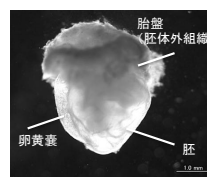


図2 マウス胎生9.5日胚と胎盤

(2) *Uhrf1* が成長期卵およびプロ精原細胞において DNA メチル化依存的なインプリンティングの「確立」に関与するのかわかを明らかにするために、以下の 2 つの *Uhrf1* コンディショナルノックアウトマウスを作製した。① 精子形成過程における *Uhrf1* の役割を調べるために生殖細胞特異的ノックアウトマウスを作製した。具体的には、古関明彦先生 (理化学研究所) から譲渡して頂いた *Uhrf1*^{3lox/+} マウスに EII-Cre マウスを交配することで *Uhrf1*^{2lox/+} マウスを作製し (図 3)、このマウスと始原生殖細胞で Cre を発現する TNAP-Cre 発現マウスを交配し、*Uhrf1*^{2lox/2lox}-TNAP-Cre マウスを得た。この

マウスを用いて *Uhrf1* ノックアウト精子におけるメチル化状態を調べる予定であったが、目的の *Uhrf1*^{2lox/2lox}-TNAP-Cre 雄マウスがなかなか得られず、また数匹得られた雄マウスはすべて無精子症を程したため、*Uhrf1* の精子形成過程における役割についての検討は次の課題とし、本研究では打ち切った。

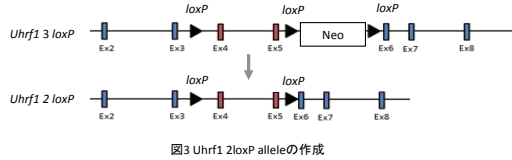


図3 *Uhrf1* 2loxP allele の作成

② 成長期卵子における *Uhrf1* の役割を調べるために、卵子特異的ノックアウトマウスを作製した。具体的には、*Uhrf1*^{2lox/+}マウスと成長期卵子でのみ Cre を発現する *Zp3-Cre* 発現マウスを交配して *Uhrf1*^{2lox/2lox}-*Zp3-Cre* マウスを得た。この *Uhrf1*^{2lox/2lox}-*Zp3-Cre* 雌マウスの卵巣から十分に成長した卵子 (FGO: Fully grown oocyte) を採取し、DNA を抽出した。この DNA をバイサルファイト処理し、非メチル化シトシンはウラシルに変換され、メチル化シトシンは変換されない原理を用いて、メチル化状態を次世代シーケンサーを用いて網羅的に調べた。次世代シーケンサー用のライブラリーは、微量サンプルに適した PBAT (Post-bisulfite Adaptor Tagging) 法にて作製した。

(3) *Uhrf1* が着床前胚において DNA メチル化依存的なインプリンティングの「維持」に関与するの否かを明らかにするために、上記で作製した *Uhrf1*^{2lox/2lox}-*Zp3-Cre* 雌マウスの卵子と、野生型雄マウスの精子を用いて体外授精をおこなった。3日間の培養後、胚盤胞期に達した母方 *Uhrf1* ノックアウト (*mat-cKO*) 胚 (*Uhrf1*^{1lox/+}) から DNA を抽出し、前述の方法と同様の方法で DNA メチル化レベルを調べた。

4. 研究成果

(1) *Uhrf1* が DNA メチル化非依存的インプリンティングにおいて果たす役割

遺伝的背景の異なる父母を持つ *Uhrf1* ノックアウト胚と胎盤における DNA メチル化非依存的インプリンティング遺伝子 (*ASCL2*, *KCNQ1*, *CD81*) の発現を解析したところ、*Uhrf1* の欠失はこれらの遺伝子の片親性発現に影響を与えないことがわかった (図 4, 5)。

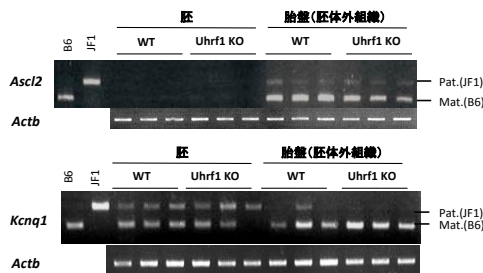


図4 *Uhrf1* が *Ascl2* と *Kcnq1* の胎盤における片親性発現に与える影響

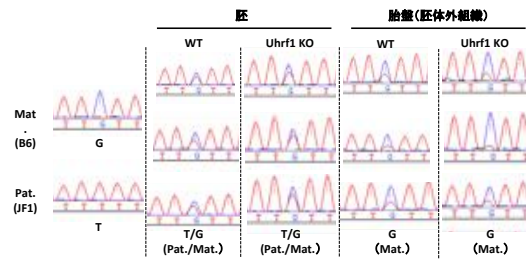


図5 *Uhrf1* が *CD81* の胎盤における片親性発現に与える影響 (サンガーシーケンシング)

(2) *Uhrf1* が DNA メチル化依存的インプリンティングの確立において果たす役割

① 精子形成過程における *Uhrf1* の役割

精子形成過程における *Uhrf1* の役割を検討するために必要な *Uhrf1*^{2lox/2lox}-TNAP-Cre マウス雄の作出効率は 1% 以下と非常に悪く、TNAP-Cre が生殖細胞以外でも発現している可能性が示唆され、このマウスは本研究に適していないことがわかった。数匹得られた *Uhrf1*^{2lox/2lox}-TNAP-Cre マウス雄は精子形成不全を起こしていた。そのため、少なくとも *Uhrf1* が精子形成過程で非常に重要な役割を果たしていることはわかった。今後は異なる Cre マウスを用いて、精子形成過程における *Uhrf1* の役割を調べる予定である。

② 成長期卵子における *Uhrf1* の役割

卵子形成過程における *Uhrf1* の役割を検討するために必要な *Uhrf1*^{2lox/2lox}-*Zp3-Cre* 雌マウスは、予想されるメンデル比で作出され、卵子でのみ特異的に *Uhrf1* を欠失することに成功した (図 6)。 *Uhrf1* の局在は大部分の細胞で核だが、卵子では細胞質に主に局在し、核内には僅かにしか局在しないことがわかった。この雌マウスから十分に成長した *Uhrf1* ノックアウト卵子 (FGO: Fully grown oocyte) を採取し、DNA メチル化状態を調べたところ、野生型卵子と比較して大きな差は認められなかった。このことから、*Uhrf1* は成長期卵子における ICR のメチル化の確立において重要な役割は果たしていないことがわかった。

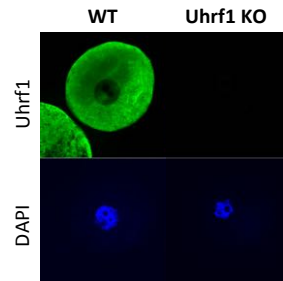


図6 *Uhrf1* の WT と *Uhrf1* KO FGO における発現と局在

(3) *Uhrf1* が DNA メチル化依存的インプリンティングの維持において果たす役割

受精直後から胚盤胞期までの着床前胚においては、大規模な DNA の脱メチル化が起こることが知られている。ICR の片親性の DNA メチル化は、この脱メチル化に抗して

維持され、この維持には *Dnmt1* が必要であることが報告されている。しかしながら、*Dnmt1* をヘミメチル化DNAにリクルートする *Uhrf1* が、この維持に協調的に働くのかどうかは不明であった。この時期、*Dnmt1* は主に細胞質に局在するが、一部核内に局在する *Dnmt1* がこのメチル化を維持する。そこで *Uhrf1* の局在を調べたところ、*Uhrf1* もこの時期には主に細胞質に局在し、核内には僅かにしか局在しないことがわかった (図7)。

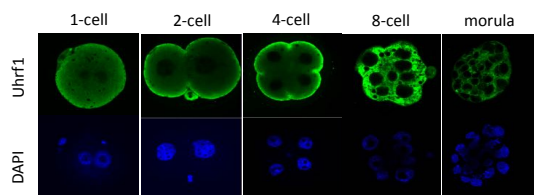


図7 着床前胚におけるUhrf1の局在

Uhrf1^{2lox/2lox-Zp3-Cre} マウスと野生型マウスの交配により得られた母方 *Uhrf1* ノックアウト (*mat-cKO*) 胚盤胞期胚 (*Uhrf1*^{1lox/+}) のICRのDNAメチル化レベルを調べたところ、DNAメチル化レベルが野生型胚では30~40%であるのに対し、*Uhrf1 mat-cKO* 胚では3~5%まで低下していた。このことから、核内に僅かに存在する *Uhrf1* が着床前胚におけるICRのDNAメチル化維持に必須であることがわかった (図8)。

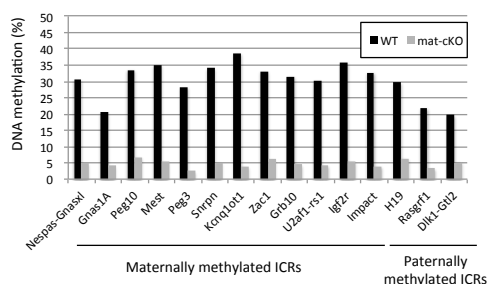


図8 *Uhrf1 mat-cKO* 胚盤胞期胚におけるインプリンティング領域のDNAメチル化

Dnmt1 mat-cKO 胚盤胞期胚 (*Dnmt1*^{1lox/+}) のICRのDNAメチル化レベルは25%程度なので、*Uhrf1 mat-cKO* 胚での劇的なDNAメチル化レベルの低下は非常に興味深い。ICRのDNAメチル化は片親性なので、もともと50%である。*Dnmt1* を母方にノックアウトすると、受精卵~2細胞期胚に1回細胞分裂する際にDNAメチル化が維持されず受動的に半減して25%になる。2細胞後期から野生型の父方アレルから *Dnmt1* が発現するため、その後の分裂ではICRのDNAメチル化は維持されると考えられる。ところが、*Uhrf1* を母方にノックアウトすると、2細胞期以降、父方アレルから *Uhrf1* が発現してもDNAメチル化が維持されないようである。現在、私たちは *Uhrf1* が父方アレルから発現する正確な時期を調べている。また私たちは *Uhrf1* のノックアウトが *Dnmt1* の細胞内局在に影響を与えるのに対し、*Dnmt1* のノックアウトは *Uhrf1* の細胞内局在に影響をあまり与

えない可能性を免疫染色で見出しており、このことが *Uhrf1 mat-cKO* 胚と *Dnmt1 mat-cKO* 胚のDNAメチル化レベルの違いに寄与しているのではないかという仮説を立てて検証中である。*Dnmt1* と *Uhrf1* が認識するヒストン修飾にも違いがある。このことも、母方ノックアウトがICRのDNAメチル化維持に与える影響の違いに寄与しているかもしれない。この違いが生じる機構を解明できれば、ICRのDNAメチル化維持機構の分子基盤の理解がより一層深まることが期待される。本研究成果は国際誌に投稿準備中である (*Maenohara et al., in preparation*)。

本研究を進める過程で、*Uhrf1 mat-cKO* 胚は胚盤胞期前後で致死であることがわかった。この重篤な表現型は、ICRのメチル化維持の破綻だけでは説明がつかない。現在、この原因を究明するために、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、インプリンティング領域以外のゲノム領域のメチル化解析、ライブセルイメージング、核置換実験などの技術を駆使し、原因究明を進めている。

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)

[学会発表] (計6件)

① 前之原 章司、鶴木 元香、藤 英博、大石裕晃、井上 貴美子、小倉 淳郎、Jafar Sharif、古関 明彦、佐々木 裕之、雌性生殖細胞および初期胚における *Uhrf1* の機能解析、第8回日本エピジェネティクス研究会年会、2014年5月26日、東京都・文京区

② 鶴木 元香、益田 晶子、堂前 直、新田 洋久、前之原 章司、福井 宣規、白川 昌宏、中村 祐輔、佐々木 裕之、*UHRF1* 相互作用タンパク質を介したエピジェネティック制御機構の解明を目指して、第8回日本エピジェネティクス研究会年会、2014年5月26日、東京都・文京区

③ 前之原 章司、鶴木 元香、藤 英博、大石裕晃、井上 貴美子、小倉 淳郎、Jafar Sharif、古関 明彦、佐々木 裕之、雌性生殖細胞および初期胚における *Uhrf1* の機能解析、第59回日本人類遺伝学会、2014年11月21日、東京都・江戸川区

④ 前之原 章司、鶴木 元香、小倉 淳郎、井上 貴美子、山縣 一夫、堀 真由子、藤 英博、大石 裕晃、Jafar Sharif、古関 明彦、植田幸嗣、佐々木 裕之、卵子形成および初期発生において細胞質に存在する *Uhrf1* の重要性、第10回日本生殖再生医学会・学術集会、2015年3月22日、京都府・京都市

⑤ 前之原 章司、鶴木 元香、小倉 淳郎、井上 貴美子、山縣 一夫、堀 真由子、Jafar

Sharif、古関 明彦、藤 英博、大石 裕晃、植田 幸嗣、佐々木 裕之、卵子形成過程および初期胚発生において細胞質に存在する Uhrf1 の重要性、第9回エピジェネティクス研究会、2015年5月25日、東京都・千代田区

⑥ 前之原 章司、鵜木 元香、小倉 淳郎、井上 貴美子、山縣 一夫、堀 真由子、藤 英博、大石 裕晃、Jafar Sharif、古関 明彦、植田 幸嗣、佐々木 裕之、卵子形成および初期胚発生において細胞質に存在する Uhrf1 の重要性、新学術領域研究「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」若手勉強会、2015年7月22日、静岡県・伊豆市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鵜木 元香 (UNOKI, Motoko)
九州大学・生体防御医学研究所・助教
研究者番号：30525374

(2) 研究協力者

前之原 章司 (MAENOHARA, Shoji)
九州大学・生体防御医学研究所・博士課程
大学院生

大石 裕晃 (OHISHI, Hiroaki)
九州大学・生体防御医学研究所・博士課程
大学院生

田中 智大 (TANAKA, Tomohiro)
九州大学医学部生命科学科・学部学生