

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870343

研究課題名(和文) エピジェネティクス可視化マウスの開発とそれらを用いた発生・脱分化過程の動態解析

研究課題名(英文) Development of epigenetic reporter mice and their application in development and dedifferentiation process studies.

研究代表者

上田 潤 (UEDA, Jun)

中部大学・実験動物教育研究センター・助教

研究者番号：80450394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：最近の研究からエピジェネティクスは発生・分化過程のみならず、腫瘍形成過程などの病態進行過程においてもダイナミックに変化することが明らかとなってきた。発生・分化過程及び病態進行過程のエピジェネティクス動態を解析するために、申請者はエピジェネティクス・レポーターマウスの開発を行い、それらを用いた発生・分化過程及び発がん過程のエピジェネティクス動態解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have indicated that epigenetics change dynamically not only during developmental and differentiation processes, but also in pathological processes, including tumorigenesis. To analyze and track the epigenetic dynamics during development, differentiation and tumorigenic processes, we have generated epigenetic reporter mice and utilized them to study these processes.

研究分野：発生生物学

キーワード：エピジェネティクス ライブセルイメージング DNAのメチル化

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクス研究が本格化した西暦 2000 年当初は、DNA のメチル化修飾やヒストンの化学修飾に代表されるエピジェネティックな修飾は安定なものでなかなか変化することはないと考えられてきた。ところがヒストン脱メチル化酵素や DNA の脱メチル化に関与し、シトシンオキシゲナーゼ活性を持つ TET (ten-eleven translocation) ファミリー蛋白質の発見に代表されるように、一旦付いた修飾が取り外される機構が解明されるに従い、環境の変化や刺激に応答してエピジェネティクスはダイナミックに変化するものだと考えられるようになってきた。

しかし、エピジェネティクス研究で当時(現在も)主流となっているクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法、ウェスタンブロット法、免疫染色法などの解析手法はすべてサンプルを固定することから、エピジェネティクスの動態解析を行う上で最適ではない。さらに、ChIP 法、ウェスタンブロット法に関しては、多数の細胞の平均を扱っていることから、個々の細胞の違いは実験結果に考慮されていない。このような背景から筆者はエピジェネティクスを生きたマウス個体で可視化したレポーターマウスの必要性を痛感し、DNA のメチル化修飾を可視化したレポーターマウスの開発に取り組んだ。

2. 研究の目的

ここ最近の研究からエピジェネティクスは発生・分化過程のみならず、腫瘍形成過程などの病態進行過程においてもダイナミックに変化することが明らかとなってきた。発生・分化過程のエピジェネティクス動態を解析するために、これまでに筆者は DNA のメチル化修飾を生きたマウス個体の全身

で可視化したレポーターマウスを開発してきた。本研究では新たに DNA のヒドロキシメチル化修飾を可視化したレポーターマウスを作製すると共に、これらのエピジェネティクス・レポーターを用いて体細胞のリプログラミング過程並びにマウス着床前初期胚の発生過程におけるエピジェネティクス・リプログラミングの動態解析を、ライブセルイメージング手法を用いて行うことを目的としている。

3. 研究の方法

メチル化 DNA を可視化するためにヒト MBD1 蛋白質の MBD ドメインに蛍光蛋白質を融合したプローブを用いたので (Yamazaki, T., *et al.*, *Dev. Biol.*, 2007)、ヒドロキシメチル化修飾は MBD3 蛋白質の MBD ドメインによって可視化することを考えた。プローブが有効であった場合は、ROSA26 遺伝子座にノックインして、マウスを作製することを計画していた。

リプログラミングの実験については、山中 4 因子をポリシストロニックに発現するベクターを用いることを計画していた。

4. 研究成果

当初の計画通り、ヒドロキシメチル化修飾を可視化したレポーターマウスを作製することはまだできていないが、本研究期間中にメチル化 DNA を可視化したレポーターマウスの仕事を論文として発表することができた (Ueda, J., *et al.*, *Stem Cell Rep.*, 2014)。このマウスを用いて初期胚発生や ES 細胞の樹立過程のライブセルイメージング解析を行ったところ、細胞が分化するに伴ってメチル化 DNA が集積するヘテロクロマチンが明瞭になっていく (固定化されていく) ことが明らかとなった。即ち、メチル化 DNA の増減だ

けでなく、クロマチン構造そのものが細胞分化の指標となることを明らかにした。さらに、メチル化 DNA のレポーターマウスと発がんモデルマウスを掛け合わせて腫瘍内のメチル化 DNA 及びヘテロクロマチン構造を調べたところ、正常細胞とは異なることが明らかとなった(未発表)。現在、「不完全なリプログラミング過程と考えられる」発がん過程のメチル化 DNA の動態を解析するための準備を進めている。

また、東京工業大学の木村宏博士、佐藤優子博士、近畿大学の山縣一夫博士との共同研究によって、ヒストンの翻訳後修飾を可視化したレポーターマウスの開発に成功した(Sato, Y., *et al.*, 未発表)。

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 4 件)

- (1) Ho, J.C., Ueda, J.*, and Shimizu, T*. (2016). The impact of mechanical stress on stem cell properties: The link between cell shape and pluripotency. *Histol. Histopathol.* 31, 41-50. (*co-corresponding author, Invited Review) PMID: 26350507 (査読有)
- (2) 八尾竜馬, 上田潤, 小林徹也, 堀真由子, 山縣一夫. 「ライブセルイメージングを用いた胚の質評価と応用」, **日本卵子学会**, 2015年10月, 32, 149-157. (査読有)
- (3) Ueda, J.*, Ho, J.C., Lee, K.L., Kitajima, S., Yang, H., Sun, W., Fukuhara, N., Zaiden, N., Chan, S.L., Tachibana, M., Shinkai, Y., Kato, H., and Poellinger, L*. (2014) The Hypoxia-Inducible Epigenetic Regulators *Jmjd1a* and *G9a* Provide a Mechanistic Link between Stem Cell Regulation, Angiogenesis and Tumor Growth. *Mol. Cell. Biol.*, 34,

3702-3720. (*co-correspondence) PMID: 25071150 (査読有)

- (4) Ueda, J., Maehara, K., Mashiko, D., Ichinose, T., Yao, T., Hori, M., Sato, Y., Kimura, H., Ohkawa, Y., and Yamagata, K. (2014) Heterochromatin Dynamics during the Differentiation Process Revealed by the DNA Methylation Reporter Mouse, *MethylRO*. *Stem Cell Reports*, 2, 910-924. PMID: 24936475 (査読有)

日刊工業新聞, 日経バイオテク, 産経新聞, サイエンスポータル, 朝日新聞, 日経新聞に取り上げられました。

[学会発表](計 21 件)

- (1) Ho, J.C., Ueda, J., Lee, K.L., Yang, H., and Poellinger, L. Hypoxia Mediates Tumorigenesis via the H3K9 Epigenetic Regulators *G9a* and *JMJD1A*. **Keystone Symposia 'Chromatin and Epigenetics'**, March 20-24, 2016, Whistler Conference Centre, Whistler, British Columbia, Canada.
- (2) Ueda, J., Harada, A., Urahama, T., Machida, S., Maehara, K., Horikoshi, N., Osakabe, A., Taguchi, H., Tanaka, H., Tachiwana, H., Yao, T., Yamada, M., Iwamoto, T., Isotani, A., Ikawa, M., Tachibana, T., Kimura, H., Ohkawa, Y., Kurumizaka, H., and Yamagata, K. Testis-specific histone variant H3t is essential for the entry into spermatogenesis. International Symposium "Epigenome Dynamics and Regulation in Germ Cells 2016", Feb 17 - 19, 2016, Clock Tower Centennial Hall, Kyoto University, Kyoto, Kyoto, Japan.
- (3) Hoida, K., Ueda, J., Ohinata, Y., Takarada, D., Tokoro, M., Hosoi, Y., and Yamagata, K. Dynamics of methylated DNA in ES cell replication and differentiation revealed by live-cell imaging. International Symposium

- “Epigenome Dynamics and Regulation in Germ Cells 2016”, Feb 17 – 19, 2016, Clock Tower Centennial Hall, Kyoto University, Kyoto, Kyoto, Japan.
- (4) 岩本隆司, 上田潤, 高岡祐司, 松山留美子, 野田明子, 喬善楼, 上山知己, 安達興一. 「心筋特異的 miR-143 トランスジェニックマウスではヘキサキナーゼ2 発現低下と相関して拡張型心筋症が発症し, ACE 阻害剤で改善する .」 **日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会 BMB2015**, 2015 年 12 月 1~4 日, 神戸ポートアイランド, 兵庫県・神戸市 .
- (5) 上田潤, 浦浜嵩, 原田哲仁, 町田晋一, 前原一満, 堀越直樹, 八尾竜馬, 山田みなみ, 岩本隆司, 磯谷綾子, 伊川正人, 立花太郎, 木村宏, 大川恭行, 胡桃坂仁志, 山縣一夫. 「マウス精巣特異的ヒストン H3t バリエーションである H3t は精子形成過程に必須である」, **日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会 BMB2015**, 2015 年 12 月 1~4 日, 神戸ポートアイランド, 兵庫県・神戸市 .
- (6) 長原美樹, 上田潤, 松永歩, 石坂みゆき, 藤田芳顕, 岩本隆司. 「*Pasteurella pneumotropica* 感染後の対応について-ソフト酸化水を使用したクリーニング操作の検討-」, **第 49 回日本実験動物技術者協会総会**, 2015 年 10 月 9~10 日, 静岡県コンベンションアーツセンター, 静岡県・静岡市 .
- (7) Ueda, J., Urahama, T., Harada, A., Machida, S., Maehara, K., Horikoshi, N., Osakabe, A., Tachiwana, H., Yao, T., Iwamoto, T., Isotani, A., Ikawa, M., Tachibana, T., Kimura, H., Ohkawa, Y., Kurumizaka, H., and Yamagata, K. Mouse testis specific histone H3 variant, H3mmT is essential for spermatogenesis and ensures the entry into meiosis. **The 40th Naito Conference ‘Epigenetics – From Histone Code to Therapeutic Strategy’**, Sep 15 – 18, 2015, CHÂTERAISÉ Gateaux Kingdom SAPPORO, Sapporo, Hokkaido, Japan.
- (8) Ueda, J., Urahama, T., Harada, A., Machida, S., Maehara, K., Horikoshi, N., Osakabe, A., Tachiwana, H., Yao, T., Iwamoto, T., Isotani, A., Ikawa, M., Tachibana, T., Kimura, H., Ohkawa, Y., Kurumizaka, H., and Yamagata, K. Mouse testis specific histone H3 variant, H3mmT is essential for spermatogenesis and ensures the entry into meiosis. **International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function**, Aug 23 – 26, 2015, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan (**Selected for oral presentation**).
- (9) Ueda, J., Maehara, K., Mashiko, D., Ichinose, T., Yao, T., Hori, M., Sato, Y., Kimura, H., Ohkawa, Y., and Yamagata, K. Visualization of Dynamics of Methylated DNA in living cell and animal. **International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function**, Aug 23 – 26, 2015, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan.
- (10) Ueda, J., Urahama, T., Harada, A., Machida, S., Maehara, K., Horikoshi, N., Osakabe, A., Tachiwana, H., Yao, T., Iwamoto, T., Isotani, A., Ikawa, M., Tachibana, T., Kimura, H., Ohkawa, Y., Kurumizaka, H., and Yamagata, K. Mouse testis specific histone H3 variant, H3t is essential for spermatogenesis and ensures the entry into meiosis. **International Symposium ‘Non-coding DNA and Chromosomal Integrity’**, Aug 7 – 8, 2015, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan.
- (11) 上田潤. 「常夏の国シンガポールでの短す

- きた人生の夏休み」, **新学術領域研究「クロマチン動構造」若手の会 第三回ワークショップ, クロマチン研究最前線~海外での研究生活で学んだことを活かして** ~, 2015年7月29日, 早稲田大学, 東京都・新宿区.
- (12) **上田潤**. 「腫瘍形成過程, 発生過程でのエピジェネティクス動態解析」, **第3回がんと代謝研究会**, 2015年7月16~17日, 石川県立音楽堂交流ホール, 石川県・金沢市.
- (13) 岩本隆司, **上田潤**. 「マイクロRNAトランスジェニックマウスに発症する拡張型心筋症の解析」, **第13回がんとハイボキシア研究会**, 2015年6月5~6日, 国立遺伝学研究所講堂, 静岡県・三島市.
- (14) **上田潤**. 「腫瘍形成過程, 発生・分化過程でのエピジェネティクス動態解析」, **第14回日本再生医療学会年会**, 2015年3月19~21日, パシフィコ横浜, 神奈川県・横浜市.
- (15) **上田潤**. 「マウス精巣特異的ヒストン H3 バリエント H3mmT の精子形成過程での役割解明」, **第2回ヒストンバリエント研究会**, 2015年2月28日, 東京工業大学, 神奈川県・横浜市.
- (16) **Ueda, J.**, Ho, J.C., Lee, K.L., Kitajima, S., Yang, H., Sun, W., Fukuhara, N., Zaiden, N., Chan, S.L., Tachibana, M., Shinkai, Y., Kato, H., and Poellinger, L. 「The Hypoxia-Inducible Epigenetic Regulators Jmjd1a and G9a Provide a Mechanistic Link between Angiogenesis and Tumor Growth.」, **第37回日本分子生物学会年会**, 2014年11月26日, パシフィコ横浜, 神奈川県・横浜市.
- (17) **上田潤**. 「Heterochromatin Dynamics during the Differentiation Process Revealed by the DNA Methylation Reporter Mouse, MethylRO」, **第1回名市大エピジェネティクス研究会**, 2014年9月5日, ホテル木曽路, 長野県・木曽郡.
- (18) **上田潤**. 「メチロー登場! 生きたままメチル化DNAの変化を捉える」, **微研 夏の予備校**, 2014年8月22日, 大阪大学微生物病研究所, 大阪府・吹田市.
- (19) **Ueda, J.**, Maehara, K., Mashiko, D., Ichinose, T., Yao, T., Hori, M., Sato, Y., Kimura, H., Ohkawa, Y., and Yamagata, K. Heterochromatin Dynamics during the Differentiation Process Revealed by the DNA Methylation Reporter Mouse, MethylRO. **第2回低酸素研究会**, 2014年7月26日, 早稲田大学, 東京都・新宿区.
- (20) **Ueda, J.**, Maehara, K., Mashiko, D., Ichinose, T., Yao, T., Hori, M., Sato, Y., Kimura, H., Ohkawa, Y., and Yamagata, K. Heterochromatin Dynamics during the Differentiation Process Revealed by the DNA Methylation Reporter Mouse, MethylRO. **新学術領域「動的クロマチン構造と機能」第2回若手の会**, 2014年7月2日, ルスツリゾート, 北海道・虻田郡.
- (21) **Ueda, J.**, Maehara, K., Mashiko, D., Ichinose, T., Yao, T., Hori, M., Sato, Y., Kimura, H., Ohkawa, Y., and Yamagata, K. Heterochromatin dynamics during differentiation process revealed by the DNA methylation reporter mouse, MethylRO. **IIAS Research Conference 2014 'Chromatin Decoding'**, May 12-15, 2014, International Institute for Advanced Studies, Kizugawa, Kyoto, Japan.
- 〔図書〕(計 2件)
- (1) **上田潤**, 山縣一夫. 「生体応答や病変の動的解析をめざしたメチル化DNAレポーターマウス『メチロー』の開発」, **医学のあゆみ** (医歯薬出版), 2015年5月

9 日号, 253(6), 523 - 524 .(査読無, 招待有)

- (2) **上田潤**, 前原一満, 大川恭行, 山縣一夫 .
クローズアップ実験法「DNA メチル化
レポーターマウス『メチロー』を用いた
メチル化 DNA の動態解析法」, **実験医学**
(羊土社), 2 月号, 2015 .(査読無, 招待有)

〔その他〕

ホームページ等

<http://researchmap.jp/wiz/?lang=japanese>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

上田 潤 (UEDA Jun)

中部大学・実験動物教育研究センター 助
教

研究者番号 : 80450394