

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06803

研究課題名(和文) 配偶子形成過程および初期発生におけるUHRF1の役割の解明

研究課題名(英文) Role of UHRF1 during oogenesis and early embryogenesis

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らは、一般的な細胞では核に局在するUHRF1が、卵母細胞および着床前胚では、大部分が細胞質に局在することを見出した。これらの細胞で一部核内に局在するUHRF1は卵母細胞成長期の新規DNAメチル化に関与し、着床前胚ではゲノムワイドに基底レベルのメチル化を維持することを見出した(前之原ら, 2017)。またUHRF1母方ノックアウトマウス胚は着床前後に致死となること、UHRF1は卵母細胞の細胞骨格形成に重要な役割を担っていること、UHRF1存在下で形成された細胞質が正常な発生に重要であること、UHRF1は着床前発生において正常な染色体分配と細胞分裂に重要であることなどを見出した。

研究成果の概要(英文)：UHRF1 is a nuclear factor, which is required for maintenance of DNA methylation with DNMT1 in somatic cells. Interestingly, however, during oogenesis and preimplantation development, most of UHRF1 localizes in the cytoplasm although minor portion of UHRF1 remains to be in the nucleus. We found that the nuclear UHRF1 is partially involved in de novo DNA methylation in the nucleus of oocyte and maintains DNA methylation at the basal levels against genome-wide demethylation in preimplantation embryos (Maenohara et al., 2017). In addition, we found that UHRF1 maternal knockout embryos show embryonic lethality around preimplantation, UHRF1 is required for constructing cytoskeleton of oocyte, the cytoplasm established under presence of UHRF1 is essential for normal preimplantation development, and UHRF1 is required for proper chromosomal segregation and cytoplasmic divisions.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：UHRF1 卵母細胞 初期発生 着床前発生 生殖細胞 エピジェネティクス DNAメチル化 卵子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は2004年にUHRF1をDNAメチル化に結合するタンパク質として世界に先駆けて同定して以来 (Unoki et al., 2004)、UHRF1の機能の全貌解明に取り組んでいる。2004年以降、日本人を中心とした多くの研究者の努力によりUHRF1は体細胞において、1) ヘミメチル化DNAに結合し、維持メチル化酵素DNMT1をリクルートしてDNAメチル化を娘鎖に伝達すること、2) ヒストンH3のメチル化された9番目のリジンを認識すること、3) ヒストンH3のユビキチン化をすること、4) 培養細胞内で*de novo* DNAメチル化酵素と結合するpotentialがあることなどが明らかにされてきた。しかしながら、エピジェネティックな情報の大規模なリプログラミングが起きる配偶子形成過程と初期胚発生過程におけるUHRF1の役割は明らかではなかったため、研究代表者らはUHRF1がこれらの時期に果たす役割を明らかにするために、卵子特異的UHRF1ノックアウト(KO)マウス(UHRF1^{2lox/2lox} Zp3-Cre)と始原生殖細胞特異的KOマウス(UHRF1^{2lox/2lox} TNAP-Cre)を作製した。

2. 研究の目的

哺乳類のエピジェネティックな情報とくにDNAメチル化は配偶子形成過程および初期胚発生過程に、一旦消去されて再確立されるといふ非常にダイナミックなプロセスを経てリプログラミングされる。UHRF1は体細胞では核内においてDNMT1と共にDNAメチル化伝達に参与する重要なタンパク質であるが、マウスの卵母細胞及び着床前胚ではUHRF1は一部が核に局在するものの、大部分は細胞質に局在することを研究代表者らは見出しており(図1)、これらの時期にUHRF1は核に加えて、細胞質でもなんらかの役割を果たしている可能性を考えた。

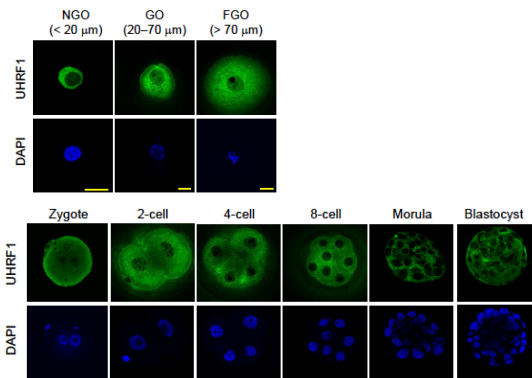


図1: 野生型非成長期卵母細胞(NGO)、成長期卵母細胞(GO)、完全成長卵母細胞(FGO)および、1細胞期胚(zygote)～胚盤胞期胚(Blastocyst)におけるUHRF1の局在(緑)。DAPI(青)はDNA。スケールバー20 μm。

また研究代表者らは、UHRF1母方KOマウス胚(UHRF1 KO 卵子 x 野生型精子)が着床前後に致死であることも見出しており、こ

の時期のUHRF1が着床前発生において果たす役割の解明を通して、初期発生プロセスのより深い理解を目指した。

3. 研究の方法

(1) マウス卵母細胞および着床前胚の核内でUHRF1が果たす役割の検討。

- 次世代シーケンサーを用いた全ゲノムDNAメチル化(メチローム)解析。Bisulfite-seq法。
- 次世代シーケンサーを用いた全転写物(トランスクリプトーム)解析。RNA-seq法(連携研究者のJafar Sharif先生との共同研究)。

(2) マウス卵母細胞および着床前胚の細胞質でUHRF1が果たす役割の検討。

- 受精卵の前核置換実験(連携研究者の小倉淳郎先生との共同研究)。着床前発生において細胞質のUHRF1もしくはUHRF1存在下の卵子で蓄積・構築された細胞質因子が重要なのか、核におけるUHRF1の機能が重要なのかを明らかにするために、UHRF1 KO 卵子と野生型精子の受精で得られた母方KO胚(1細胞期胚)と、野生型卵子と野生型精子の受精で得られた野生型胚の前核置換実験をおこない、発生率を調べる。
- マウス着床前胚のライブセルイメージング(連携研究者の山縣一夫先生との共同研究)。UHRF1母方KO胚は着床前後に致死であるため、着床前胚でどのような異常が起きているのかを把握するために体外授精をおこない、核クロマチンに局在するmCherry-ヒストンH2Bと細胞質に局在するGFP-チューブリンを受精卵に発現させ、蛍光シグナルを追跡し、発生の過程で起こる異常(染色体分配異常など)を顕微鏡下で経時的に記録し解析する。
- マウス卵母細胞におけるUHRF1の翻訳後修飾の解析(連携研究者の植田幸嗣先生)。UHRF1は核移行シグナルを少なくとも2つ有しているのに、なぜ卵母細胞および着床前胚では細胞質に局在するのか不明である。これらの細胞ではUHRF1の核移行シグナルが翻訳後修飾を受けたり、立体構造が翻訳後修飾により変化するかもしれないので、UHRF1の翻訳後修飾を質量分析にて調べる。

(3) UHRF1の精子形成過程における役割の解析。

UHRF1の精子形成過程における役割を明らかにするために、以前、始原生殖細胞特異的にUHRF1をKOしたUHRF1^{2lox/2lox} TNAP-Creマウスを作製したが、TNAP-Creが始原生殖細胞以外でも発現してマウスが胎生致死となってしまう、目的のマウスが得られる効率は1%以下と非常に低く、このマウスは当該目標の達成に不向きであること

がわかった（産まれてきた少数の UHRF1 TNAP-Cre 雄マウスは無精子症であった）。そこでタモキシフェン投与で意図した時期に生殖細胞特異的に Cre を核内に移行する事ができる Dppa3-MCMP-Cre マウスを作製し、UHRF1 が必要な精子形成の時期を明らかにする。また免疫染色にて精子形成過程における UHRF1 の局在を調べ、網羅的 DNA メチル化解析（PBAT 法）、転写解析（mRNA-seq）、クロマチン免疫沈降解析（ChIP-seq）、プロテオミクス解析で、精子形成過程における UHRF1 の機能を調べる。

4. 研究成果

[研究の主な成果]

研究代表者らは、体細胞とは異なり、卵母細胞および着床前胚では UHRF1 は主に細胞質に局在し（図 1）、UHRF1 母方 KO マウス胚が着床前後に致死となることを見出した（図 2, Maenohara et al., 2017）。

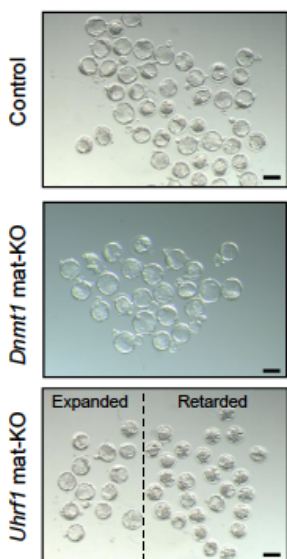


図 2:体外受精 96 時間後の野生型、DNMT1 母方 KO、UHRF1 母方 KO 着床前胚の外観（実体顕微鏡写真）。野生型と DNMT1 母方 KO 着床前胚が胚盤胞期に達しているのに対し、UHRF1 母方 KO 着床前胚は半分以上が胚盤胞期（Expanded）に達する前に発生を停止している（Retarded）。スケールバー 100 μm 。

研究代表者らは、一部核内に存在する UHRF1 が、卵母細胞成長期に de novo DNA メチル化の 22% に関与し（図 3）、着床前胚で起こる大規模な脱メチル化の時期に、脱メチル化に抗して、ゲノムインプリンティング領域の高メチル化を維持すると共に、ゲノムワイドに基底レベルの DNA メチル化を維持することを見出した（図 4, Maenohara et al., 2017）。

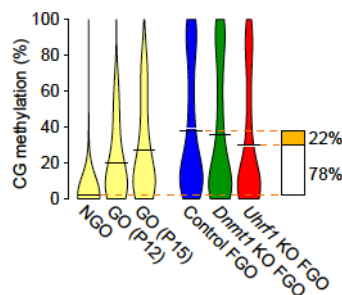


図 3:野生型非成長卵子（NGO）、生後 12 日（P12）と生後 15 日（P15）の卵巢から採取した野生型成長期卵子（GO）、野生型、DNMT1 KO、UHRF1 KO

完全成長卵子（FGO）における DNA（CG）メチル化率（%）。

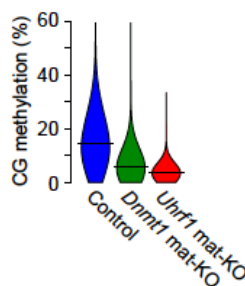


図 4:野生型、DNMT1 母方 KO、UHRF1 母方 KO 胚盤胞期胚における DNA（CG）メチル化率（%）。

UHRF1 が核内において DNA メチル化制御に果たす役割を明らかにしたものの、UHRF1 母方 KO マウス胚の表現型は、DNMT1 母方 KO マウス胚の表現型よりも重篤なことから、UHRF1 は DNA メチル化の確立や維持以外にも役割があると考え、連携研究者の小倉淳郎先生（理化学研究所）と共に、野生型と UHRF1 母方 KO マウス胚（1 細胞期胚）の前核置換実験をおこない、UHRF1 の存在下で形成された卵母細胞及び着床前胚の細胞質が正常な発生に重要であることを見出した。具体的には、UHRF1 母方 KO マウス胚の細胞質に野生型マウス胚の核を入れても発生は進まなかったが、野生型マウス胚の細胞質に UHRF1 母方 KO マウス胚の核を入れたものでは発生が進み、妊孕性を持つ仔が生まれた（論文投稿準備中）。

次に連携研究者の山縣一夫先生（近畿大学）と共に、UHRF1 母方 KO マウス着床前胚の発生過程の動画解析をおこない、UHRF1 母方 KO マウス胚では、ラギング染色体や微小核が観察され、細胞質の不均等分裂が認められたため、UHRF1 は着床前発生において正常な染色体分配と細胞分裂に重要であることを見出した（論文投稿準備中）。また UHRF1 母方 KO マウスの着床前胚では、細胞内小器官が激しく動き、細胞骨格の異常が示唆された。

また卵母細胞のプロテオミクス解析にて、UHRF1 の局在に影響を与えそうな翻訳後修飾は見つけられなかったものの、UHRF1 KO 卵母細胞では細胞骨格を形成するチューブリンサブファミリータンパク質や、透明帯を構成するタンパク質、さらには膜直下に存在する裏打ちタンパク質が減少していることを見出し、UHRF1 は正常な卵母細胞の構造形成に重要な役割を担っていることを明らかにした（論文投稿準備中）。なお、野生型と UHRF1 KO 卵母細胞の転写産物解析（トランスクリプトーム解析）の結果、UHRF1 を欠損しても転写には大きな影響がないことがわかり、UHRF1 がどのように上記タンパク質の量を制御しているのか興味がもたれる。

UHRF1 の精子形成過程における役割を調べるために、タモキシフェン投与で意図した時期に生殖細胞特異的に Cre を核内に移行する事ができる UHRF1 Dppa3-MCMP-Cre マウスを作製したが、Cre が一部の細胞でし

か発現せず、KO が不完全で UHRF1 の精子形成過程における役割の解明には至らなかった。現在、更なる条件検討をおこなっている。

[得られた成果の国内外における位置づけとインパクト]

卵母細胞および着床前胚の核内において UHRF1 が de novo DNA メチル化と維持メチル化に果たす役割をまとめた論文 (Maenohara et al., 2017) は PLoS Genetics に 2017 年 10 月に公表されて以降、現在 (2018 年 6 月 5 日) までに 6184 view となっており、非常に高い関心を国内外の研究者からもたれている。この論文は維持メチル化に関与するタンパク質として知られていた UHRF1 が、生体内で de novo DNA メチル化に関与することを世界で初めて示したもので (培養細胞では示されていた)、また UHRF1 母方 KO マウスの表現型が DNMT1 母方 KO マウスの表現型よりも重篤で、UHRF1 が単なる DNMT1 の共因子ではないことを示しており、こうした点が世界的に注目を集めている理由であると考えている。

[今後の展望]

UHRF1 KO 卵母細胞で、どのように細胞骨格を形成するチューブリンサブファミリータンパク質や、透明帯を構成するタンパク質、さらには膜直下に存在する裏打ちタンパク質が転写制御を介さずに減少するのかを明らかにしたいと考えている。UHRF1 は RING フィンガードドメインを持つ E3 リガーゼなので、細胞質に存在するタンパク質のユビキチン化をおこなっている可能性がある。今後はこのユビキチン化の基質となる候補タンパク質をプロテオミクス解析にて同定し、in vitro アッセイで基質であることの証明をおこないたい。また UHRF1 の RING ドメインのアミノ酸置換変異マウスを作成し、マウスの表現型の解析から、UHRF1 によるユビキチン化の影響を調べると共に、基質側のユビキチン化されるリジンのアミノ酸置換変異マウスを作成し、特定のタンパク質のユビキチン化の生理的意義を探りたい。

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 1 件)

① Shoji Maenohara, Motoko Unoki, Hidehiro Toh, Hiroaki Ohishi, Jafar Sharif, Haruhiko Koseki, Hiroyuki Sasaki, Role of UHRF1 in De Novo DNA Methylation in Oocytes and Maintenance Methylation in Preimplantation Embryos, PLoS Genetics, 査読有, 2017, 13(10), e1007042
DOI:10.1371/journal.pgen.1007042

[学会発表] (計 11 件)

① 上村 修平、前之原 章司、小倉 淳郎、井上 貴美子、山縣 一夫、堀 真由子、Jafar Sharif、古関 明彦、植田 幸嗣、鶴木 元香、佐々木 裕之、エピジェネティック制御因子 Uhrf1 の卵子及び初期胚細胞質における新機能、第 40 回日本分子生物学会年会 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会)、2017 年

② 前之原 章司、鶴木 元香、Jafar Sharif、古関 明彦、藤 英博、大石 裕晃、佐々木 裕之、卵子形成および着床前発生過程の DNA メチル化制御における Uhrf1 の役割、第 39 回分子生物学会年会、2016 年

③ 前之原 章司、鶴木 元香、Jafar Sharif、古関 明彦、藤 英博、大石 裕晃、佐々木 裕之、卵子形成過程および初期発生における UHRF1 の役割、第 1 回 エピジェネティック修飾読み手分子の構造と生命機能をつなぐ会、2016 年

④ 前之原 章司、鶴木 元香、Jafar Sharif、古関 明彦、藤 英博、大石 裕晃、佐々木 裕之、卵子形成過程および初期胚発生期の DNA メチル化制御における Uhrf1 の重要性、第 10 回エピジェネティクス研究会年会、2016 年

⑤ Shoji Maenohara, Motoko Unoki, Hidehiro Toh, Hiroaki Ohishi, Jafar Sharif, Haruhiko Koseki, Hiroyuki Sasaki, Essential role of Uhrf1 during oocyte growth and preimplantation development, The 4th Cold Spring Harbor Asia conference on Chromatin, Epigenetics and Transcription, 2016 年

⑥ 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ける Uhrf1 の重要性、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年

⑦ 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ける Uhrf1 の重要性、第 60 回日本人類遺伝学会、2015 年

⑧ Motoko Unoki, Shoji Maenohara, Atsuo Ogura, Kimiko Inoue, Kazuo Yamagata, Hidehiro Toh, Hiroaki Ohishi, Jafar Sharif, Haruhiko Koseki, Koji Ueda,

Hiroyuki Sasaki, Epigenetic regulator Uhrf1 plays a role in the oocyte cytoplasm that is essential for pre-implantation development, 第40回内藤コンファレンス「エピジェネティクスーヒストンコードから治療戦略へ」、2015年

⑨ 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、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、生殖エピゲノム若手勉強会、2015年

⑩ 鵜木 元香、エピジェネティクス制御機構の理解を目指して～DNA メチル化結合タンパク質 UHRF1 の発見から今までとこれから～、生化学若い研究者の会、2015年

⑪ 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、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

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

該当なし

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

(3) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

小倉 淳郎 (OGURA, Atsuo)
独立法人理化学研究所 バイオリソースセンター・室長
研究者番号：20194524

山縣 一夫 (YAMAGATA, Kazuo)
近畿大学 生物理工学部 遺伝子工学科・准教授
研究者番号：10361312

有田 恭平 (ARITA, Kyohei)
横浜市立大学 生命医科学研究科・准教授
研究者番号：40549648

植田 幸嗣 (UEDA, Koji)
がん研究会 がん研究所 がんプレシジョン医療研究センター・プロジェクトリーダー
研究者番号：10509110

シャリフ ジャファル (SHARIF, Jafar)
独立法人理化学研究所 生命医科学研究センター・研究員
研究者番号：00577968

(4) 研究協力者

前之原 章司 (MAENOHARA, Shoji)
研究実施当時の所属：九州大学 生体防御医学研究所・大学院生
現所属：九州がんセンター・婦人科医師