

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06950

研究課題名(和文) DNAメチル化領域を制御するクロマチンダイナミクスの解明

研究課題名(英文) Chromatin reprogramming induces functional switching of DNA methylation enzyme

研究代表者

多田 政子 (TADA, Masako)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：10524910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：正確なDNAメチル化(5mC)の制御は、哺乳動物の胚発生分化に必須である。3種のDNAメチル化酵素である新規型Dnmt3a、Dnmt3bと維持型Dnmt1を全て欠損したES細胞(TKO ESCs)は、増殖できるが分化させると死滅する。これにDnmt1を強制発現させると、分化できるようになった。このTKO+1 ESCsの分化細胞ゲノムは徐々にメチル化され、Tet酵素による酸化体も検出された。クロマチンを緩和できる化合物を培地に添加すると、未分化状態でもDNAメチル化が起こった。以上の結果は、Dnmt1が生来の機能として持つ新規DNAメチル化活性がゲノムの緩和に伴い顕在化することを示す。

研究成果の概要(英文)：Accurate control of DNA methylation (5mC) is essential for mammalian embryogenic development. ES cells lacking all three types of DNA methyltransferases, de novo-type Dnmt3a and Dnmt3b and maintenance-type Dnmt1 can proliferate, but die immediately after cell differentiation. When Dnmt1 was expressed in the TKO ESCs, the TKO+1 ESCs became possible to differentiate. The differentiated cell genomes became gradually methylated, and Tet enzyme-mediated oxidation products of 5mC were also detected. DNA methylation occurred even in the undifferentiated state when compounds capable of chromatin activation were added to the cell culture medium. These results indicate that Dnmt1 possesses de novo DNA methylation activity as an innate function that appears only when genomes become extensively reprogrammed.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス DNAメチル化 ES細胞 クロマチン 胚発生 細胞分化 リプログラミング Dnmt

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現はエピジェネティクスとよばれる化学修飾によって可逆的に制御されている。その中でも DNA のメチル化修飾は、哺乳類の正常胚発生に必須である。その修飾を司る DNA メチル化酵素には、新規メチル化型の Dnmt3a と Dnmt3b、維持型の Dnmt1 がある。Dnmt1 は、精製した DNA を基質とした場合には、無修飾のシトシンをメチル化する新規メチル化酵素として機能できる。しかし、DNA が、ヌクレオソーム構造をとると Dnmt1 はメチル化できなくなる。これに Brg1 などのヘリケースを介在させると、Dnmt1 は再び新規メチル化酵素として働くことができる。この事実は、これまで哺乳類の細胞核の無修飾の DNA を Dnmt1 が新たにメチル化する活性が捉えられていないが、特定のクロマチン条件を有する細胞では、その活性が顕在化してくる可能性を秘めている。

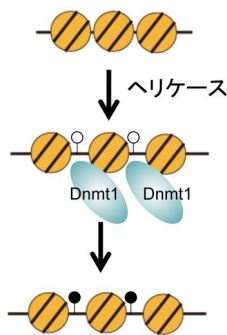


図1. Dnmt1の新規メチル化活性制御モデル図
Schrader, A. et al.,
PLOS ONE 10(10)
E0140076-22, 2015

上記参考文献結果から多田が作図

2. 研究の目的

本研究では、胚発生過程においてクロマチン緩和が起こると期待される幹細胞系列において、Dnmt1 の新規メチル化活性が顕在化するか再検討する。その存在が確認された場合、その活性制御機構、胚発生・細胞分化・細胞機能の恒常性維持に果たす役割の解析を目指す。

3. 研究の方法

材料

Dnmt1のみを発現するマウスES細胞を用いた。Dnmt3a と Dnmt3b を欠損したマウスES細胞では、Dnmt1のみが機能している (DKO ESCs)。また、Dnmt1/3a/3b を3重欠損したTKO ESC細胞にDnmt1を強制発現させた細胞(TKO+1 ESCs)を準備した。このDKO ESCsならびにTKO+1 ESCsを用いて、Dnmt1によるDNAメチル化修飾の増加が起こるか検討した。また、生殖系列を担う幹細胞の多くでは、Tet1/2酵素により5-メチルシトシン(5mC)が酸化され5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)に変換される。よって、5mCは5hmCとして検出される可能性が高い。本研究では、以下2つの培養条件で細胞核の状態を変化させ、Dnmt1による新規DNAメチル化活性が顕在化するか否か、また、どの分化段階で起こるのかを以下①～⑦の方法で解析した。

方法

培養法:

- (1) 低分子化合物およびシグナル分子によるクロマチンの緩和誘導
- (2) 細胞分化誘導

検出法:

細胞免疫染色

MeDIP・hMeDIP法(抗体を介した

5mC/5hmC修飾領域の同定)

イライザ法(抗体を介した5mC/5hmCの半定量解析)

bGTアッセイ(アイソトープを用いた

5hmCの定量解析)

Glu-qPCR法(抗体を用いない5hmC領域の同定)

BS-seq法(抗体を用いない5mC/5hmC領域の同定)

RT-qPCRやマイクロアレイによる遺伝子発現解析

4. 研究成果

Dnmt1は、これまでの報告どおり未分化なDKO ESCsならびにTKO+1 ESCsで新規メチル化活性を示さなかった。しかし、(1)の化合物処理によりクロマチンを緩和すると、TKO+1 ESCsに5mCと5hmCが検出された。また、DKO ESCsの5hmC領域が拡大した。

クロマチンの活性領域は、エピジェネティックに制御され、胚発生過程で変化する。まず、細胞分化を開始させると、TKO ESCsは分化能がなく死ぬが、TKO+1 ESCsは分化することが可能であった。この事実は、Dnmt1は、分化を制御する機能を持つことを示す。次に、(2)の方法でクロマチン緩和が誘導される原条形成過程へと分化を進めたところ、5mCと5hmC量が増加した。また、その領域は、ユークロマチンからヘテロクロマチンへと拡大した。5mCを5hmC化するTet酵素の働きは、クロマチンにより負に制御されている。すなわち、Tet酵素のみならずDNAメチル化酵素の動きもクロマチン構造の緩和に連動して起こると考えられる。

通常Dnmt1は、N末端にUhrf1やPCNAが結合し、これらの因子を介してDNAに作用できる。また、これらの因子がヘミメチル化DNAやヘテロクロマチンを認識する特性をもつことでDnmt1の維持メチル化活性が制御されている。本研究で、このN末端領域は新規メチル化には必須ではないことが分かった。しかし、N末欠損Dnmt1を発現するTKO+1 ESCsでは、ヘテロクロマチン集積や維持メチル化能の欠損による5mCレベルの低下が顕著であった。また、遺伝子発現からDNAのメチル化修飾量が増加する時期には、始原生殖細胞マーカーが著しく増加していたことから、リプログラミングが起きる細胞種特異的にDnmt1の活性が増加することを見いだした。

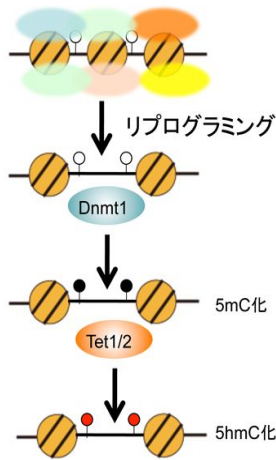


図2. 本研究の結果から得られたDnmt1の新規メチル化活性制御モデル図
DNAメチル化のないTKO ESCsであってもヒストンH3K9me3修飾を含む不活性型のDNAタンパク質がDNAを取り巻いている。リプログラミング時期には、Dnmt1が結合できる状態になる。この機序については解析中である。

今後の発展

Dnmt1の新規メチル化活性を持つ正常胚発生における機能やその重要性を明らかにしたい。

本研究は、H30年度採択基盤Cによって継続研究中である。未発表データのみであるため、実際のデータ、図の使用を差し控えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

1. Ueyama, T., Tsuji, S., Sugiyama, T., and Tada, M.: Fluorometric evaluation of CYP3A4 expression using improved transgenic HepaRG cells carrying a dual-colour reporter for CYP3A4 and CYP3A7. *Scientific Reports*;7(1):2874, 2017.
doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-017-03146-5>. 査読有り
2. Tsuji, S., Ohbayashi, T., Kohji Yamakage, Oshimura, M., and Tada, M.: A cytoplasmic form of Gaussia luciferase provides a highly sensitive test for cytotoxicity. *PLOS ONE*, 11(5):e0156202. doi:
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156202>, 2016. 査読有り
3. Kubiura, M., Ikuo Miura, Tada, M.: Chromosomal distribution patterns of global 5mC and 5hmC on the ZZ/ZW and XX/XY chromosomes in the Japanese wrinkled frog, *Rana rugosa*, induced by Tet methylcytosine dioxygenase enzymes. *Chromosome Science*, 18:15-22, 2015.
<https://doi.org/10.11352/scr.18.15> 査読有り

〔学会発表〕(計 26件) **受賞 3件**

1. 首浦武作志, Louis Lefebvre, 多田政子「クロマチン状態によるDnmt1のde novoメチル化活性制御」第12回日本

エピジェネティクス研究会年会(札幌市かでの2・7北海道立道民活動センター)2018.ポスターから選抜口頭発表

2. 首浦武作志, Aaron B. Bogutz, 木村博信, 田嶋正二, Louis Lefebvre, 多田政子「幹細胞系列でのエピゲノム制御機構を探る」第33回ダイバーシティCHIBA研究環境促進コンソーシアム(千葉大学西千葉キャンパス アカデミック・リンク・センターI棟 セミナールームまなび)2018.ポスター発表
3. 首浦武作志, Aaron Bogutz, 木村博信, 田嶋正二, Louis Lefebvre, 多田政子「Dnmt1機能のクロマチンによる負の制御」第68回染色体学会年会(広島大学学士会館)2017. **BP(ベストプレゼンテーション)受賞** 口頭発表
4. 首浦武作志, Aaron Bogutz, 木村博信, 田嶋正二, Louis Lefebvre, 多田政子「マウスDnmt1の初期胚発生過程特異的な機能的変化」第11回日本エピジェネティクス研究会年会(一橋大学一橋講堂)2017.ポスター発表
5. 首浦武作志, 多田政子「クロマチンリプログラミングに伴うDnmt1機能変換とXist発現増加」第5回X染色体研究会(東京工業大学すすかけ台キャンパスS2棟)2017. 口頭発表
6. Tada, M.: Bidirectional switching of Dnmt1 function during mouse ES cell differentiation. (Level 2 Meeting Room, Gurdon Institute, Cambridge University, Cambridge, UK) 2016. 招待講演
7. 浅野有美, 林礼佳, 首浦武作志, 石下聡, 堀哲也, 木村宏, 松田洋一, 深川竜郎, 多田政子「ニワトリ染色体の核内配置制御機構の解明」第67回染色体学会年会(東京大学農学部弥生キャンパス弥生講堂一条ホール・アネックス)2016. **BP(ベストプレゼンテーション)受賞** 口頭発表
8. 石下聡, 辰本将司, 木下圭司, 中野幹治, 浅野有美, 多田政子, 郷康広, 松田洋一「ニワトリとニホンウズラの属間F₁雑種胚の致死表現型と染色体異常の解析」第67回染色体学会年会(東京大学農学部弥生キャンパス弥生講堂一条ホール・アネックス)2016. 口頭発表
9. 首浦武作志, Aaron Bogutz, 木村博信, 田嶋正二, Louis Lefebvre, 多田政子「マウスES細胞由来着床胚細胞におけるDNAメチル化とその機能」第39回分子生物学会年会(横浜市パシフィコ横浜)2016. **優秀ポスター受賞** ポスター発表
10. 奥山翔太, 川村文彦, 香月康宏, 黒崎とう子, 清水剛志, 辻咲織, 首浦武作志, 尾崎充彦, 香月加奈子, 押村光雄, 多田政子「CYP3A7発現レポーター搭載人工染色体を保持するマウスES細胞を用いた効率的な肝芽細胞分化条件の探索」(公益財団法人)鳥取産業進行機構第三回バイオ創薬研究会(田町キャンパスイノベーションセンター)2016.ポスター発表

11. 首浦武作志, Aaron Bogutz, 木村博信, 田嶋正二, Louis Lefebvre, 多田政子「マウス ES 細胞の分化開始を制御する Dnmt1 の重要な役割」第 10 回日本エビジェネティクス研究会年会『エビジェネティクスのこれまでとこれから』(千里ライフサイエンスセンター) 2016. ポスター発表
 12. Tada, M.: "Single-cell epigenome analysis based on immunostaining of metaphase chromosomes in mouse embryonic cells". 5th Korean Molecular and Cell Biology Conference Division of Mobile Genetic Elements and integrated Korea-Japan Chromosome Research Society Workshop. (Jang Geun Hall, Sahmyook University Centennial Building, Seoul, Republic of Korea) 2016. 招待講演
 13. 多田政子「X 染色体の不活性化を制御する DNA メチル化の役割を探る」第 4 回 X 染色体研究会 (鳥取大学染色体工学研究センター) 2016. 口頭発表
 14. 首浦武作志, 多田政子「ES 細胞の分化開始を制御する Dnmt1 の役割」第 4 回 X 染色体研究会 (鳥取大学染色体工学研究センター) 2016. 口頭発表
 15. 多田政子: 「発生過程における段階的リプログラミングの進行」理研セミナー(理化学研究所, 和光市, 研究交流棟 W426 会議室)2015. 招待講演
 16. Tada, M.: Stepwise epigenetic reprogramming during chicken embryonic development. Plenary lectures: New Technology in Chromosome Research, The 5th Asian Chromosome Colloquium (Kasetsart University, Bangkok, Thailand). 2015. シンポジウム
 17. Asano, Y., Hayashi, A., Kubiura, M., Matsuda, Y., Fukagawa, T., Kimura, H., and Tada, M.: Epigenetic reprogramming during chicken embryonic development. The 5th Asian Chromosome Colloquium (Kasetsart University, Bangkok, Thailand). 2015. シンポジウム
 18. 多田政子: 性染色体とエビジェネティクス「ニワトリ胚発生における染色体レベルの活性制御」第 38 回日本分子生物学会年会 BMB2015(神戸ポートアイランド神戸国際会議場) 2015. ワークショップ
 19. Lefebvre, L., Kubiura, M., Bogutz, A., Kimura, H., Tajima, S., and Tada, M.: Coordinated regulation of cyclic re-methylation by Dnmt1 and Dnmt3a/3b after demethylation through 5-hydroxymethylation and differentiation in mouse embryonic stem cells. The 40th Naito Conference (Sapporo, Japan). 2015. 国際学会
 20. Tada, M., Hayashi, A., Asano, Y., Kubiura, M., Ishishita, S., Hori, H., Kimura, H., Fukagawa, T., Matsuda, Y.: Stepwise reprogramming of global histone and DNA marks during chicken embryonic development. The 40th Naito Conference (Sapporo, Japan). 2015. 国際学会
 21. Kubiura, M., Miura, I., and Tada, M.: Intra-chromosomal distribution pattern of DNA methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in mitogen-induced amphibian peripheral blood cells. The 5th Asian Chromosome Colloquium (Kasetsart University, Bangkok, Thailand). 2015. 国際学会
 22. 首浦武作志, Aaron Bogutz, 木村博信, 田嶋正二, Louis Lefebvre, 多田政子「マウス ES 細胞の初期分化過程での Dnmt1 による新規 DNA メチル化獲得」第 38 回日本分子生物学会年会 BMB2015 (神戸ポートアイランド神戸国際会議場) 2015. 口頭発表
 23. 多田政子「ニワトリ胚発生過程での段階的なエビジェネティックリプログラミング」第 9 回日本エビジェネティクス研究会 (東京都千代田区, 学術総合センター) 2015. 口頭発表
 24. 石下聡, 辰本将司, 木下圭司, 浅野有美, 多田政子, 郷康広, 松田洋一「鳥類の種間雑種の初期胚におけるトランスクリプトーム解析」日本遺伝学会第 87 回大会(仙台市, 東北大学) 2015. 口頭発表
 25. 浅野有美, 林礼佳, 首浦武作志, 石下聡, 堀哲也, 木村宏, 松田洋一, 深川竜郎, 多田政子「ニワトリにおけるゲノムワイドなエビジェネティックスリプログラミング」第 38 回日本分子生物学会年会 BMB2015(神戸ポートアイランド神戸国際展示場) 2015. ポスター発表
 26. 浅野有美, 林礼佳, 首浦武作志, 石下聡, 堀哲也, 木村宏, 松田洋一, 深川竜郎, 多田政子「ニワトリ胚発生過程におけるゲノムワイドなエビジェネティックリプログラミング」第 9 回日本エビジェネティクス研究会 (東京都千代田区, 学術総合センター) 2015. ポスター発表
- 〔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〕
ホームページ等
<https://matada.wixsite.com/toho-scr-jpn>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
多田 政子 (TADA, Masako)
東邦大学・理学部・教授
- 研究者番号: 10524910