

平成 21 年 3 月 24 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19570146

研究課題名（和文） 幹細胞分化を制御する GCNF の DNA メチル化誘導機構

研究課題名（英文） GCNF mediated DNA methylation and stem cell differentiation

研究代表者

佐藤 憲子（SATO NORIKO）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：70280956

研究成果の概要（和文）：GCNF (germ cell nuclear factor)は囊胚期に一過性に発現し、幹細胞分化の全能性に重要な Oct-3/4 や Nanog などの遺伝子の転写抑制と DNA メチル化誘導を行う。本研究では GCNF 特異抗体を作成し、内因性 GCNF の細胞内局在及び相互作用分子の解析を行った。ES 細胞を分化させると GCNF は発現が誘導され、初期には DNA メチル化酵素 Dnmt3a2/b と後期には Dnmt3a1 と相互作用することを示した。

研究成果の概要（英文）：GCNF (germ cell nuclear factor) is expressed at the gastrulation stage during embryonic development. GCNF represses pluripotency genes such as Oct-3/4 and Nanog and induces DNA methylation of their regulatory regions. In this project, the specific monoclonal antibodies against GCNF have been newly prepared in order to analyze the endogenous GCNF protein during murine ES cell differentiation. By the co-immunoprecipitation study, interaction between endogenous GCNF and Dnmt3 proteins was confirmed. At the beginning of ES differentiation, the expression level of GCNF was low, but it interacts with Dnmt3a2 and Dnmt3b. At the later stage, GCNF was transiently upregulated and it interacts with Dnmt3a1. Mass spectrometry analysis has revealed that anti-GCNF immunoprecipitates contain Trim28 and PELP1 complex, but the further analyses will be required to assess its functional significance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：エピジェネティック制御

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：DNA メチル化、エピジェネティック制御

1. 研究開始当初の背景

GCNF (Germ cell nuclear factor)はリガ

ンドが同定されていない核内受容体であり、生殖細胞と囊胚期の初期胚に主に発現する。

初期胚における GCNF の主要な標的が Oct-3/4 や Nanog といった "Pluripotency genes" であることは Cooney らの GCNF ノックアウトマウスを作製実験により明らかになった。一方、Oct-3/4 は、胚性細胞の分化の全能性維持と分化の運命決定に必須の転写因子であり、その発現レベルが厳密に調節されることが重要である。囊胚期以降、Oct-3/4 は DNA メチル化されることにより発現抑制維持 (サイレンシング) される。しかし、Oct-3/4 プロモーター領域の DNA メチル化がどのような分子機構で誘導されるのかは明らかでなかった。私は、COS7 細胞を用いた過剰発現系において GCNF が DNA メチル化酵素と相互作用することを示し、GCNF が DNA メチル化酵素を Oct-3/4 プロモーターに動員する可能性を示唆した。

さらに、GCNF ノックアウト ES 細胞では、分化しても Oct-3/4 プロモーター領域がメチル化されないことが Cooney らのグループによって示され、GCNF による Oct-3/4 プロモーター領域のメチル化のシステムは、発生初期の新生 DNA メチル化機構を解明する上でよいモデル系であると考えられた。

2. 研究の目的

下記の課題の遂行により、GCNF を介した新生 DNA メチル化機構を解明することを目的とした。

(1) 内因性の GCNF が実際に胚性細胞の中で、内因性の DNA メチル化酵素と相互作用をすることを示す。

(2) 細胞内の GCNF は他のどのようなタンパク質と相互作用するのか、それが DNA メチル化制御にどのような意味を持つのかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究を遂行するにあたって、GCNF 特異抗体を作製することが最重要課題であった。

(1) GCNF 特異抗体の選定

GCNF 抗原として gp64 融合タンパク質の形で発現させた昆虫細胞 (東京大学先端科学技術センター浜窪隆雄教授) 及びペプチド (神奈川歯科大学野崎直仁博士) を用いてマウスモノクローナル抗体産出を依頼した。

総計 86 種の抗体をまず HEK293 細胞の FLAG-GCNF 過剰発現細胞を用いたウエスタンブロット、免疫沈降、免疫染色により第一次選定した。次に GCNF は発生初期に一過性に発現することを利用し、未分化 ES 細胞では発現していないが、分化誘導後に発現することを指標にウエスタンブロット及び免疫沈降により第二次選定した。

その結果、マウス GCNF タンパク質の N 末端側(aa2-70)の gp64 融合タンパク質に対する 2 種の抗体 (anti GCNF01, 02) ヒン

ジ領域(aa160-263)の gp64 融合タンパク質に対する 1 種類の抗体(anti-GCNF03)が GCNF を強く認識した。しかし、C 末端側 (aa258-494) の gp64 融合タンパク質を用いた場合は、GCNF を認識する抗体が得られなかった。また、N 末端側のペプチド(aa1-19)に対する 3 種の抗体(anti-GCNF04, 05, 06)は GCNF を強く認識したが、N 末端側の別のペプチド(aa37-55)を用いた場合には GCNF を認識する抗体が得られなかった。

(2) ES 細胞分化系

ES 細胞には A3-STAT3ER を用いた。この細胞を用いる利点は、ES 細胞の未分化状態を 4HT 存在下に維持しやすい点である。In vitro の分化方法としては、LIF, 4HT 除去後、レチノイン酸添加して単層培養することにより原始内胚葉に分化させる方法 (分化)、胚様体を形成させる方法 (分化)、胚様体を形成させて、4 日目からレチノイン酸を加える方法 (分化) いずれかをとった。

(3) プロテオミクス解析

磁気ビーズに抗 GCNF モノクローナル抗体を架橋し、細胞全抽出液、核抽出液等と反応させた後、Sodium3-((2-methyl-2-undecyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)-1-propanesulfonate により溶出させた。溶出物の質量分析解析を東京大学先端科学技術センター浜窪隆雄教授、川村猛博士に依頼した。

(4) クロマチン分画

ヒストン H1 を含まない弛緩型クロマチン S1, ヒストン H1 を含む凝縮クロマチン S2, 核マトリクスを含む P 分画を Rose, Garrard らの方法に準じて調整した。

4. 研究成果

(1) GCNF 特異抗体の評価

HEK293 細胞の FLAG-GCNF 過剰発現細胞、及び ES 細胞分化系 () を用いて、総合的に GCNF 特異抗体の特性を評価した。(表 1)

	エピトープ	ウエスタンブロットにおける特異性、感度	免疫沈降における GCNF の回収率	免疫染色における特異性
anti GCNF01	aa2-70		◎	
anti GCNF02	aa2-70		◎	
anti GCNF03	aa160-263		○	○
anti GCNF04	aa1-19		◎	
anti GCNF05	aa1-19		◎	
anti GCNF06	aa37-55	○		

(2) ES 細胞分化過程において、GCNF は一過性に発現上昇し、その初期には Dnmt3a2/b と相互作用するが、後期には Dnmt3a1 と相互作用する。

ES 細胞分化系における内因性の GCNF タンパク質の挙動を詳細に解析した。A3-STAT3ER 細胞の分化の系においては、分化 6 日目に GCNF の発現は一過性に上昇

した。このときの GCNF タンパク質は核抽出液 1 µgあたり約 100-150 pgと推定された。(図1)

これまでに、同じ分化条件で Oct-3/4 プロモーター領域のメチル化が 6 日目頃に進行することを確認している。

同条件の核抽出液をもちいて抗 GCNF 抗体による免疫沈降を行い、内因性の GCNF タンパク質と DNA メチル化酵素との相互作用について検討した。抗 GCNF 抗体 01, 02, 04, 05 はどれも内因性 GCNF タンパク質を効率よく免疫沈降することができた。それらの免疫沈降物には DNA メチル化酵素 Dnmt3a1, Dnmt3a2, Dnmt3b タンパク質が共沈されていた。分化 4 日目には、GCNF タンパク質の発現量はまだまだ多くはないが、濃縮した免疫沈降物の中には、Dnmt3a2 と Dnmt3b が含まれていた。分化 6 日目には GCNF の発現量は増加し、免疫沈降物の中には主に Dnmt3a1 が含まれていた。(図2) GCNF の Dnmt3

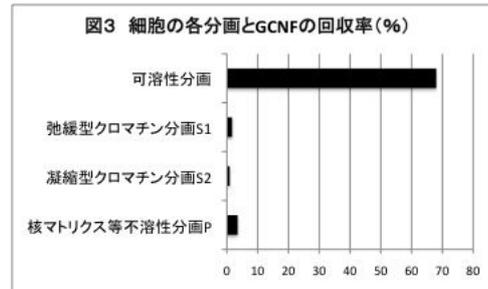
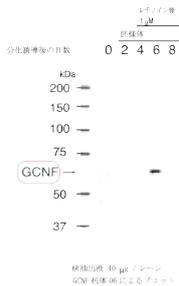
との相互作用にアイソフォームによる差はみられないので GCNF は Dnmt3 のアイソフォームを区別して機能しているわけではないと考えられた。それは Dnmt3a と Dnmt3b は複合体を形成している (Mol Cell Biol. 2007 Dec; 27(24): 8748-59.) ことと矛盾しない。また、Dnmt3 の中で GCNF と相互作用する分画はどのアイソフォームの場合も細胞内 Dnmt3 タンパク質量全体の 0.1 % 以下と推定された。

(2) 内因性 GCNF タンパク質の大部分は核可溶性分画に存在しており、わずか約3%が核マトリクスを含む不溶性クロマチン上に存在する。

GCNF は細胞質にはほとんど存在せず、核内の可溶性分画に検出される。胚様体を回収し、NP40 可溶性分画、クロマチン分画 S1, S2 及び不溶性クロマチン分画 P に分けた。本実験では不溶性分画を超音波破碎によりさらに可溶化した。1.5 x 10⁷ 個の核に対して 4 U の MNase を加えた時の各分画の GCNF の回収率を図3に示した。

Dnmt3a2, Dnmt3a1 は、核内タンパク質だが

図1. ES細胞分化過程におけるGCNFの発現



可溶性分画には検出されず、主に S2 分画に検出される。一部は不溶性分画 P にも存在する。従って、GCNF と Dnmt3a1, Dnmt3a2 は主に核の不溶性分画の中で相互作用していると考えられた。つまり、このことは、核マトリクス等で GCNF のごく一部と Dnmt3a のごく一部が相互作用し、クロマチンに作用していることを示唆している。

(3) GCNF 相互作用タンパク質の探索結果

胚様体の細胞抽出液あるいは核抽出液は、界面活性剤を用いただけでは不溶性となるクロマチン分画を失わないよう、超音波破碎、あるいは DNA 消化酵素を用いて調整した。細胞を溶解するときの塩濃度は 100-150 mM とした。(300 mM にした場合も相互作用するタンパク質の結果は変わらなかった。) 抗 GCNF 抗体 01, 02, 04, 05 を用いた免疫沈降によって、数 ng 以上の内因性 GCNF を回収し、その免疫沈降物成分を質量分析によって解析した。このとき、細胞抽出液を用いた場合と核抽出液を用いた場合との間で、結果的には GCNF の同定率及び共沈する核内タンパク質成分にあまり差が認められなかった。

免疫沈降物成分をそのまま質量分析する方法では、抽出液中全体で相対的に量の多いタンパク質(ヘテロ核リボヌクレオタンパク質、リボソームタンパク質、細胞骨格系タンパク質、スプライシング関連因子等)が混入することは避けられないが、それ以外の同定されたタンパク質の中で機能的に GCNF と関連するタンパク質を探索することを目的とした。

抗 GCNF01 抗体免疫沈降物には PSPC1-NONO-SFPQ 複合体の構成成分がすべて含まれており、それらの同定率は GCNF 同定率より高かった。

抗 GCNF02 抗体免疫沈降物には CARM1 及び Trim28 が同定され GCNF の同定率よりも高かった。

抗 GCNF04 及び抗 GCNF05 抗体の免疫沈降物には PELP1 複合体(PELP1, TEX10, Las11, SENP3)及び Trim28 が同定された。Trim28(別名 TIF1, KAP1)と GCNF の同定率は同程度だったが、PELP1 複合体の同定率はそれより高かった。

