

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770207

研究課題名 DNA メチル化制御因子 PGC7/Stella の機能解析

研究課題名 Functional analysis of PGC7/Stella as a DNA methylation regulator

研究代表者

中村 肇伸 (NAKAMURA TOSHINOBU)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80403202

研究成果の概要 (和文) : 受精卵における PGC7 の機能解析を行い、PGC7 はヒストン H3 の 9 番目のリジンがジメチル化された場合にヒストンと強く結合し、能動的 DNA 脱メチル化を阻害することを明らかにした。また、PGC7 を体細胞に強制発現させた場合には、初期胚の場合とは逆に、脱メチル化を誘導することを見出した。さらに、PGC7 と結合するたんぱく質として、維持メチル化に関与する Np95 を同定した。最終的に、PGC7 は Np95 と結合することにより Np95 の複製フォークへの局在を阻害し、結果として脱メチル化を促進することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : We found that PGC7 protects against active DNA demethylation via the binding to di-methylated histone H3 lysine9 in fertilized egg. In addition, we found that over expression of PGC7 induced DNA demethylation in somatic cells. Furthermore, we identified Np95, which is associated with maintenance of DNA methylation, as a binding partner of PGC7. Finally, we revealed that PGC7 inhibited the binding between Np95 and replication fork.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：クロマチン、PGC7、DNA メチル化、ヒストンメチル化、

1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化状態は、初期発生においてダイナミックに変化する。受精後すぐに、精子に由来する男性ゲノム、卵子に由来する女性ゲノム、いずれにおいても、大規模な DNA の脱メチル化が生じる。この過程において、女性ゲノムでは、DNA 複製にともない受動的

な脱メチル化が生じるのに対して、男性ゲノムでは DNA の複製が開始される以前から、能動的な脱メチル化が生じる。この DNA 脱メチル化のタイミングの「ずれ」は、エピジェネティック不均等性とよばれ、正常な発生に必須と考えられている。また、男性ゲノムと

雌性ゲノムが区別される現象であるゲノムインプリンティングも哺乳類の発生・分化に必須であり、この現象もDNAのメチル化により制御されている。しかし、これらの現象において、どのようにDNAメチル化が制御されているかは、DNAメチル化酵素（DNA methyl transferase; DNMT）が関与すること以外、その重要性にもかかわらず、ほとんど未知のまま残されていた。

2. 研究の目的

PGC7 は、初期胚、始原生殖細胞、卵細胞において特異的に発現し、受精後に細胞内局在が細胞質から核へと変化するタンパクである。申請者は、PGC7 が、雌性ゲノムのDNAメチル化を能動的脱メチル化から保護する機能を有し、エピジェネティック不均等性の形成に必須であることを示している（Nakamura, T. et al. *Nature Cell Biol.* 2007）。

本研究では、分子生物学的、生化学的および発生工学的手法を用いることにより、DNAメチル化制御におけるPGC7の分子機構を解明することを目的とした。また、得られた研究成果に立脚した新たなエピジェネティック制御法の開発にも挑戦した。

3. 研究の方法

(1) PGC7の生化学的性質の解析

受精卵の雌雄の前核において、ヒストンH3の9番目のリジン(H3K9)のメチル化は、ゲノムDNAのメチル化と厳密に対応しており、受精後の雌性前核ゲノムのDNAメチル化の維持に必要であると考えられてきた（Santos, F., et al. *Dev. Biol.* 2005）。しかし、PGC7欠損卵では、雌性前核においてゲノムの脱メチル化が認められるにもかかわらず、H3K9のメチル化には異常が認められない、という乖離が認められた。このことから、PGC7は、受精卵においてH3K9のメチル化修飾を認識してクロマチンと結合し、DNA脱メチル化の制御に関与しているという可能性が考えられる

この可能性を検証するために、H3K9の

メチル化酵素G9aを欠損し、メチル化H3K9が存在しないES細胞を用いた解析をおこなう。これまでに、G9a欠損ES細胞から精製したクロマチンは、野生型から精製したクロマチンと比較して、PGC7との結合が弱くなるという予備的な結果を得ている。次に、受精卵の前核においても、H3K9のメチル化状態がPGC7とクロマチンとの結合能に影響を与えるかどうかを検討する。H3K9の脱メチル化酵素Jhdm2aのmRNAを受精卵にインジェクションすることにより、雌性前核のH3K9を脱メチル化できることを予備的な実験で見出しているため、この方法を用いてH3K9を脱メチル化させ、PGC7のクロマチンとの結合能、および、ゲノムDNAのメチル化状態についての解析を行なう。さらに、全てのDnmtを欠損するためにメチル化が認められないES細胞（Tsumura, A., et al. *Genes Cells.* 2006）を用いて、ゲノムのメチル化状態が、PGC7とクロマチンとの結合に違いを生じさせるかどうかについての検討を行なう。

(2) PGC7と相互作用する分子の探索

これまでの解析から、PGC7/Stellaは、単独ではなく、何らかのタンパクと複合体を形成して、雌雄のゲノムを識別し、DNAメチル化制御に関与している可能性が高い。PGC7と結合するタンパクの遺伝子を得るため、Yeast two-hybrid法による卵細胞のライブラリーのスクリーニングを行なっている。これまでに、メチル化制御に関与する可能性のある分子が得られており、その分子についての解析を継続する。結合が確認できた場合には、遺伝子欠損マウスを作成し、生体内での機能を検討するとともに、初期胚におけるメチル化の維持に関与するかどうかを調べる。また、ライブラリーのスクリーニングをより大規模におこなっていく。

(3) 体細胞における脱メチル化機構の解析

PGC7を体細胞に強制発現させると、DNAの

脱メチル化が促進されることを見出しつつある（申請者ら、未発表データ）。また、PGC7による体細胞ゲノムの脱メチル化は、DNAメチル化阻害剤の添加や Dnmt を欠損させた場合とは異なり、毒性が低く、細胞の生存に影響は与えないという予備的な成果も得ている。そこで、まず、PGC7による体細胞ゲノムの脱メチル化が、維持メチル化の阻害によるものであるかどうかを明らかにするために、細胞分裂と脱メチル化の関係についての解析をおこなう。PGC7による脱メチル化に細胞分裂が必要な場合には、PGC7が維持メチル化酵素を阻害していると考えられるため、維持メチル化酵素 Dnmt1の細胞内局在およびメチル化活性についての解析をおこなう。また、細胞分裂を必要としない場合には、PGC7が、新規にDNAメチル化を生じさせる酵素である Dnmt3a および Dnmt3b の細胞内局在およびそのメチル化活性に影響を及ぼす可能性が高いので、この点についての検討をおこなう。さらに、PGC7をコンディショナルに発現させることが可能なマウスを作成し、DNAの脱メチル化が生体に及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

(1) PGC7の生化学的性質の解析

本研究では、PGC7が受精卵においてH3K9のメチル化を指標にして、雌性ゲノムを認識しているとの仮説をたて、H3K9のメチル化がPGC7とクロマチンの結合に及ぼす影響を検討した。その結果、H3K9のメチル化酵素 G9a を欠損する ES 細胞のクロマチンは、野生型と比較して PGC7 との結合が弱いことが明らかとなった。また、野生型の ES 細胞に PGC7 を過剰発現させた場合には、エンドヌクレアーゼに対する感受性が低下したが、G9a 欠損 ES 細胞では変化は認められなかった。さらに、H3K9の脱メチル化酵素 Jhdm2a を受精卵に過剰発現させた場合、H3K9の脱メチル化だけで

はなく、ゲノムの脱メチル化も生じた。

以上から、PGC7は、H3K9がメチル化された雌性クロマチンと強く結合することにより、雌性ゲノムを能動的脱メチル化から保護することが明らかになった。

(2) PGC7と相互作用する分子の探索

本研究では、Yeast two-hybrid法による卵細胞のライブラリーのスクリーニングを行い、PGC7と結合する候補分子として、Np95、Rnf8、PIAS4、Prdm4を得た。PGC7との結合を免疫沈降法で確認したところ、これらの中で Np95 だけが PGC7 と結合することが分かった。また、GST pull down assay により PGC7 は Np95 と直接結合していることが明らかになった。Np95 は、Dnmt1 を複製部位にリクルートすることにより、メチル化の維持に関与することが報告されているため、今後、受精後のメチル化維持に関与するかどうかを Np95 卵細胞特異的ノックアウトマウスの解析により明らかにする予定である。

(3) 体細胞における脱メチル化機構の解析

PGC7によるDNAメチル化保護機構を解析する過程において、体細胞である NIH3T3 に PGC7 を強制発現させたところ、受精卵の場合とは逆に、DNA脱メチル化が促進されることが明らかになった（申請者ら、未発表データ）。この PGC7 による DNA 脱メチル化は、DNA 複製阻害剤である Mitomycin-C で処理することにより阻害されることが分かった。このことから、PGC7 による DNA 脱メチル化には、DNA の複製が必要であり、PGC7 は体細胞において、受動的脱メチル化を促進していると考えられた。

PGC7による体細胞でのDNA脱メチル化は受動的であること、また、PGC7とNp95の結合が確認されたことから、本研究では、PGC7がNp95の機能に及ぼす影響に着目して、PGC7によるDNA脱メチル化機構の解明を目的に研究を行った。

まず、PGC7とNp95の結合部位をGST pull

down assay により決定した。その結果、PGC7 は Np95 の PHD ドメインと SRA ドメインを含む領域を介して Np95 と結合することが明らかとなった。また蛍光免疫染色法により、Np95 と Dnmt1 の局在を調べたところ

ろ、PGC7 の発現により、Np95 が複製フォークに局在できなくなることで、Dnmt1 の複製フォークへの局在が低下すること、が示された。また、Np95 を予め過剰発現させた細胞では、PGC7 による DNA 脱メチル化が生じないことから、PGC7 は Np95 の機能を阻害することによって DNA のメチル化を低下させることが考えられた。

さらに、PGC7 を発現させた NIH3T3 を長期培養すると、効率よくトランスフォーメーションを引き起こすことを明らかにした。(申請者ら、未発表データ)。MIAMI (Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers) 法を用いて、ゲノムワイドなメチル化解析をおこなったところ、PGC7 を発現させた NIH3T3 細胞では、ゲノム全体が脱メチル化されていることが明らかとなった。また、PGC7 を発現させた NIH3T3 数クローンについてマイクロアレイ解析を行った。その結果、すべてのクローンで脱メチル化は観察されたが、クローン間で共通して上昇または低下する遺伝子はほとんど観察されなかった。このことから、PGC7 は特定の遺伝子の発現を制御することによりトランスフォーメーションを引き起こすのではなく、ゲノム全体の脱メチル化を介してトランスフォーメーションを引き起こす可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計6件)

- ① 中村肇伸、劉有容、中島啓行、立花誠、眞貝洋一、仲野徹、PGC7/Stellaによるインプリント遺伝子のDNA脱メチル化保護機構の解明、BMB2010、2010.12.8、米子市文化ホール
- ② Toshinobu Nakamura、Yu-Jung Liu、Hiroyuki Nakashima、Makoto Tachibana、Yoichi Shinkai、Toru Nakano、Di-methylation of histone H3 lysine 9 targets PGC7/Stella to protect against active DNA demethylation in early embryogenesis、International Symposium on Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells、2010.11.22、Kyushu University
- ③ 中村肇伸、劉有容、中島啓行、立花誠、眞貝洋一、仲野徹、PGC7/Stellaによるインプリント遺伝子のDNA脱メチル化保護機構の解明、第4回エピジェネティック研究会、2010.5.22、米子市文化ホール
- ④ Toshinobu Nakamura、Yu-Jung Liu、Hiroyuki Nakashima、Makoto Tachibana、Yoichi Shinkai、Toru Nakano、Linkage between histone modification and DNA methylation in early embryogenesis、8th Stem Cell Research Symposium、2010.5.14、Awaji Yumebutai International Conference Center
- ⑤ Toshinobu Nakamura、Yu-Jung Liu、Hiroyuki Nakashima、Makoto Tachibana、Yoichi Shinkai、Toru Nakano、Di-methylation of histone H3 lysine 9 is prerequisite for the protection against active DNA demethylation in fertilized egg、第32回日本分子生物学

会年会、2009. 12. 12、パシフィコ横浜

- ⑥ 中村肇伸、劉有容、中島啓行、立花誠、眞貝洋一、仲野徹、PGC7/StellaによるDNA脱メチル化保護機構の解明、第三回エピジェネティック研究会、2009. 5. 22、学術総合センター（東京都千代田区）

〔図書〕（計1件）

- ① 中村肇伸、仲野徹、初期発生の重要イベントとエピジェネティック制御、再生医療、査読無、8巻、(2009)、23-29

〔その他〕

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/nakano/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 肇伸 (NAKAMURA TOSHINOBU)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80403202