

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 25 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650005

研究課題名(和文) Glial cells missingによるDNA脱メチル化の解析

研究課題名(英文) Analysis of DNA demethylation by Glial cells missing genes

研究代表者

等 誠司(Hitoshi, Seiji)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：70300895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNA脱メチル化は、胚発生期の遺伝子発現調節に重要な役割を担うエピゲノム機構の1つだが、その分子機構には不明な点が多かった。研究代表者は、Gcm遺伝子が初期発生における能動的DNA脱メチル化に関与することを見出したことから、GcmによるDNA脱メチル化のメカニズムに対して生化学的にアプローチした。先行研究で報告されている反応条件では、活性が認められないことから、Gcmタンパク質によるDNA脱メチル化は、これまでに報告のない反応様式をもっていることが示唆された。一方、受精直後の胚の解析では、Gcm2ノックアウトマウスに由来する精子と卵子を用いた顕微授精胚において、発生異常が観察された。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic mechanisms include DNA methylation and histone modifications, which occur without changing the DNA sequence and alter gene expression. The DNA methylation was frequently found in transcriptionally inactive gene loci and it was thought to be a unidirectional and persistent process to silence gene action. However, recent findings have challenged this notion and suggest that 5-methylcytosine can be reversed to cytosine even in postmitotic neurons by active DNA demethylation process. We have recently identified Gcm genes are responsible to the active demethylation in early mammalian development. Here, we investigated biochemical characteristics of the active DNA demethylation by Gcm and found that it could work in a quite novel fashion. In addition, we observed that Gcm2 deficient embryos made by in vitro fertilization showed abnormal cell divisions by 4-cell stage. These results suggest that Gcm genes play critical roles in the epigenetic regulation of early embryos.

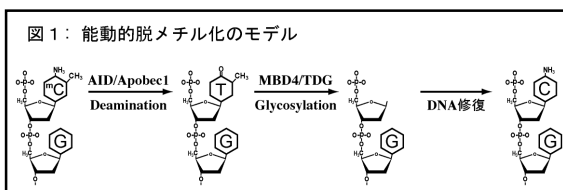
研究分野：神経化学

キーワード：エピジェネティクス 能動的DNA脱メチル化 受精卵

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の周辺、特にプロモーター領域にしばしば存在する CpG アイランドなどにおいて、CpG のシトシンがメチル化されることによって遺伝子の転写が強力に抑制される。この DNA メチル化は、やはり転写を調節するヒストンの修飾と併せ、エピジェネティクス制御と呼ばれる。DNA メチル化/脱メチル化は、発生期に未分化細胞が運命決定していく際に非常に重要であるのみならず、分裂を終えて分化した細胞、例えば成体脳の神経細胞においてもダイナミックに変化し(Ma *et al.*, *Nat Neurosci* 2010)、遺伝子転写の調節に重要な役割を担っていることが最近判ってきた。DNA 脱メチル化にはゲノム複製を必要とする受動的脱メチル化と、必要としない能動的脱メチル化とがあり、特に後者は受精直後の雄性前核のグローバルな DNA 脱メチル化に関与することが知られるが、その分子機構には不明な点が多い。

能動的 DNA 脱メチル化の分子機構は長らく全く判っていなかったが、ごく最近 zebrafish において複数のステップからなる能動的脱メチル化モデルが提唱され、哺乳類でも同じ機構が働き得ることが示された(Rai *et al.*, *Cell* 2008; Kim *et al.*, *Nature* 2009)。これには、図 1 に示すように Activation-induced deaminase (AID)/Apobec1 によるメチル化シトシンの脱アミノ化(チミンへの変換)、Methyl-CpG-binding domain protein 4 (MBD4)/Thymine DNA glycosylase (TDG)による G/T ミスマッチのチミン除去、および DNA 修復の複雑なステップを必要とする。しかしながら、確かな能動的脱メチル化が起きている生命現象の報告は未だ非常に少なく、全ての能動的脱メチル化がこのメカニズムで説明できるのかどうか、現在非常にホットに議論されている研究領域である。



研究代表者は、初期胚の神経上皮細胞で神経幹細胞が形成されるメカニズムを研究する中で、*Glial cells missing (Gcm)* 遺伝子が *Hes5* 遺伝子プロモーター領域を能動的に脱メチル化することを見出した(Hitoshi *et al.*, *Nat Neurosci* 2011)。能動的脱メチル化を説明する分子機序として現在最も有力なモデル(Rai *et al.*, *Cell* 2008)とは、異なるメカニズムが存在する可能性が高いため、本研究を提案するに至った。

2. 研究の目的

gcm 遺伝子は、*Drosophila* においてグリアと神経細胞間の運命決定を担う遺伝子として同定されたもので、哺乳類では 2 個のホモ

ログ(*Gcm1*, *Gcm2*)が知られている。タンパク質 N 端に DNA の特定の配列に結合する GCM ドメインをもつ他は、既知のドメイン構造をもたず、その機能も不明な点が多い。DNA 脱メチル化には *Gcm1*, *Gcm2* の両者が関わるが、*Gcm2* がより重要な働きをしていると考えられる。本研究では、*Gcm1* や *Gcm2* に結合するタンパク質を精製・同定する。さらに、*Gcm1/Gcm2* を発現させた細胞の核抽出液や、精製タンパク質を用いて、*in vitro* の無細胞系で DNA 脱メチル化を検出できるアッセイ系を構築する。これにより、メチル化シトシンが脱メチル化される反応のステップや、必要な因子を明らかにする。解明された因子や分子機構が、受精直後の卵に存在し、機能しているかどうかを明らかにし、転写開始の分子機構の一端を解明することを目的とする。

エピジェネティクス制御は、今最もホットなトピックスの 1 つである。研究代表者は、*Gcm* 遺伝子が DNA の脱メチル化に関与することを初めて報告し、この分野の研究にインパクトを与えた。DNA の脱メチル化は、細胞のリプログラミングにも密接に関連することから、分化した細胞から iPS 細胞の作製の効率化や、iPS 細胞のステージを介さない細胞のリプログラミング(例えば線維芽細胞から神経細胞のような)の技術開発にも役立つ知見が得られると考えられる。

3. 研究の方法

(1) *Gcm1*, *Gcm2* に結合するタンパク質の同定

図 1 で記述した能動的 DNA 脱メチル化のモデルでは、AID/Apobec1, MBD4/TDG および DNA 修復因子に加えて、*Gadd45* などが 1 箇所に集積することが必要で、巨大な複合体を形成していると考えられる。*Gcm1*, *Gcm2* が関わる能動的 DNA 脱メチル化も、他の複数の因子を必要とする可能性や、上述のモデルの一部を共有している可能性などが考えられる。そこで、*Gcm1*, *Gcm2* による能動的 DNA 脱メチル化に関わる因子の同定を行う。

Gcm1, *Gcm2* は、GCM ドメインと呼ばれる DNA 結合ドメインをもち、特定の塩基配列を認識して結合することが知られている。さらに、*Gcm1/Gcm2* を過剰発現させた細胞の核抽出液を用いたゲルシフトアッセイにて、メチル化された DNA により強く結合することを示唆する予備の結果を得ている。さらに、5-ヒドロキシメチル化や G-T ミスマッチを含む DNA との結合についても検討する。それらの結果に基づき、*Gcm1/Gcm2* およびメチル化などの修飾を受けた DNA と結合するタンパク質を同定する。このために、FLAG タグを付加した *Gcm1*, *Gcm2* (FLAG-*Gcm1*, FLAG-*Gcm2*) を動物細胞で発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降させて得た結合タンパク質を、質量分析計で解析する。

(2) DNA 脱メチル化を検出できる *in vitro*

assay の構築

Gcm1, Gcm2 のタンパク質標品として、FLAG-Gcm1, FLAG-Gcm2 を細胞で過剰発現させた核抽出液から抗FLAG抗体で免疫沈降させたタンパク質標品、もしくは GST 融合タンパク質 (GST-Gcm1, GST-Gcm2) を大腸菌で大量発現させ、グルタチオンビーズカラムで精製したタンパク質標品を用いる。一方、合成オリゴ DNA を重合させることにより、5-メチル化や 5-ヒドロキシメチル化などのさまざまな修飾を加えた 2 重鎖 DNA を作製し、基質として用いる。Hes5 遺伝子プロモーター領域で、DNA 脱メチル化を受けることが判っている配列を使用し、[γ - 32 P]rATP で 5' 端をアイソトープ標識して用いる。

DNA 脱メチル化もしくは Glycosylation 反応のポジティブコントロールとして GST-MBD4 および GST-TDG を用いる。MBD4/TDG は、G-T ミスマッチを検知してチミンを除去する Glycosylase 活性と、弱いながら 5mC を除去する活性を示すことが報告されているので、その反応条件を参考にして反応の至適条件を検討する。反応後に、2 重鎖 DNA をアルカリ加水分解(90°C)することで、apyrimidine 部位で切断された 1 本鎖 DNA を検出する。

さらに、5mC や 5hmC、G-T ミスマッチを含む 2 重鎖 DNA に対して、Gcm1/Gcm2 が Glycosylase 活性を示すかどうか検討する。最初は核の粗抽出液を用い、活性が観察されたら精製 Gcm1/Gcm2 タンパク質を用いる。さらに、(1)の実験で同定されたタンパク質も適宜添加していく。

(3) Gcm2^{-/-}胚の初期発生の解析

Gcm2 ノックアウトマウスは、副甲状腺の無形成とそれによる低カルシウム血症によって出生後に死亡する新生仔があるものの、この時期を超えたマウスはほぼ正常に成長すると報告されている(Günther *et al.*, *Nature* 406: 199-203, 2000)。しかし研究代表者らは、Gcm2^{-/-}マウスの卵子と精子を用いた *in vitro* fertilization (IVF) の予備的な実験で、一定の確率で Gcm2^{-/-}胚に発生異常が生じることを見出している。そこでこの異常や他の表現型を探索し、精子と卵子のどちらにおける Gcm2 ノックアウトの影響が大きいのか調べる。受精直後の胚発生には卵子由来の核小体の存在が非常に重要であることが報告されている(Ogushi *et al.*, *Science* 319: 613-616, 2008) ので、核小体の数や分布などを重点的に観察し、Gcm2 の核内での局在や核小体における機能について、解析を進めていく。

4. 研究成果

(1) Gcm1, Gcm2 に結合するタンパク質の同定

標識タグを付加した Gcm1, Gcm2 タンパク質を用い、免疫沈降法によって結合するタンパク質の同定を進めた。ES 細胞や神経幹細胞でこれらの標識タグ付きタンパク質を発現

させ、標識タグに対する抗体で免疫沈降を試みたほか、平行して、標識タグ付き Gcm1, Gcm2 タンパク質を試験管内で合成し、ES 細胞や神経幹細胞の核タンパク質抽出液に対してプルダウンなども行ったが、現在までのところ上に挙げたタンパク質との相互作用は確認されていない。

本研究を開始してから、DNA の能動的脱メチル化に関して多くの研究の進展があり、例えば、メチル化シトシンが Ten-eleven translocation (Tet) タンパク質の働きで 5-ヒドロキシメチル化シトシンに変換され、最終的には DNA 修復のメカニズムでシトシンに戻る(外見上は脱メチル化が起きたようにみえる)というモデルが提唱され、現在では最有力なものと考えられている。そこで、Tet1~3 についても標識タグを付加したタンパク質を試験管内で合成し、Gcm1, Gcm2 との結合を調べたが、これらも有意なものは観察されなかった。今後さらに、GCM ドメインを含む DNA 断片を用いた免疫沈降などを試みていく予定である。

(2) DNA 脱メチル化を検出できる *in vitro* assay の構築

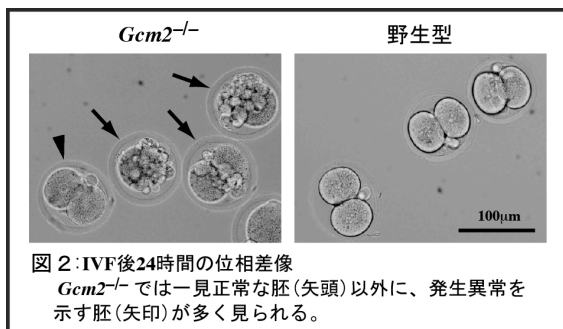
先行研究(例えば Kim *et al.*, *Nature* 461: 1007-1012, 2009)を参考にして、MBD4 による DNA 脱メチル化を生化学的に測定する実験系を構築した。また、Hes5 遺伝子プロモーター領域 DNA 断片を増幅し、*in vitro* メチル化反応によって高メチル化 DNA 断片を調整した。これらを用いて、Gcm1, Gcm2 のタンパク質による DNA 脱メチル化を計測したが、有意な活性は検出されなかった。今後は、Tet タンパク質による 5-メチル化シトシンのヒドロキシメチル化への関与などの可能性も追求していく必要があると思われる。

(3) Gcm2^{-/-}胚の初期発生の解析

Gcm2 ノックアウトマウスを詳細に解析したところ、マウスの遺伝手背景によって若干表現型が異なることがわかった。すなわち、CD1 (ICR)系統では Gcm2^{-/-}胚は胎生 12.5 日までに頭部の奇形を呈して致死となる。一方、129Sv/DBA の混合背景では、先行研究の通り出生し、一部は低カルシウム血症を乗り越えて発育して交配も可能となる。そこで、この遺伝的背景をもった Gcm2 ノックアウトマウスから未受精卵と精子を採取し、試験管内での顕微授精を行った(図 2)。

その結果、Gcm2^{-/-}マウスの卵子と精子を用いた *in vitro* fertilization (IVF) の実験で、一定の確率で Gcm2^{-/-}胚に図 2 に示すような発生異常が生じることを見出した。一方、野生型の卵子と精子や、ノックアウト(♂) x 野生型(♀)、野生型(♂) x ノックアウト(♀)の組み合わせや、ヘテロ(♂) x ヘテロ(♀)で産まれるノックアウト胚ではこのような異常はほとんど観察されなかった。従って、このような発生異常はノックアウト胚に特異的

な表現型であり、母性因子が関わっていることが示唆された。



ノックアウト(♂) x ノックアウト (♀) のノックアウト胚を用いて雄性前核の脱メチル化の過程を観察した。このノックアウト胚でも、受精が 8 時間程度で雄性前核の脱メチル化が進行し、それに反比例するように 5-ハイドロキシメチル化シトシンの染色性が上昇することが確認された。今後さらに、ノックアウト胚のエピゲノム状態を詳細に解析することにより、*Gcm1/2* による DNA 脱メチル化の分子機構や発生における意義が明らかになると考えられた。

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 7 件)

*は責任著者

- ① Naruse M, *Hitoshi S, *et al.* (他 7 名, 9 番目) The dorsoventral boundary of the germinal zone is a specialized niche for the generation of cortical oligodendrocytes during a restricted temporal window. **Cerebral Cortex** 査読有 in press
- ② Torii T, Hitoshi S, *et al.* (他 5 名, 4 番目) Determination of major sialylated N-glycans and identification of branched sialylated N-glycans that dynamically change their content during development in the mouse cerebral cortex. **Glycoconj J** 査読有 31: 671–683, 2014
- ③ Fuke S, Hitoshi S, *et al.* (他 7 名, 8 番目) A heterozygous Polg mutation causes motor dysfunction due to mtDNA deletions. **Annals of Clinical and Translational Neurology** 査読有 1: 909–920, 2014
- ④ †Zheng L-S, †Hitoshi S, †Kaneko N, *et al.* (他 9 名, 2 番目) Mechanisms for interferon- α -induced depression and neural stem cell dysfunction. **Stem Cell Reports** 査読有 3: 73–84, 2014 (†co-first author)
- ⑤ Ishino Y, *Hitoshi S, *et al.* (他 10 名, 12 番目) Bre1a, a histone H2B ubiquitin ligase, regulates the cell cycle and differentiation of neural precursor cells. **J Neurosci** 査読有 34: 3067–3078, 2014
- ⑥ Kumar A, *Hitoshi S, *et al.* (他 7 名, 9

番目) The Lewis X-related α 1,3-fucosyltransferase, Fut10, is required for the maintenance of stem cell populations. **J Biol Chem** 査読有 288: 28859–28868, 2013

- ⑦ Shimizu T, Hitoshi S, *et al.* (他 5 名, 6 番目) Olig2-lineage cells preferentially differentiate into oligodendrocytes but fail to survive in the chronic demyelinating lesion. **J Neurosci Res** 査読有 91: 178–186, 2013

[学会発表] (計 5 件)

研究代表者が筆頭著者の招待講演のみ

- ① Hitoshi S. “Epigenetics in the maintenance of neural stem cells.” 25th Meeting of the International Society for Neurochemistry (ISN) (2015 年 8 月, Cairns)
- ② Hitoshi S. 神経幹細胞からオリゴデンドロサイト系譜細胞が産生される分子機序. 第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会 合同大会 (2015 年 3 月, 神戸)
- ③ Hitoshi S. 精神疾患の病態に迫る. 第 57 回日本神経化学会・第 36 回日本生物学的精神医学会 合同年会 (2014 年 9 月, 奈良)
- ④ Hitoshi S. Epigenetics underlying the maintenance of neural stem cells. Neuroscience 2013 (2013 年 6 月, 京都)
- ⑤ Hitoshi S. Epigenetic mechanisms underlying the generation and maintenance of mammalian neural stem cells. 第 7 回エピジェネティクス研究会年会 (2013 年 5 月, 奈良)

[その他]

ホームページ等

滋賀医科大学 生理学講座 統合臓器生理学 部門ホームページ:

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqphysi1/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
等 誠司 (HITOSHI SEIJI)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70300895
- (2) 研究分担者
()
研究者番号:
- (3) 連携研究者
富田 江一 (KOICHI TOMITA)
高知大学・医学部・准教授
研究者番号: 80314285