

令和元年6月17日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07065

研究課題名(和文) 胚発生de novoメチル化におけるDNMT3作用機序と標的調節

研究課題名(英文) Mechanism of de novo methylation by DNMT3 in development

研究代表者

岡野 正樹 (Okano, Masaki)

熊本大学・発生医学研究所・准教授

研究者番号：50360863

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)：ゲノムDNAのメチル化修飾は、細胞の遺伝子のON/OFFの調節プログラムを長期間安定に維持・記憶するエピジェネティクスとよばれる分子機構の一つである。本研究では、ゲノムDNAにあらたなメチル化修飾を形成する、Dnmt3と呼ばれる酵素タンパク質に着目し、Dnmt3が複合体としてはたらくしくみを詳細に調べることができる実験系を、マウスES細胞を用いて作製した。この実験系を用いて、Dnmt3の動作原理の一端を明らかにする手がかりが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノムDNAのメチル化修飾は、遺伝子発現調節プログラムを安定に維持することによって、胚発生・造血・脳神経機能など多くの生命現象に重要な役割を果たしている。ゲノムDNAのメチル化修飾は、受精を経て一旦消去され、胚から成体まで発生・成長する過程で、さまざまな細胞に特徴的なゲノムDNAのメチル化修飾が形成される。本研究によって、胎生期・成長期においてDNAメチル化修飾が形成されるしくみへの理解が深まる。

研究成果の概要(英文)：Chemical modification of genomic DNA by methyl-group is an epigenetic mechanism that stably maintains gene regulatory programs in cells for long-term. In this study, we focused on DNA methyltransferase Dnmt3 family that establishes new methyl modifications in the genome. We generated an experimental system using mouse ES cells for analyzing regulatory mechanisms of Dnmt3 protein complex.

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノム DNA の未修飾領域に新たなメチル基を導入する機構「de novo メチル化」は、細胞の特異的な DNA メチル化の形成に必須である。正常な de novo メチル化制御は、胚発生や細胞分化、造血幹細胞の自己複製、神経細胞の特異的遺伝子発現制御、生殖細胞におけるゲノムインプリント形成などに必須であり、その破綻は精神遅滞をともなう遺伝性疾患や造血系疾患に深く関与する。

(2) de novo メチル化は DNA メチル化酵素 Dnmt3 によって制御される。哺乳類の Dnmt3 ファミリーは、酵素活性をもつ Dnmt3a、Dnmt3b、酵素活性はもたないが Dnmt3a/Dnmt3b の酵素活性を調節するアクセサリ因子 Dnmt3l からなる。(齧歯類には胎性期雄性生殖細胞で特異的に発現する Dnmt3c がある。)これまで Dnmt3 の酵素活性やクロマチン結合領域の調節についてさまざまな制御機構が明らかにされてきたが、依然として、Dnmt3 ファミリータンパク質がどのように特異的なゲノム DNA 修飾のプロファイルを形成するのか、不明な点が多く残されている。

(3) Dnmt3 ファミリー分子の生化学的特徴のひとつは、触媒ドメインを介した直鎖状多量体形成能である。Dnmt3a と Dnmt3l はヘテロ四量体を形成し、中央の 2 分子の Dnmt3a が触媒活性を担い、Dnmt3l 2 分子はその両端に配置される(図 1)。Dnmt3l は触媒活性に直接関与しないが、触媒活性非依存的に Dnmt3a の酵素機能を調節する。遺伝学的解析から、Dnmt3l を欠損したロックアウトマウスは生殖細胞における標的遺伝子領域の de novo メチル化が消失し、生殖細胞特異的 Dnmt3a ロックアウトマウスと同様の表現型を示す。このことは生殖細胞の de novo メチル化において Dnmt3a-Dnmt3l ヘテロ多量体形成が機能的に必須であることを強く支持する。一方、Dnmt3l ロックアウトマウスでは胚発生の de novo メチル化はおおむね正常に進行し、成体まで発生・成長する。このことから、Dnmt3l は生殖細胞特異的な de novo メチル化制御因子と考えられてきた。胚発生の de novo メチル化における Dnmt3 の作用においてアクセサリ因子様の機能が必要であるかどうか不明である。我々は Dnmt3a および Dnmt3b の酵素活性欠損変異マウス解析による独自の観察結果から、Dnmt3a/Dnmt3b においても触媒活性非依存的に DNA メチル化を調節する機能の重要性が示唆された。そこで、ES 細胞をモデル実験系として Dnmt3a/Dnmt3b の非触媒因子機能を検証する研究課題の着想を得た。



図 1 Dnmt3a-Dnmt3L 四量体

2. 研究の目的

マウス ES 細胞は、着床期胚の細胞モデルであり、胚発生における de novo メチル化制御の研究に適した培養細胞実験系である。ES 細胞は、3 つの Dnmt3 ファミリー遺伝子 (Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt3l) を強く発現する。さらに、それぞれの遺伝子から複数のアイソフォームが発現する。したがって、ES 細胞内では、Dnmt3 ファミリー分子とそのアイソフォームからなる、多様な組み合わせの Dnmt3 多量体が混在すると考えられる。

本研究では、内在性の Dnmt3 ファミリー分子を全て欠損したマウス ES 細胞を作製し、そこへ単独あるいは特定の組み合わせの Dnmt3 分子を再び導入することによって、Dnmt3 機能を評価しうる再構成実験系を構築する。この実験系を用い、酵素活性を保持あるいは欠損した Dnmt3 ファミリーを組み合わせ発現し、DNA メチル化状態などを比較することによって、Dnmt3 複合体としての酵素機能、標的選択性、非触媒因子機能を評価することを目的とする。

3. 研究の方法

個々の Dnmt3 多量体の機能を正確に評価するため、すべての内在性 Dnmt3 遺伝子を破壊した ES 細胞を作製し、そこへ外部から単独あるいは複数の組み合わせで Dnmt3 ファミリー分子とそのアイソフォームを導入・発現させる。

(1) Dnmt3a^{-/-}Dnmt3b^{-/-}Dnmt3l^{-/-} ES 細胞の作製 (1 回目) : 我々が以前作製した Dnmt3a^{-/-}Dnmt3b^{-/-} ES 細胞を用いて、2 回の遺伝子ターゲティングにより Dnmt3l 遺伝子を欠損させる。1 回目は Exon 4~10 をプラストサイジン S 耐性遺伝子カセットで置換したターゲティングコンストラクトを用いた。このコンストラクトの相同組換え効率が低かったため、2 回目は Exon 7~8 を置換するターゲティングコンストラクトを用いた。

(2) 上記で作製した $Dnmt3a^{-/-}Dnmt3b^{-/-}Dnmt3l^{-/-}$ 細胞へ、各 Dnmt3 分子を単独あるいは二種類の分子を組み合わせて再導入する。ES 細胞は、Dnmt3a, Dnmt3b の各二種類のアイソフォームタンパク質を含め、合計五種類の Dnmt3 タンパク質を発現する (図 2 ; Dnmt3a1, Dnmt3a2, Dnmt3b1, Dnmt3b6, Dnmt3l)。PiggyBac 発現システムを用いてこれらのタンパク質の発現ベクターを作製する。酵素活性をもつ Dnmt3a1, Dnmt3a2, Dnmt3b1 については酵素活性欠損変異体も作製する。

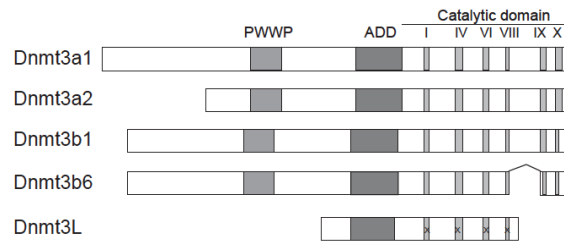


図 2 : マウス ES 細胞で発現する Dnmt3 ファミリーとアイソフォーム

(3) $Dnmt3a^{-/-}Dnmt3b^{-/-}Dnmt3l^{-/-}$ ES 細胞の作製 (2 回目) : $Dnmt3a^{flox/flox}Dnmt3b^{flox/flox}$ マウス胚盤胞から ES 細胞を樹立する。この細胞に対して CRISPR/Cas9 により Dnmt3l 遺伝子を欠損させる。さらに組換え酵素 Cre を一過的に発現し、loxP 配列依存的な組換えによって Dnmt3a, Dnmt3b 遺伝子を欠損させる。

4 . 研究成果

(1) マウス ES 細胞は、初期胚における *de novo* メチル化を制御する Dnmt3 ファミリー (Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt3l) を高度に発現する。Dnmt3 の機能を正確に評価する ES 細胞実験系を作るため、ES 細胞で発現する内在性 Dnmt3 を除去する必要がある。そのため、以前作製した $Dnmt3a^{-/-}Dnmt3b^{-/-}$ ES 細胞を用いて、2 回の遺伝子ターゲティングによって Dnmt3l 遺伝子のふたつのアレルのノックアウトをおこない、 $Dnmt3a^{-/-}Dnmt3b^{-/-}Dnmt3l^{-/-}$ ($Dnmt3a/3b/3l$ -TKO) ES 細胞を作製した。

(2) マウス ES 細胞は 3 つの Dnmt3 ファミリー遺伝子から 5 種類の Dnmt3 タンパク質を発現する。これら 5 種類の Dnmt3 タンパク質と、そのうち酵素活性をもつ Dnmt3 アイソフォーム 3 種類の酵素活性変異体の cDNA を PiggyBac 発現ベクターに組み込んだ。これらの発現ベクターを上記 (1) で樹立した $Dnmt3a/3b/3l$ -TKO 細胞に、単独あるいは酵素活性を保持あるいは欠損する Dnmt3 ファミリーを組み合わせて導入し、これらが発現するそれぞれのレスキュー細胞株を取得した。

(3) これらの細胞について、複数のゲノム領域の DNA メチル化状態を解析したところ、各 Dnmt3 ファミリーに特徴的な傾向を示す結果が得られた。Dnmt3a2 酵素活性変異体は、Dnmt3 酵素と共発現すると、競合阻害的に働く傾向が見られた。一方、Dnmt3b 酵素活性変異体は阻害的な効果が Dnmt3a ほど顕著ではないか中立的、ゲノム領域によっては正に作用する傾向が見られた。Dnmt3l は予想どおり、共存する Dnmt3a 酵素機能を促進した。これらの結果は、Dnmt3 ファミリーはそれぞれ異なる非触媒因子機能を持つことが示唆された。

(4) 一方、この解析の過程で、当初の Dnmt3 欠損 ES 細胞実験系に不十分な点が明らかになった。一つは、遺伝子機能を不活性化させたと考えていた Dnmt3l 欠損遺伝子から部分欠損タンパク質が生じていたことである。ウェスタンブロット解析により、 $Dnmt3a/3b/3l$ -TKO 細胞から予想されるサイズの Dnmt3l タンパク質シグナルが消失していた。一方、Dnmt3l の C 末端領域を認識する抗体で解析したところ、本来の分子サイズより小さいサイズの位置に微弱な Dnmt3l シグナルが観察された。これは Dnmt3l ノックアウト遺伝子アレルから部分欠損タンパク質が生じており、タンパク質として不安定なためシグナルが弱いと考えられた。ところが、この細胞に外来性 Dnmt3a を発現させると、微弱であったシグナルが増強されることが判明し、Dnmt3a 共存下で部分欠損タンパク質が安定化されることが示唆された。これは、部分欠損タンパク質に Dnmt3a と複合体を形成する能力が残存していることを意味する。遺伝子ノックアウトによって Dnmt3l のクロマチン認識結合に関わるドメインが除去されており、主要な Dnmt3l 生物機能は消失していると考えられる。しかし、Dnmt3a と複合体を形成しうるタンパク質が残存するため、実験系として、他の Dnmt3 複合体の機能や効果が隠れてしまう可能性が考えられた。もう一つの問題点は、導入した外来 Dnmt3 発現量の細胞サンプル間のばらつきが大きく、DNA メチル化状態への影響がでていることである。

(5) より信頼性の高いデータを得るため、上記の不十分な点を改良した新たな実験系を再構築した。 $Dnmt3a^{flox/flox}Dnmt3b^{flox/flox}$ マウス胚より ES 細胞を樹立し、CRISPR/Cas9 ゲノム編集により Dnmt3l 遺伝子のほぼ全域を除去した Dnmt3 欠損 ES 細胞を再作製した。また外来遺伝子の発現レベルをモニターできる改良を加えた発現系を作製した。これらの細胞と発現系を組み合わせる新たな実験系を構築した。これによって、より正確なデータ解析が可能となることが期待される。当初の実験系で得られた基本的な知見について再現性が得られており、実験系が動作していると考えられる。この実験系を用いて DNA メチル化状態と Dnmt3 クロマチン結合データを取得し、Dnmt3 複合体、Dnmt3a/Dnmt3b の非触媒因子機能、これらの標的選択性を明らかにす

る。これらのデータをまとめて論文として発表する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Hatazawa Y, Ono Y, Hirose Y, Kanai S, Fujii NL, Machida S, Nishino I, Shimizu T, Okano M, Kamei Y* and Ogawa Y*. Reduced Dnmt3a increases Gdf5 expression with suppressed satellite cell differentiation and impaired skeletal muscle regeneration. **FASEB J** 32:1452-1467, 2018 (査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Okano M. Regulation of de novo DNA methylation in mouse development. Key Forum: Stem Cell Traits and Developmental Systems. Kumamoto, Jan 11, 2018
2. 岡野 正樹, 阪上 守人, 竹林 慎一郎, 大田 浩, 松岡 智沙, 山際 晶子, 亀井 康富 マウス胚発生における de novo DNA メチル化酵素の機能と作用機序. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017), ワークショップ: DNA 複製とエピゲノム複製(3AW16), 2017 年
3. 岡野 正樹 マウス胚発生における DNA メチル化酵素の機能と作用機序. 日本モロシヌス研究会 2017 (シンポジウム) 2017 年

〔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

http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/stem_cell_biology/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。