

平成 21年 5月 28日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19570212

研究課題名（和文） 幹細胞特異的な DNA メチル基転移酵素の機能解析

研究課題名（英文） Analysis of stem cell specific de novo methyltransferases

研究代表者

渡邊 大介 (WATANABE DAISUKE)

北里大学・理学部・講師

研究者番号：00260175

研究成果の概要：新規型 DNA メチル基転移酵素である Dnmt3a および Dnmt3b のマウス成体組織における発現を解析した結果、小腸の crypt 細胞や、網膜の一部の神経細胞ならびに大脳の脳室周辺で産生され臭球へと移動する未分化な神経細胞の集団 (RMS) や臭球内の顆粒細胞において Dnmt3a が特異的に発現されていることを明らかにした。これらの結果は成体組織に存在する幹細胞の分化過程においても新規型 DNA メチル基転移酵素が重要な機能を有していること、また Dnmt3a が未分化な神経細胞のマーカーとなる可能性を示す結果となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学 発生生物学

キーワード：発生分化、再生医療

1. 研究開始当初の背景

(1) 生物の個体発生において各組織の形成過程には幹細胞と呼ばれる自己増殖能をもった一連の細胞群が存在する。発生初期においてはすべての細胞種をつくる基となる多能性幹細胞が存在し、やがて神経系や造血系などの基になる組織特異的な幹細胞が出現する。これら幹細胞の性質を明らかにし特定の細胞への分化を人為的に制御する事が再生医療を確立する上で重要な基礎研究になるものと考えられている。しかし幹細胞の未分化な状態がいかに維持され、その分化がど

のように制御されているかという基礎的な問題については未だ不明な点が多い。本研究の目的は遺伝子のエピジェネティク (DNA の塩基配列に依存しない遺伝子の発現制御) な調節機構と考えられる DNA のメチル化とそのメチル基転移酵素に注目し、幹細胞の発生と分化におけるその機能を解明することである。これらの研究から得られる、新たな知見は幹細胞の維持、増殖、分化を人為的に制御する技術に直接的に結びつくものと考えられ、再生医療等への応用が期待できる研究になるものと考えられる。

(2) 現在までにDNAのメチル化は遺伝子転写やクロマチンの形成を介してゲノムの機能を可塑的に制御していることが解かっている。また発生過程においてはDNAのメチル化が動的に変化して細胞の分化能が決定され、その後の組織特異的な遺伝子発現にも重要な働きをしているものと考えられる。我々はこれまでにDNAのメチル化を実際に行っている酵素群に着目し、その生体内における蛋白質レベルでの発現を調べたところ、DNA上に付加されたメチル化の情報を複製時に維持する、維持型のDNAメチル基転移酵素であるDnmt1が精巣や小腸に存在する自己増殖性の幹細胞で強く発現していることを発見した。またDNAにメチル基を新規に付加する、新規型DNAメチル基転移酵素(de novo methyltransferase)であるDnmt3bがマウス初期胚に発生する多能性を有した細胞集団であるエピプラスト(原始外胚葉)において一時的に発現が増大し、その後各組織への細胞分化とともに発現が消失すること、さらに別のde novo methyltransferaseであるDnmt3aがDnmt3bの発現を消失した組織で急激にその発現が開始される現象を発見し、2種類のde novo methyltransferaseの発現がマウス初期発生過程において切り替わる現象を明らかにした。また最近Dnmt3bがエピプラストのような全能性を有した幹細胞だけでなく、11.5日胚の背側大動脈から出現するCD34抗原陽性の造血幹細胞、ならびに精巣の精原細胞の分化過程においても初期胚と同様にDnmt3bからDnmt3aへの発現の切り替わりが行なわれている事を報告した。

以上の研究は現在まで漠然と捉えられてきたDNAのメチル化の現象を個々のメチル基転移酵素について各発生段階の細胞レベルで解析した初めての研究であり、Dnmt3bやDnmt3a等のde novo methyltransferaseの正確な発現の調節が胚発生過程において必要とされていること、ならびに造血幹細胞や精原細胞のように成体組織に存在する、分化の方向性が既に決定している幹細胞においても特定のde novo methyltransferaseによるDNAの修飾が幹細胞特異的な遺伝子の発現やその後の各組織への細胞分化を制御しているという、新たな幹細胞の分化モデルを提示することとなった。

2. 研究の目的

本研究では初期胚または成体組織に存在する既知または未知の幹細胞におけるDNAメチル基転移酵素群の発現とその機能を解析し、それらの機能から考えられる、細胞が幹細胞

として存在、または特定の細胞へと分化するためのメカニズムの解明を目的とする。そのためまず、まだ解析がなされていない多くの成体組織に存在する幹細胞およびその分化過程における個々のde novo methyltransferaseの詳細な発現の解析が必要である。これらの研究により現在までに我々が明らかにしてきた、幹細胞特異的なde novo methyltransferaseの発現、およびその分化過程におけるDnmt3bからDnmt3aへの発現の切り替わりの現象を幹細胞固有の特性としてより一般化することが可能となるものと考えられる。またさらにこれらde novo methyltransferaseの発現を指標として成体組織における新規の幹細胞の発見がなされるものと考えられる。

3. 研究の方法

マウス胚の器官形成過程に発生する造血幹細胞や神経幹細胞ならびに成体の組織内に存在する皮膚、神経、筋肉等の組織特異的な幹細胞における個々のde novo methyltransferaseの発現を解析し、またそれらの幹細胞が発生または分化する過程での発現の変化を詳細に調べ、幹細胞の分化とde novo methyltransferaseの関係を明らかにする。また同時にde novo methyltransferaseの発現を指標として成体組織に存在する新たな組織幹細胞を探索する。さらにES細胞のin vitroでの分化誘導系を用いた解析を行い、各de novo methyltransferaseの分化過程における発現の切り替わりや核内での局在の変動をconfocalレーザー顕微鏡を用いて解析する。次にDnmt3bおよびDnmt3aとGFPの融合蛋白質を発現するES細胞を作成し、ES細胞の分化過程におけるde novo methyltransferaseの挙動を生きた細胞内で調べる。さらにこれらの融合蛋白質を発現するES細胞またはDnmt3bおよびDnmt3aの発現量を改変したES細胞を用いてキメラマウスならびにキメラマウス由来のトランスジェニックマウスを作成し、それぞれのde novo methyltransferaseの初期発生および成体の組織幹細胞における機能をトランスジェニックマウスの表現型から解析する。

4. 研究成果

本研究の目的はDNAのメチル化とそのメチル基転移酵素に注目し、幹細胞の決定と分化におけるその機能を解明することである。これまでに我々は、幹細胞の分化過程において新規型メチル基転移酵素である、Dnmt3bならびにDnmt3aが幹細胞特異的に発現されていることを明らかにした。本研究において、さらにこれらメチル基転移酵素のマウス成体組織における詳細な発現解析をしたところ、

新たに小腸の crypt 細胞や、大脳の脳室周辺で産生され嗅球へと移動する PSA-NCAM 陽性、NewN 陰性の未分化な介在神経細胞の集団 (RMS) の細胞ならびに嗅球内の顆粒細胞において Dnmt3a が強く発現されていることが判明した (Fig. 1)。本研究により Dnmt3a が成体組織においても神経細胞の分化過程で特異的に発現されることが明らかとなり、我々が提唱している、胚発生や生殖細胞の幹細胞の分化過程だけでなく、成体組織の幹細胞の分化過程においても Dnmt3b から Dnmt3a への切り替わりが必要とされているという新規型メチル基転移酵素の機能モデルを証明する結果となった (Fig. 3)。またこの結果は Dnmt3a が未分化な神経細胞のマーカーとなることを示しており、今後成体組織に存在する、まだ明らかにされていない新規の幹細胞の探索に有用となることが考えられる。

今回さらに、Dnmt3a および Dnmt3b と GFP の融合タンパク質を恒常的に発現する ES 細胞株を樹立した。これらの ES 細胞株では蛍光として観察される、それぞれ特徴的な核内での局在が、内在性の Dnmt3a ならびに Dnmt3b と同一であり、ES 細胞の分化過程における核内での挙動の変化をリアルタイムで解析することが可能となった (Fig. 2)。さらにこれら ES 細胞をマウス受精卵に導入することにより、この ES 細胞株由来のキメラマウスを現在までに数匹得る事に成功した。現在これらのマウスの交配により、この Dnmt と GFP の融合タンパク質を恒常的に発現する ES 細胞株由来のトランスジェニックマウスを作成中である。これらのマウスが得られれば、胚発生過程ならびに成体幹細胞をはじめ、すべての細胞での Dnmt3a ならびに Dnmt3b の細胞内での挙動がリアルタイムで解明されるものと考えられる。

今回の研究により、Dnmt3b や Dnmt3a による de novo methyltransferase の発現の調節が胚発生過程だけでなく、成体組織に存在する、分化の方向性が既に決定している幹細胞においても de novo methyltransferase による DNA の修飾がその後の各組織への細胞分化に必要とされることを示す結果となった。現在我々は Dnmt3b が自己増殖性の幹細胞からある程度分化の方向が決定された幹細胞へと分化する最初のステップとして必要とされるのに対し、Dnmt3a はある程度分化が進行した、未分化な前駆細胞において連続して発現することにより、Dnmt3b が行った個々の遺伝子のメチル化をさらに進行し、組織特異的な遺伝子の発現をより安定化または不可逆化しているというモデルを考えている (Fig. 3)。今後、初期胚や生殖細胞だけでなく、成体の幹細胞での de novo methyltransferase を発現する細胞の詳細な解析や

in vivo, in vitro での積極的な de novo methyltransferase の発現の制御実験を行うことにより DNA のメチル化に依存した幹細胞の分化機構が明らかになるものと考えられる。

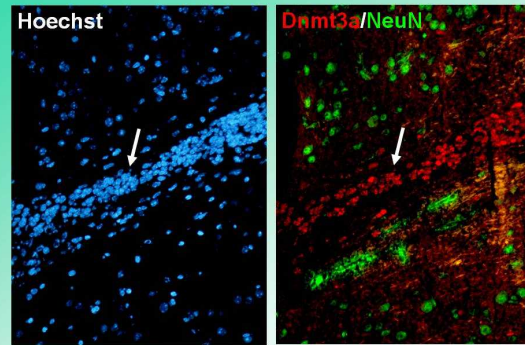


Fig.1 Rostral migratory stream (RMS)におけるDnmt3aの特異的な発現

Fig. 1

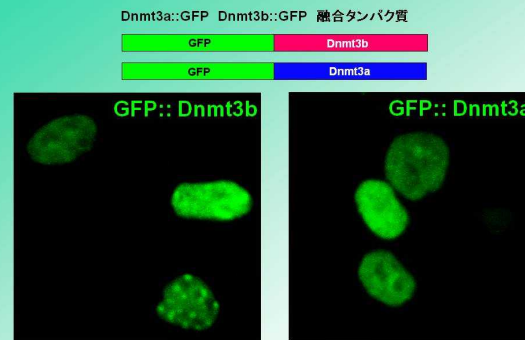


Fig.2 GFP::Dnmt3a, GFP::Dnmt3b 融合遺伝子のES細胞における発現

Fig. 2

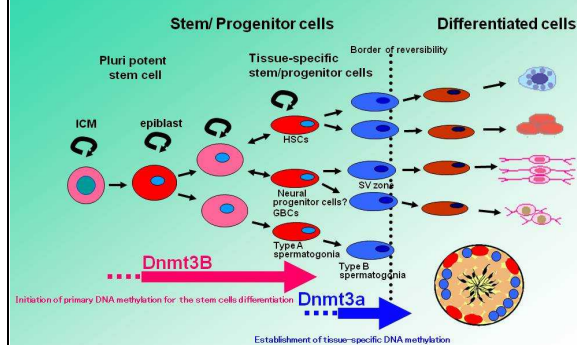


Fig.3 Models for de novo methyltransferases functions during stem cells differentiation

Fig. 3

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)

[学会発表](計 3件)

渡邊大介、non-coding RNA(Air) の ES 細胞分化における発現制御、日本分子生物学会、2008年12月9日~12日、兵庫県(神戸)

渡邊大介、マウス Igf2r 遺伝子のインプリンティングを制御する non-coding RNA(Air)のプロモーター活性の可視化、日本エピジェネティック研究会、2008年5月9日~10日、静岡県(三島)

渡邊大介、マウス幹細胞分化における de novo methyltransferase の局在と機能、日本分子生物学会、2007年12月11日~15日、神奈川県(横浜)

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 大介 (WATANABE DAISUKE)

北里大学・理学部・講師

研究者番号:00260175