

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20700363  
 研究課題名（和文） ヘテロクロマチンプロテイン 1 $\gamma$  変異マウスが不妊症を呈する分子メカニズムの解析  
 研究課題名（英文） Analyses of infertility of HP1 $\gamma$  mutant mice

研究代表者  
 成瀬 智恵（NARUSE CHIE）  
 金沢大学・学際科学実験センター・助教  
 研究者番号：30372486

研究成果の概要（和文）：我々が作製した HP1 $\gamma$  の変異マウスは雌雄ともに不妊であったので、その原因について研究を行った。その結果、減数分裂の開始時期にセントロメア近傍領域の集積が認められないこと、及び、野生型精原細胞において集積のみられるヒストンメチル化酵素が HP1 $\gamma$  変異マウスの精原細胞では集積できないことがわかり、これらのことから、HP1 $\gamma$  はセントロメア近傍におけるヒストン修飾因子のリクルートに必須であり、減数分裂の正常な進行にはセントロメアのヒストン修飾が必要であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We obtained HP1 gamma mutant mice and found that all homozygous mice were infertile as a result of defects in meiosis. Some kinds of histone methylation at pericentromeric heterochromatin were reduced in the mutant spermatocytes and spermatogonia. Moreover, a methyltransferase of H3K9 in spermatocytes could not accumulate in the mutant spermatocytes. These findings suggest that HP1 gamma is essential for recruitment of histone modification factors at pericentromeric heterochromatin and histone modifications are required for progression of meiosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：実験動物学、発生生物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：HP1、マウス、生殖細胞、ヒストン修飾、エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化やヒストンの修飾（メチル化、アセチル化、リン酸化など）という現象は以前から知られていたが、近年、これらの修飾によって転写因子または転写抑制因子

の結合能が変化することにより、遺伝子の発現様式が制御されることがわかってきた (Bioessays 22: 836-45, 2000; Science 293: 1074-80, 2001)。また、DNA のメチル化やヒストンの修飾が、生殖細胞の初期分化や減数

分裂の進行において重要であることが、KO マウスを用いた研究から明らかになってきた (Cell 107: 323-37, 2001; Nature 438: 374-8, 2005; EMBO J 26: 3346-59, 2007)。これらの KO マウスではヒストンメチル化の低下が観察されているが、生殖細胞の発生や分化が異常になる直接の原因は不明であった。

ヒストン H3K9 がヒストンメチル基転移酵素によってメチル化されると、HP1 が認識して結合する。HP1 には DNA メチル化酵素やヒストンメチル化酵素がリクルートされるので DNA やヒストンのメチル化が周辺部に広がる。HP1 にはメチル化 DNA 結合タンパク質や DNA メチル化酵素、ヒストンメチル化酵素などの因子も結合して転写制御領域のヘテロクロマチン状態を維持すると考えられている。しかし、KO マウスはまだ報告がなく、生体内での機能は明らかになっていなかった。

生殖細胞においては、HP1 $\gamma$  は HP1 ファミリー分子の中でも独自の機能を持つと考えられ、これまでに考えられてきた HP1 の機能とは違った新たな機能が明らかになる可能性がある。本研究により、PGC の初期分化の分子機構の一端を明らかにできれば、将来生殖医療や再生医療への応用が期待された。

## 2. 研究の目的

HP1 $\gamma$  変異生殖細胞が発生異常を示すステージは 2 段階あり、1 つは胎生 7.5 日 (E7.5) において始原生殖細胞 (PGC) が体細胞の中から出現する段階、もう 1 つは生殖細胞に分化した後の減数分裂期である。そこで本研究では、

(1) 生殖細胞の最初の分化段階における HP1 $\gamma$  の機能

(2) 減数分裂における HP1 $\gamma$  の機能

を明らかにすることで、ヒストン修飾が生殖細胞に及ぼす影響の一端を解明することを目的とした。

これまでに報告されているヒストン修飾酵素やリクルートされる因子の変異マウスは発生初期に致死となることが多いので、生殖細胞形成まで個体が生存可能である HP1 $\gamma$  変異マウスは生殖細胞の発生におけるヒストン修飾と遺伝子発現の制御の研究に適していると考えた。また、これまでに不妊症を呈すると報告されているエピジェネティック関連遺伝子の KO マウスは DNA メチル化酵素またはヒストンメチル化酵素の KO が多いが、最終的にそれらがどのような分子メカニズムで生殖細胞の発生に異常を引き起して不妊症が起きるのかはよくわかっていなかった。よって、DNA やヒストンのメチル化と、転写制御因子を仲介する HP1 $\gamma$  の役割を解析することで、ヒストン修飾による生殖細胞の発生制御機構の分子メカニズムを明らかに

しようと考えた。

## 3. 研究の方法

PGC が発生し増殖する E7.5-12.5、または精母細胞および卵母細胞が減数分裂を行う時期 (雄では生後 7 日、雌では E13.5) における HP1 $\gamma$  変異生殖細胞の遺伝子発現変化やヒストン修飾の変化を調べ、野生型の生殖細胞と比較することで HP1 $\gamma$  の機能を解析した。

### (1) E7.5 における HP1 $\gamma$ の機能解析

HP1 $\gamma$  変異 PGC の数は胎生 7.5 日 (E7.5) において既に半減しているが、Blimp1 や Prdm14 変異 PGC で見られたような遺伝子発現の異常は見つかっていない。よって、HP1 $\gamma$  変異 PGC に異常が起きる時期は E7.5 より前であると考えられる。そこで、まず E6.25-7.5 において初期の PGC のマーカーである Blimp1 の発現を指標に HP1 $\gamma$  変異 PGC の発生が異常になる時期を特定した。PGC の運命決定に異常があるかどうかを調べるため、運命決定に関与する可能性のある Bmp 受容体-Smad シグナル系などを調べた。また、運命決定後の遺伝子発現制御などに異常があると考えられたので、PGC 数の減少が見られた時期において PGC の single cell PCR や免疫染色を行い、発現パターンに異常がある遺伝子を明らかにした。また、ヒストンメチル化や DNA メチル化についても調べた。

### (2) 減数分裂における HP1 $\gamma$ の機能解析

HP1 $\gamma$  変異マウスの生殖細胞は、出現時より数が少ないだけでなく、減数分裂の進行に異常を呈し、精母細胞、卵母細胞ともにパキテン期直前に大部分が死滅する。これまでの我々の研究により、HP1 $\gamma$  変異マウスの精母細胞においては、主にヘテロクロマチンにあるヒストン H3K9 のトリメチル化 (H3K9me3) レベルは野生型のものとは変わらないが、主にユークロマチンにある H3K9me2 は免疫染色による染色性が約 1/2 に低下していることがわかった。また、第一減数分裂前期のプレレプトテンに留まっている細胞も多いことがわかったので、減数分裂の正常な進行には、H3K9me2 が高レベルでメチル化されていることや、HP1 $\gamma$  が存在することが必要であることが示唆された。しかし、H3K9me2 や HP1 $\gamma$  には、遺伝子発現調節や、染色体構造の維持などの機能があると考えられており、どちらが減数分裂の場面で重要なかはわからなかった。そこで、まず、H3K9me2 や HP1 $\gamma$  がどちらに必要なのかを調べた。次に、ヒストン修飾因子である Suv39h や G9a の変異マウスで HP1 $\gamma$  やヒストン修飾について免疫染色を用いて調べること、これらの因子が減数分裂にどのような役割を持っているかを遺伝学的に調べた。この研究は理研の古関先生らのグループとの共同

研究で行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) E7.5におけるHP1 $\gamma$ の機能解析

HP1 $\gamma$ ホモ変異マウスにおけるPGCの数を調べた結果、PGCの初期分化段階であるE7.5においてすでにPGCの減少が認められた。また、E6.5以降においてPGCを含む胚体組織全体でHP1 $\gamma$ の強い発現が認められたことから、PGCにおいてHP1 $\gamma$ が機能的役割を果たしていることが考えられた。PGCが減少する原因を検討した結果、分化の異常や細胞死の亢進は認められず、生殖隆起へ向けた移動も正常であった。そこでPGCの増殖に着目し、細胞周期に関する因子について免疫染色による検討を行ったところ、ホモ変異PGCの大半がKi67陽性であり、増殖の休止は認められなかった。しかしBrdUの取り込みを指標とした解析から、S期にいるPGCの減少が明らかとなり、フローサイトメトリーによる実験結果からもPGCがG1期に集積していることがわかった。このことから、HP1 $\gamma$ はPGCの細胞周期の進行に関与していると考えられた。

##### (2) 減数分裂におけるHP1 $\gamma$ の機能解析

発現アレキ解析の結果、野生型精母細胞とHP1 $\gamma$ 変異精母細胞の遺伝子発現プロファイルに大きな発現の違いは認められなかった。HP1 $\gamma$ は減数分裂期に遺伝子発現を制御するのではなく、染色体構造の維持などの機能を果たしていると考えられた。

HP1はトリメチルH3K9(H3K9me3)を介したH4K20のメチル化を亢進させることがin vitroの実験から示唆されていたので、H4K20me3を含むヒストン修飾の状態を免疫染色法によって調べた。また、他のHP1ファミリーやヒストン修飾因子の発現についても免疫染色法によって調べた。

減数分裂の進行を調べた結果、HP1 $\gamma$ 変異マウスの生殖細胞では雌雄ともにレプトテン期からサイゴテン期への移行に遅延が見られ、パキテン期の生殖細胞数が著しく減少していることがわかった。また、HP1 $\gamma$ 変異精母細胞でのヒストン修飾状態が変化していることがわかった(図1)。DNAのメチル化については免疫染色とbisulfite sequencingで調べた結果、野生型と変異細胞で差は見られなかった。

さらに、免疫染色で細胞におけるヒストンメチル化酵素の核内分布を調べたところ、H3K9メチル化酵素の一つがHP1 $\gamma$ 変異マウスの精母細胞では集積できないことから、HP1 $\gamma$ はヒストン修飾因子のリクルートに必須であることがわかった。HP1 $\alpha$ およびHP1 $\beta$ の発現パターンには違いが認められなかった。精母細胞における正常なヒストン修飾にはHP1 $\gamma$ が関与していることが明らかにな

った。

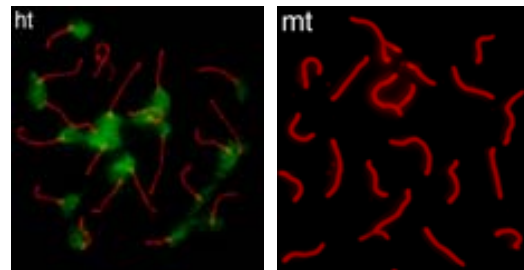


図1 抗H4K20me3(緑)、Scp3(赤)抗体を用いた免疫染色の結果(左:コントロール、右:HP1 $\gamma$ 変異精母細胞)。HP1 $\gamma$ 変異精母細胞ではセントロメア近傍へのH4K20me3の集積が消失していた。

#### 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4件)

1. Irie N., Takada Y., Watanabe Y., Matsuzaki Y., Naruse C., Asano M., Iwakura Y., Suda T. and Matsuo K. “Bidirectional signaling through ephrinA2-EphA2 enhances osteoclastogenesis and suppresses osteoblastogenesis.” *J. Biol. Chem.* 284: 14637-14644, 2009 査読有
2. Fukusumi Y., Naruse C. and Asano M. “Wtap is required for differentiation of endoderm and mesoderm in the mouse embryo.” *Developmental Dynamics* 237 618-629, 2008 査読有
3. Zhang G., Njauw C. N., Park J. M., Naruse C., Asano M. and Tsao H. “EphA2 is an essential mediator of UV radiation-induced apoptosis.” *Cancer Research* 68 1691-1696, 2008 査読有
4. Kaneda, T.\*, Naruse, C.\*, (\*は共同筆頭著者) Kawashima, A., Fujino, N., Oshima, T., Namura, M., Nunoda, S., Mori, S., Konno, T., Ino, H., Yamagishi, M. and Masahide Asano “A novel beta-myosin heavy chain gene mutation, p.Met531Arg, identified in isolated left ventricular noncompaction in humans, resulted in left ventricular hypertrophy that progressed to dilation in a mouse model.” *Clinical Science* (London) 114 431-440, 2008 査読有

[学会発表] (計 8 件)

1. 高田幸、古関明彦、成瀬智恵、浅野雅秀「ヒストン修飾を介した相同染色体ペアリングの制御機序」口頭発表、第 2 回公開シンポジウム 生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク、2009 年 11 月 27 日、コクヨホール (東京都)
2. 阿部可奈恵、成瀬智恵、齋藤通紀、浅野雅秀「始原生殖細胞の発生と分化における HP1 $\gamma$  の機能解析」ポスター発表、第 2 回公開シンポジウム 生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク、2009 年 11 月 26 日、コクヨホール (東京都)
3. 成瀬智恵、浅野雅秀「生殖細胞形成における HP1 $\gamma$  の機能解析」口頭発表およびポスター発表、特定領域研究生殖サイクル若手勉強会、2009 年 8 月 27 日、御殿場高原時之栖 (静岡県)
4. 阿部可奈恵、成瀬智恵、柿内太、浅野雅秀「始原生殖細胞の発生と分化における HP1 $\gamma$  の機能」ポスター発表、第 3 回日本エピジェネティクス研究会年会、2009 年 5 月 22 日、東京一ツ橋学術総合センター (東京都)
5. 阿部可奈恵、成瀬智恵、柿内太、浅野雅秀「始原生殖細胞の発生と分化における HP1 $\gamma$  の機能」ポスター発表、第 56 回日本実験動物学会総会、2009 年 5 月 14 日、大宮ソニックホール (埼玉県)
6. 成瀬智恵、高田幸、Yael Costa、阿部可奈恵、柿内太、James Turner、古関明彦、浅野雅秀「HP1 $\gamma$  は第一減数分裂期における精母細胞のヒストンメチル化に必須である」口頭発表およびポスター発表、第 56 回日本実験動物学会総会、2009 年 5 月 14 日、大宮ソニックホール (埼玉県)
7. 成瀬智恵、高田幸、Yael Costa、阿部可奈恵、柿内太、James Turner、古関明彦、浅野雅秀「減数分裂における HP1 $\gamma$  の機能解析」ポスター発表、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
8. 成瀬智恵、高田幸、Yael Costa、阿部可奈恵、柿内太、James Turner、古関明彦、浅野雅秀「減数分裂および PGC における HP1 $\gamma$  の機能」ポスター発表、第 2 回日本エピジェネティクス研究会年会、2008 年 5 月 9 日、東レ総合研修センター (静岡県)

[その他]

ホームページ等

<http://web.kanazawa-u.ac.jp/~med38/tglab/tganimHP/Top.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

成瀬 智恵 (NARUSE CHIE)

金沢大学・学際科学実験センター・助教

研究者番号：30372486

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし