

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23616006

研究課題名(和文) ヒストンH3K4脱メチル化酵素KDM1Bのゲノム刷込み機構における役割

研究課題名(英文) Role of histone H3K4 demethylase KDM1B for oocyte-specific imprinting in mice

研究代表者

尾畑 やよい(Oyata, Yayoi)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：70312907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、卵形成過程におけるKDM1Bの発現解析並びにDNAメチラーゼ(DNMTs)過剰発現下におけるZac1およびMestのインプリントの確立を解析した。

その結果、卵形成過程においてKDM1B mRNAは非成長期から高発現が認められたが、タンパク質の発現は成長期以降に認められることがわかった。また、DNMTs過剰発現下において、Zac1領域には高メチル化が誘導されたがMest領域には誘導されなかった。Zac1およびMestのインプリント確立にはDNMTsとKDM1Bが必須であることが知られてきたが、本研究からこれらの存在はインプリント確立の十分条件とならないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To understand the role of histone H3K4 demethylase KDM1B for oocyte-specific imprinting, expression of KDM1B during oocyte growth was analyzed and the establishment of methylation imprints in Zac1 and Mest loci were examined under conditions of DNA methyltransferases (DNMTs) overexpression. The results showed that KDM1B mRNA was expressed at a high level in oocytes from the non-growing stage but KDM1B protein was expressed from the growth stage onward. Excess of DNMTs induced early acquisition of DNA methylation imprints at Zac1 but not Mest in early-growing oocytes. Thus, we revealed that the presence of DNMTs and KDM1B is essential but not sufficient for establishment of oocyte-specific imprinting.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：エピジェネティクス

キーワード：ゲノム刷込み 生殖細胞

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに、インプリントの分子機構としては DNA のメチル化が知られてきていた。実際、インプリント遺伝子の DNA メチル化を解析してみると、卵子形成過程においては *Igf2r*、*Lit1*、*Zac1*、*Grb10*、*Snrpn*、*Mest* などのインプリント遺伝子が成長期卵母細胞で高メチル化されており、これらの遺伝子は精子形成過程ではメチル化されない。精子形成過程においては *H19-Igf2*、*Dlk1-Gtl2* および *Rasgrf1* が前精原細胞で高メチル化され、これらの遺伝子は卵子形成過程ではメチル化されない。また、DNA メチル基転移酵素 (DNMTs) 欠損マウスではゲノムインプリントの破綻が認められ、DNMT3A および DNMT3L は、卵子あるいは精子特異的な DNA のメチル化に不可欠であること、DNMT1 は、卵子および精子に由来する DNA メチル化を受胎後の胚で維持し、アレル特異的な遺伝子発現をもたらすために不可欠であることが示された。これらの事実から、DNA のメチル化はゲノムインプリントの一次的分子機構と考えられている。これに対し、インプリント機構におけるヒストン修飾の重要性も示唆され始めていた。特に、KDM1B によるヒストン H3 リジン 4 の脱メチル化は、卵母細胞におけるインプリント遺伝子 (解析した 7 遺伝子中 4 遺伝子、*Zac1*、*Grb10*、*Mest*、*Impact*) の DNA メチル化に必要なことが示された。そのため、DNA のメチル化とヒストン修飾のどちらがインプリントの一次的分子機構であるのかは、議論の余地が残されていた。一方、インプリント確立に不可欠な DNMT3A や DNMT3L が DNA に結合するためには、ヒストン H3K4 の脱メチル化が必要であるという報告がある。そこで、本来、精子形成過程で発現していない KDM1B を内在性の DNMT3A や DNMT3L の発現している前精原細胞で発現させることによって、XY 生殖細胞に卵子型インプリントが付与されれば、KDM1B は卵子形成過程でインプリントされる遺伝子領域をターゲットにヒストン H3K4 の脱メチル化を行っていること、そしてインプリントの一次的な分子機構であることが証明される。逆に、KDM1B を発現させた雄性生殖細胞で卵子型インプリントが行われなければ、KDM1B 以外に生殖細胞に卵子型インプリントをコミットさせる要因が存在することになり、新たなエピジェネティック因子の存在が示唆される。

## 2. 研究の目的

哺乳類の生殖細胞が精子あるいは卵子特異的インプリントを獲得することは、正常な胚発生に不可欠といえる。しかし、生殖細胞でインプリントが生じるメカニズムは全く明らかにされていない。本研究では、卵子型インプリントにのみ寄与することが報告されたヒストン H3 リジン 4 脱メチル化酵素 KDM1B について、これを精子形成過程で発

現誘導することにより、性特異的インプリントにどのような影響を及ぼすのか、その役割を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では (1) 生殖細胞形成過程における KDM1B を同定する、(2) (1) の結果明らかにされた KDM1B をクローニングし、コンディショナル TG マウスを作製する、(3) コンディショナル TG マウス (胎仔) の雄性生殖細胞において刷込み遺伝子の DNA メチル化を解析する、そして (4) 雄性生殖細胞において発現誘導された KDM1B がヒストン H3K4 の脱メチル化に寄与しているのか否かを解析することによって、性特異的ゲノム刷込みにおける KDM1B の役割を解明する。

## 4. 研究成果

(1) 生殖細胞形成過程における KDM1B の発現解析

Ensemble により解析したところ KDM1B mRNA には 6 種のバリエーションが存在し、そのうちタンパク質をコードしているのは 4 種類、さらに、ヒストンの脱メチル化活性に重要な領域を含むものは 3 種存在した。そこで、これら 3 種の発現を卵母細胞形成過程で解析したところ、Kdm1b-001 (Transcription ID: ENSMUST00000037025) mRNA が、非成長期およびフルサイズの卵母細胞で高発現していた。一方、タンパク質の発現解析の結果、非成長期卵母細胞のみが含まれる新生仔マウスの卵巣では発現が認められず、成長期以降の卵母細胞でのみ発現が認められた。また、Kdm1b-001 mRNA はインプリントが確立する時期の雄性生殖細胞においても高発現していた。このことから、KDM1B は転写後調節でその発現が制御されているものと考えられた。

(2) KDM1B コンディショナル TG マウスの作製

転写・翻訳後調節の一般的な機構としては、3'UTR を標的とした small RNA によるもの、あるいはユビキチン化を介したプロテオソーム系によるものなどが考えられる。そこで、KDM1B のタンパク質発現は前者の機構により制御されていると仮定し、Kdm1b-001 のコーディング領域のみの cDNA をクローニングし、生殖細胞でのみ KDM1B が発現するようにデザインしたベクターをマウス受精卵の前核に注入した。総計 9 ラインの TG マウスの作製に成功し、そのうち mRNA の発現レベルの高かった 3 ラインについてさらにタンパク質の発現解析を実施したが、いずれのラインも新生仔雌マウスの卵巣では、野生型と同様に、KDM1B タンパク質の発現は認められなかった。

本研究の TG ベクターは KDM1B の下流に 2A 配列を介して mCherry が連結されており、TG 新生仔の卵巣では mCherry の発現が検出

された。そのため、Kdm1b-001 と mCherry の mRNA は 1 本の RNA として合成された後に、KDM1B のみが分解されたものと考えられ、その機構には 3'UTR 以外の KDM1B 領域が関与していることがわかった。

これらのことから、KDM1B の発現制御機構が解明されない限り、外来性 KDM1B の発現誘導によりインプリント確立機構を解析することは困難と考えた。

( 3 ) KDM1B のインプリント機構における役割

( 1 ) および ( 2 ) の研究結果をふまえ、内在性の KDM1B に着目して解析することにした。

これまでの申請者らの別の研究で DNMTs を生殖細胞で過剰に発現する TG マウスが既に作製されていた。そこで、この TG マウスを利用し、KDM1B 依存的にメチル化インプリントを確立する *Zac1* および *Mest* のメチル化解析を実施することにした。内在性 DNMTs の発現が極めて低い成長初期卵母細胞で外来性の DNMTs を過剰発現させたところ、野生型マウスの成長期卵母細胞では、*Zac1* および *Mest* のメチル化レベルはいずれも 30%未満と低かったが、TG マウスの成長初期卵母細胞の *Zac1* 領域におけるメチル化レベルは 90%以上と非常に高かった。これに対し、TG マウスの成長初期卵母細胞の *Mest* 領域におけるメチル化レベルは、依然として 30%未満と低かった。

以上の結果から、DNMTs が卵母細胞ゲノムのインプリント領域にアクセスする為の分子機構として、KDM1B によるヒストン H3K4 の脱メチル化は必須であるが、少なくとも *Mest* 領域については KDM1B 以外の分子機構を必要とすること、そして、DNMTs と KDM1B の存在は卵子型インプリント確立の十分条件とならないことが明らかとなった。今後は、KDM1B の発現制御機構を解明することにより、性特異的インプリント機構における KDM1B の役割を明らかにしたい。

## 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 )

Long exposure to mature ooplasm can alter DNA methylation at imprinted loci in non-growing oocytes but not in prospermatogonia.

Obata Y, Wakai T, Hara S, Kono T. *Reproduction*. 2014; 147: H1-6. 査読有

Forced expression of DNA methyltransferases during oocyte growth accelerates the establishment of methylation imprints but not functional genomic imprinting.

Hara S, Takano T, Fujikawa T, Yamada M, Wakai T, Kono T, Obata Y. *Hum Mol Genet*. 2014 Mar 18. [Epub ahead of print]. 査読有

Establishment of a Conditional Transgenic System Using the 2A Peptide in the Female Mouse Germline.

Hara S, Takano T, Ogata M, Yamakami R, Sato Y, Kono T, Obata Y. *J Reprod Dev*. 2014 Mar 15. [Epub ahead of print]. 査読有

The presence of the Y-chromosome, not the absence of the second X-chromosome, alters the mRNA levels stored in the fully grown XY mouse oocyte.

Xu B, Obata Y, Cao F, Taketo T. *PLoS One*. 2012; 7: e40481. 査読有

Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks.

Kobayashi H, Sakurai T, Imai M, Takahashi N, Fukuda A, Obata Y, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Sotomaru Y, Suzuki Y, Kono T. *PLoS Genet*. 2012; 8: e1002440. 査読有

Study on the mechanism of maternal imprinting during oocyte growth.

Obata Y. *J Reprod Dev*. 2011; 57: 1-8. 査読有

Epigenetically immature oocytes lead to loss of imprinting during embryogenesis.

Obata Y, Hiura H, Fukuda A, Komiyama J, Hatada I, Kono T. *J Reprod Dev*. 2011; 57: 327-34. 査読有

[ 学会発表 ] ( 計 10 件 )

マウス卵母細胞におけるゲノム刷込みの分子機構

原聡史、河野友宏、尾畑やよい

第 36 回日本分子生物学会 ( 2013 年 12 月 3 日 ~ 6 日、神戸 )

マウス卵母細胞におけるゲノム刷込みの分子機構

原聡史、川原玲香、尾畑やよい、河野友宏

第 106 回日本繁殖生物学会 ( 2013 年 9 月 12 日 ~ 14 日、東京 )

卵子形成過程におけるエピジェネティクス

尾畑やよい

第 31 回日本受精・着床学会 < 招待講演 > ( 2013 年 8 月 8 日 ~ 9 日、別府 )

Mechanisms for oocyte-specific methylation imprints

Hara S, Kono T, Obata Y.

Society for the study of Reproduction 47<sup>th</sup> Annual Meeting ( 2013 年 7 月 22 日 ~ 26 日、モントリオール )

Mechanisms for oocyte-specific methylation imprints in mice

Obata Y.

46<sup>th</sup> Annual Meeting for Japanese Society of Developmental Biologists <招待講演> (2013年5月28日~31日、松江)

マウス胚発生過程における DNMT3A および DNMT3L の発現がインプリント遺伝子のメチル化および個体発生に及ぼす影響

山上玲奈、小肩実央、原聡史、尾畑やよい、河野友宏

第54回日本哺乳動物卵子学会(2013年5月25日~26日、東京)

マウスにおける新規父方特異的メチル化DNA領域の探査

坂下陽彦、小林久人、尾畑やよい、小川英彦、河野友宏

第53回日本哺乳動物卵子学会(2012年5月26日~27日、千里)

Dnmt3a2/Dnmt3L 過剰発現マウス卵母細胞におけるインプリント遺伝子メチル化解析

原聡史、松本貴重、尾畑やよい、河野友宏

第53回日本哺乳動物卵子学会(2012年5月26日~27日、千里)

DNMT3A2/DNMT3L の異所的発現がマウスインプリント遺伝子に及ぼす影響

原聡史、高野喬、尾畑やよい、河野友宏

第34回日本分子生物学会(2011年12月13日~16日、横浜)

DNMT3A2/DNMT3L の異所的発現がマウスインプリント遺伝子に及ぼす影響

原聡史、小肩実央、尾畑やよい、河野友宏

第104回日本繁殖生物学会(2011年9月15日~17日、盛岡)

〔図書〕(計 2 件)

哺乳動物の発生工学(発生学とエピジェネティクス)の項)2014

尾畑やよい

朝倉書店

ISBN: 978-4-254-45029-3

繁殖生物学(「遺伝的性」の項)2013

尾畑やよい

インターズー

ISBN: 978-4-89995-788-1

〔その他〕

ホームページ等

<http://nodai-konolab.net/theme>

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

尾畑やよい

研究者番号 : 70312907