

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651194

研究課題名（和文） 器官形成に果たす DNA メチル化酵素の発現抑制の意義

研究課題名（英文） Biological significance of developmental gene silencing of *Dnmt3b*.

研究代表者

青田（浦）聖恵（AOTA(URA)KIYOE）

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80289363

研究成果の概要（和文）： DNA のメチル化は、哺乳類では発生段階や癌化に伴って、その状態は変化することから、発生・分化や疾病との関連で長年注目されてきた生命現象であるが、未だにゲノム DNA の特定の領域をメチル化する制御機構と、また第二に発生・分化との具体的な繋がりとは不明である。私達は“哺乳類の DNA メチル化酵素 *Dnmt3b* の発現抑制が、正常な器官形成やその機能維持に重要である”と考え、この仮説を心臓形成過程で Cre 組み換え蛋白質遺伝子の作用によって *Dnmt3b* 遺伝子発現が誘導されるトランスジェニックマウスの解析によって実証することを目指した。

Dnmt3b 遺伝子の組織特異的な過剰発現を誘導されるトランスジェニックマウスを Cre/lox システムで作成した。このトランスジェニックマウスを用いて、造血幹細胞の *ex vivo* 分化培養と心臓形成の主要転写因子である *Nkx2-5* 遺伝子座に Cre 組み換え遺伝子を挿入したノックインマウス *Nkx2-5/Cre* マウスとの交配を実施して、胎仔期から心臓特異的に *Dnmt3b* を過剰発現するマウスの作成を試みた。その結果、造血幹細胞の分化・増殖異常を示し、また心臓での発現は *Dnmt3b* を過剰に発現するマウスが 1 匹得られたが、体型が小さく虚弱であった。この結果から、予想したように、DNA メチル化酵素の過剰発現が正常な発生・分化を乱している事が示唆される。

研究成果の概要（英文）： Methylation of cytosine C5 of CpG dinucleotides is a characteristic DNA modification in many eukaryotic genomes that plays an important role in developmental gene regulation. DNA methylation is mediated by *Dnmt1*, *Dnmt3a*, and *Dnmt3b*, however, it is not known how each Dnmt selects target CpG sites in the genome and control gene silencing during development. Since *Dnmt3b* expresses specifically in ES cells and undifferentiated hematopoietic cells and repressed differentiated cells, we hypothesized that “developmental silencing of *Dnmt3* is important for normal organogenesis”. To address this issue, we established *Dnmt3b*-conditional transgenic mice *Tg-loxDnmt3b* using Cre/lox system. Over expression of *Dnmt3b* repress cell proliferation and differentiation in *ex vivo* culture of hematopoietic stem cells. Furthermore, *Tg-loxDnmt3b*, *Nkx2-5/Cre* double mutant mice exhibited growth retardation. These results show that abnormal expression of *Dnmt* accelerate out of control of developmental gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：クロマチン, DNA メチル化, *Dnmt3b*

1. 研究開始当初の背景

真核生物の DNA のメチル化は、シトシン

の5位の炭素にメチル基が付加した DNA 修飾であり、ヒトを含めた高等動物や植物では、転写抑制に機能することが知られている。哺乳類では発生段階や癌化に伴って、DNA メチル化状態は変化することから、発生・分化や疾病との関連で長年注目されてきた生命現象であり、特に近年、塩基配列によらず受け継がれる遺伝情報“エピゲノム情報”の分子基盤の一つとして、その制御機構が世界で活発に研究されている。しかし未だに DNA メチル化に関しては、まず第一にゲノム DNA の特定の領域をメチル化する制御機構と、また第二に発生・分化との具体的な繋がりとは不明である。

哺乳類にはこれまでに活性が確認された DNA メチル化酵素遺伝子として、*Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b* の3つの遺伝子が同定され、いずれの遺伝子もマウスの正常な発生に必須の遺伝子である。中でも *Dnmt3b* 遺伝子は、増殖している様々な細胞で広く発現する他の *Dnmt1* や *Dnmt3a* 遺伝子と大きく異なり、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) や初期胚、そして成体のごく限られた細胞でのみ発現する特徴に、申請者は着目した。そしてこれまでに、ES 細胞および精製ヒストンで再構成したクロマチン系を用いた生化学的な解析から、*Dnmt3b* タンパク質が脱アセチル化して凝集したクロマチンに *Dnmt3a* よりも安定に結合する特性を見出した。また様々な造血細胞で、各種の *Dnmt* 遺伝子発現を調べ、細胞分化に伴って、*Dnmt3b* 遺伝子発現が抑制されて、DNA メチル化状態が低下する現象を見出した (図1)。これらの独自の結果から、申請者は、“*Dnmt3b* は、凝集したクロマチンに広く結合する能力を有しているために、組織特異的な遺伝子の非特異的な抑制を導く危険な因子であり、正常な器官形成

およびその維持には、*Dnmt3b* 遺伝子を抑制することが極めて重要である”との仮説に至った。

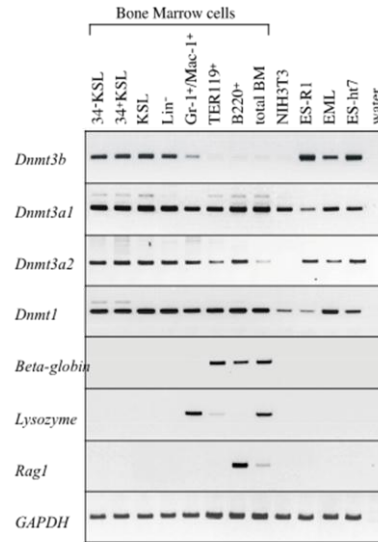


図1. *Dnmt3b*は未分化な造血幹細胞やES細胞特異的に発現する。

2. 研究の目的

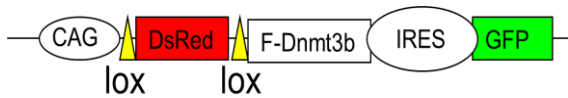
この仮説を検証するために、本研究では独自 *Cre* 組み換え蛋白質遺伝子の作用によって *Dnmt3b* 遺伝子を過剰発現できるトランスジェニックマウスを作成し、器官形成として、造血過程および心臓形成過程で、恒常的な *Dnmt3b* 発現が器官形成に及ぼす影響を明らかにする。DNA メチル化酵素の過剰な発現が、造血系や心臓ゲノムのどの領域で異常な DNA のメチル化を誘導するのか、また転写レベルでの影響をゲノムワイドに解析し、転写制御と DNA メチル化の関係を明らかにすることを将来的に目指す。

これまで *Dnmt* 心臓では、ヒストン修飾やクロマチンリモデリング因子と転写因子の協調作用は個体レベルで示されて来た。しかし DNA のメチル化と心臓形成の関わりは一切不明である。*Dnmt3b* の異常な発現誘導マウスの解析を通して、2つの異なる組織で *Dnmt3b* の発現抑制が果たす意義が明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(I) Dnmt3b を過剰発現するコンディショナル Dnmt3b 発現マウスの作成

Dnmt3bは分化した血球細胞や成体の心臓では発現が見られない。恒常的にマウスで遺伝子を発現させるCAGプロモーター下流に、遺伝子組み換えアダプター lox で挟んだ赤色蛍光色素遺伝子(DsRed)、その下流にFlagタグ付きDnmt3b遺伝子と緑色蛍光色素遺伝子(GFP)をIRES(mRNA内部のリボソーム結合サイト)を挟んで繋いだ条件的に発現する遺伝子を組み込む(下図)。



遺伝子がゲノムの活性領域に挿入されると細胞がDsRedの発現によって蛍光下で赤く光って確認されるが、この状態ではDnmt3b遺伝子を過剰発現していない。Cre組み換え蛋白質遺伝子を発現させると、Cre/ lox 組み換えによって、RFP遺伝子が脱落し、Dnmt3b遺伝子がGFP遺伝子とともに発現して細胞が緑色に変化する。この蛍光の変化から、Dnmt3bを恒常的に発現が確認できる。一般に市販のRFP遺伝子では遺伝子挿入マウスが得られなかったが、RFP遺伝子を核移行シグナルを融合したDsRed遺伝子に置換することによって、毒性を抑えて赤くは全身を発色したトランスジェニックマウス個体が複数種類得られた。その中で全身で安定して遺伝子を発現するマウスライン*Tg-loxDnmt3b*を選別するところから始める。

(II) 骨髄造血幹細胞におけるDnmt3b過剰発現

トランスジェニックマウスの骨髄細胞から、FACSソートによって造血幹細胞(KSL)を回収する。その細胞にレトロウイ

ルスを用いて遺伝子組み換えCre遺伝子を発現誘導し、造血細胞分化に関わらず、恒常的にDnmt3bを過剰発現させ、造血細胞増殖及び分化をコロニーアッセイで検討する。

(III) 心形成過程におけるDnmt3bの過剰発現

作成したトランスジェニックマウスに心臓形成の要となる転写因子Nkx2-5遺伝子座にCre組み換え遺伝子を挿入したノックインマウス*Nkx2-5/Cre*マウス(*Genesis*, 2001, Dr.Robert Schwartzより供与)と交配し、Dnmt3bのNkx2-5発現細胞での過剰発現が、心臓形成および個体発生に及ぼす影響を調べる。

心臓形成異常を詳細に調べ、遺伝子の発現変動とDNAメチル化異常を追求し、核内でのDNAメチル化抑制の機構と意義を検討する。

4. 研究成果

(I) Dnmt3b を過剰発現するコンディショナル Dnmt3b 発現マウスの作成

複数のトランスジェニックマウスを作成し、中でも世代を超えて安定に挿入RFP遺伝子を全身で発現するマウスを得た。まず、受精とともにDnmt3bを過剰発現するCAG-Creマウスと交配したところ、Dnmt3bを恒常的に過剰発現する個体は得られなかった。従って、全身でのDnmt3bの過剰発現は、正常な個体発生を維持できないと、考えられる。

(II) 造血幹細胞での Dnmt3b の過剰発現による、細胞増殖異常。

トランスジェニックマウス*Tg-loxDnmt3b*成体の骨髄からFACSソートで造血幹細胞(KSL)を単離し、Cre遺伝子をレトロウイルスで導入して組み換え反応を誘導した。その結果、造血幹細胞に異常は認められなかったが、寒天培地でコロニー形成させたところ、増殖が著しく抑制され、分化異常も見られた(図2)。この結果は、Dnmt3bが抑制されるべき組織で、正しく抑制されずに恒常的に発現すると分化異常を導くことを示している。

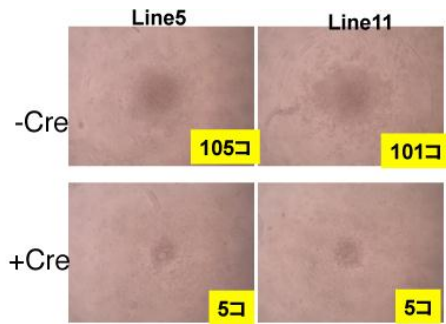


図2. Dnmt3b過剰発現による造血コロニー形成阻害

(III) 心臓形成過程での Dnmt3b の過剰発現。

Nkx2-5 遺伝子座に Cre 遺伝子を挿入したマウスとトランスジェニックマウス *Tg-loxDnmt3b* との交配によって、心臓形成過程で Dnmt3b が過剰発現するマウスの作成を試みた。ダブルポジティブの成体マウスが生まれたが、心臓における Dnmt3b の過剰発現が明確には確認されず、タンパクの分解が見られた。

過剰発現した Dnmt3b が分解しているのかもしれない。Nkx2-5 は胎児期に発現が誘導されるので、今後、胎児での解析を進めなければならない。

(IV) 精子形成過程における Dnmt3b の過剰発現による精子形成異常

Dnmt3b は精巣の幹細胞活性を失った前駆細胞で発現しはじめる。そこで Neurogenin 3-Cre マウスを用いて Dnmt3b を精巣の幹細胞において発現させ細胞運命決定過程の変化を観察したところ、幹細胞において前駆細胞特異的マーカーで分化に必須な c-Kit を発現することがわかり、少なくとも前駆細胞型の遺伝子発現プログラムの一部は Dnmt3b により誘導されたと考えられる結果が得られた (横浜市立大学、大保和之博士との共同研究)。

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 2 件)

1. Andrea H., Yinghua G., Anbazhagan R., Kiyoe U., Gunnar S., Anyong X., Jagesh S. and Ralph S. Impact of histone H4 lysine 20 methylation on 53BP1 responses to chromosomal double strand breaks, PLoS ONE, 7, e49211, 2012

2. Kashiwagi K., Nimura K., *Ura K. and *Kaneda Y. (2011) DNA methyltransferase 3b preferentially associates with condensed chromatin. Nucleic Acids Res., 39, 874-888.

[学会発表] (計 7 件)

[その他]

ホームページ等

www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gts/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青田 (浦) 聖恵 (AOTA (URA) KIYOE)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号 : 80289363