

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460367

研究課題名(和文) 始原生殖細胞のエピジェネティックリプログラミングに関与する新規遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Investigating the role of an unknown gene in germ cell epigenetic reprogramming

研究代表者

田代 文 (TASHIRO, Fumi)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40136213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Zfp296(申請時の名称：Ces1)は幹細胞の多能性維持や悪性腫瘍の進展に影響するとされてきたが、それらのメカニズムは不明である。そこで、ノックアウト(KO)マウスを作製したところ、Zfp296 KOマウスは胎仔成長や生殖細胞の分化に異常をきたした。また、Zfp296は、細胞核のヘテロクロマチンに局在し、複数のエピジェネティック制御因子と相互作用することがわかった。さらに、Zfp296 KOマウスでは、ヘテロクロマチンのサテライトDNA領域で特異的に、H3K9メチル化レベルが上昇していた。以上から、Zfp296がヘテロクロマチン構成因子としてH3K9メチル化を抑制すると結論された。

研究成果の概要(英文)：Zfp296 has been implicated in stem cell pluripotency and tumor pathogenesis. However, its mechanisms remain elusive. Here, we demonstrated that a Zfp296 deficiency in mice impairs germ-cell development and embryonic growth. Zfp296 was intracellularly localized to heterochromatin in embryos. In addition, we showed that Zfp296 interacts with epigenetic regulator proteins in vitro. We observed that the H3K9 methylation levels in Zfp296^{-/-} embryonic cells increase and that Zfp296 deficiency affects the H3K9me3 levels at major satellite repeats. Our results demonstrate that Zfp296 is a component of constitutive heterochromatin that affects embryonic development by negatively regulating H3K9 methylation.

研究分野：分子生物学、発生生物学

キーワード：ノックアウトマウス 胎仔発生 生殖細胞 エピジェネティック制御 ヒストンメチル化 ヘテロクロマチン

1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノムのエピジェネティック制御はDNAの塩基配列の変化を伴わず DNAのメチル化やヒストンタンパク質の修飾などクロマチンの化学修飾を介して遺伝子発現を変化させる。この制御は、胚発生における細胞分化や、分化した細胞の恒常性維持、トランスポゾンの発現抑制、iPS細胞の作製に必須の体細胞核のリプログラミングなど、様々な生命現象において重要な役割を果たす。また、この破綻は、老化、加齢性疾患やがんの発症にも関係する。

(2) 染色体のペリセントロメア領域は、サテライトDNAと呼ばれる反復配列を主体とし、構成的ヘテロクロマチンに凝縮している。ヒストンH3K9メチル化は、ヘテロクロマチンに特徴的なエピジェネティック修飾であり、他のヒストン修飾の上流に位置する。

2. 研究の目的

C2H2型Znフィンガー(C2H2-ZF)タンパク質のZfp296は、もともと白血病モデルマウスにおいて癌遺伝子の候補として発見され¹、白血病や脳腫瘍、前立腺癌の発症・進行に関係があるとされてきた。また、Zfp296は、ES細胞やiPS細胞で高く発現し、分化が進むにつれて発現が失われていくという特徴が知られ、山中因子と共にZfp296を発現させることでiPS化を促進するという報告もあり²、幹細胞の多能性維持に関係していると考えられてきた。しかし、これらのメカニズムは不明である。そこで、生体内におけるZfp296の役割を明らかにするため、Zfp296 KOマウスを作製し、その表現型の解析を進めた。

3. 研究の方法

(1) Zfp296には5個のC2H2-ZFドメインがあり、その全てが第3エクソンにコードされている。そこで、第3エクソンに対する改変コンス

トラクトを設計し、相同組換えによるノックイン法によって導入し、Zfp296遺伝子のC2H2型Znフィンガードメインを全て欠損させたKOマウスを作出した。

(2) Zfp296 KOマウスの表現型を、ウエスタンブロット解析や免疫蛍光抗体法、フローサイトメトリー解析、組織学的解析、アルカリホスファターゼ染色法、ホールマウントin situハイブリダイゼーション法、定量的RT-PCR法、クロマチン免疫沈降法などの分子生物学的な実験方法によって検討した。

4. 研究成果

(1) Zfp296 KOマウスは、外貌に異常はなく健康的であり、出生時の体重も対照群と同様であった。また、造血機能や神経発生の異常を示唆する徴候は認められず、悪性腫瘍の発生率や平均寿命も対照群と同様であった。Zfp296は生殖系組織に発現しているとの報告があり、最初に、Zfp296 KOマウスの妊性を交配試験によって検討した。Zfp296 KOマウス同士の交配では産仔は得られず不妊であったが、Zfp296 KOと野生型との交配では70-80%は不妊であったものの一部で産仔が得られた。しかし、妊性のあるZfp296 KOマウスについても、月齢が増すにつれて不妊傾向を示した。そこで生殖器官に注目したところ、興味深いことに、成体のZfp296 KOマウスは、精巣・卵巣が明らかに小さいことがわかった。そして、Zfp296 KOマウスの精巣では、生殖細胞系列を欠く変性した精細管が多くを占めることが組織学的解析によって確認され、それに伴い成熟精子数も減少していた。同様に、卵巣では原始卵胞から成熟卵胞まであらゆる発達段階で卵胞数が減少していた。一方、成体とは対照的に、胎齢17.5日(E17.5)では、Zfp296 KOマウスの胎仔生殖腺の大きさは、対照群と同等であった。しかし、組織学的解析の結果、Zfp296 KOマウスの胎仔生殖腺では雌雄とも

に生殖細胞数が減少していることを確認した。以上から、生後のZfp296 KOマウスで認められた変性・萎縮した精巣や卵巣は、胎生期における生殖細胞の減少に起因することが示された。

(2) E8.5からE10.5までのZfp296 KOマウスにおける解析により、Zfp296はPGCの初期の分化や体内移行に影響しないことが示されたが、E11.5のZfp296 KOマウスの生殖隆起におけるPGCの数を、免疫染色によって検討したところ、有意に減少していた。この減少は、更なる解析によって、アポトーシスの亢進ではなく細胞増殖の低下が関係していることがわかった。E12.5のPGCは、生殖隆起内で生殖細胞特異的なタンパク質を発現するようになることが知られている。そこで、E12.5のZfp296 KOマウスのPGCにおいて、分化マーカーの発現を免疫染色によって陽性細胞率を解析した結果、NanogとMVH、Kitの発現がいずれも対照群と比べて低下し、PGCの分化異常が示唆された。しかし、E13.5になるとこれらの発現が部分的に復帰していることが同様の解析によって確認され、Zfp296 KOによるPGCの分化異常は胎齢が進むにつれて代償され得るもので、発生段階の時期依存的な表現型であることが示された。

(3) 我々は、Zfp296 KOマウスの生殖細胞の発生についての解析を進めている途中で、E9.5からE14.5のZfp296 KOマウスの一部に、胎性致死が認められることを見出した。そこで、Zfp296ヘテロKOマウス同士の交配による産仔の遺伝子型分離比を解析したところ、E12.5以降のZfp296 KOマウスの占める割合がメンデルの法則よりも有意に低下していることを確認した。また、E9.75からE12.5のZfp296 KOマウスの中に、成長遅延している個体が見られることもわかった。次に、E8.5からE10.5のZfp296の発現変化を全胎仔を用いてウエスタンブロット解析によって検討し

たところ、Zfp296はE9.75から発現が高まることわかった。この結果は、Zfp296のmRNA発現について全胎仔のin situハイブリダイゼーション法で検討した結果と整合していた。また、同時にE9.75の胎仔ではZfp296が全身的に発現していることも確認した。さらに、E9.75の胎仔組織におけるZfp296の細胞内局在を免疫染色によって検討したところ、Zfp296は細胞核のヘテロクロマチンに局在することを確認した。

(4) Zfp296の類縁遺伝子のBcl11b/Ctip2はクロマチン制御因子の複合体と直接、結合してヘテロクロマチンの形成を促進するとの報告を踏まえ、我々は、Zfp296も同様にヘテロクロマチンの構成因子と何らかの相互作用をもつのではないかという仮説を立てた。そこで、GST-Zfp296融合タンパク質とES細胞核抽出液とを用いてGSTプルダウン実験を行い、質量分析ショットガン解析(LC-MS/MS)によってZfp296結合タンパク質の網羅的な同定を試みた。その結果として235個のZfp296結合タンパク質を検出し、その中にはヘテロクロマチン構成因子(HP1やDnmt1、Dnmt3b、Atrxなど)やクロマチン制御に関わるNuRD複合体のタンパク質(Mbd3やMta1、Mta2など)が含まれていた。H3K9メチル化はヘテロクロマチン形成やそれに伴う遺伝子発現の抑制に重要であり、特にSuv39hによって触媒されるH3K9me3はヘテロクロマチンの目印として知られている。そこで、Zfp296のH3K9メチル化へ及ぼす影響を評価するため、Zfp296やSuv39h1あるいは両者をHEK293T細胞に誘導し、H3K9メチル化レベルを定量的ウエスタンブロット解析で検討した。興味深いことにSuv39h1とZfp296とを共発現させることで、Suv39h1によるH3K9メチル化が抑制されることがわかった。

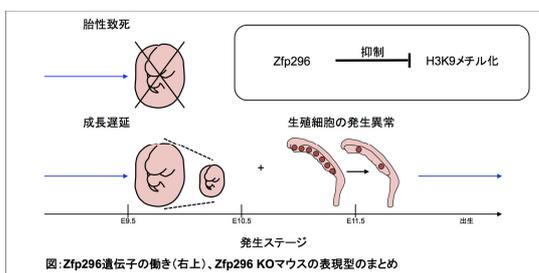
(5) Zfp296による胎仔発生の過程におけるH3K9メチル化への影響を明確にするため、

E9.75のZfp296 KOマウスのH3K9メチル化レベルを全胎仔の定量的ウエスタンブロット解析によって検討した。その結果、H3K9me2とH3K9me3が増加していることがわかった。この結果をE9.75のZfp296 KOマウスにおいて免疫染色でも検討したところ、H3K9me3は全身的に増加し同様であったが、新たに、H3K9me2はPGCで顕著に増加していることを確認した。この結果から、Zfp296 KOによって生殖細胞の発生過程におけるエピジェネティック制御に異常をきたしていることが示された。さらに、E9.75のZfp296 KOマウスのH3K9メチル化の増加の原因を明らかにするため、Zfp296は転写因子であるというこれまでの報告を踏まえ、H3K9メチル化に関する幾つかの中心的な遺伝子の発現レベルを定量的RT-PCR法によって検討した。その結果、いずれも相対的に小さな変化（1/2から2倍以内）であった。以上から、胎仔発生におけるZfp296によるH3K9メチル化の抑制は、H3K9修飾酵素の直接的な転写抑制以外のメカニズムによって制御されていることが示唆された。ヘテロクロマチンは、サテライトやトランスポゾンなどのリピート配列を主体とする集合体であり、そのH3K9メチル化レベルが高いことが知られている。そこで、Zfp296によるリピート配列のH3K9メチル化に対する影響を、E9.75のZfp296 KOマウスの細胞抽出液について抗H3K9me3抗体を用いてクロマチン免疫沈降（ChIP）を行い、定量的RT-PCR法によって検討した。その結果としてZfp296 KOマウスでは、メジャーサテライトとL1プロモーター領域のH3K9メチル化レベルが高いことがわかった。

（6）近年、様々な胎仔細胞や組織を用いた全ゲノム解析によって、クロマチン修飾の状態が胎仔発生の過程で時間的に制御されていることが明らかになってきた。Zfp296 KOマウスの胎仔細胞ではヘテロクロマチンにおける

H3K9およびDNAメチル化が亢進していたが、E13.5以降ではこの表現型は認められなかった。そして、Zfp296 KOマウスの胎仔にみられた表現型は、Zfp296の発現と時間的にも空間的にも一致していた。つまり、Zfp296は胎仔発生においてH3K9メチル化の一時的な抑制因子として働くことがわかった。PGCのエピジェネティックリプログラミングではH3K9およびDNAメチル化レベルがゲノム広範に低下することが知られている。そこで、Zfp296 KOマウスのPGCにおいてH3K9me2やH3K9me3、5mCが増加していることを示し、エピジェネティックリプログラミング以降に発現が高まっていくことが知られているNanogやMVH、Kitが低下していることを確認した。これらの結果から、我々は、Zfp296 KOマウスにおけるPGCの分化異常は、H3K9メチル化の亢進および不完全なエピジェネティックリプログラミングに起因しているのではないかと推測している。染色体不安定性は悪性腫瘍の発症や進行に関係している。Suv39hの欠損はペリセントロメア領域のヘテロクロマチンにおいてH3K9メチル化に異常をきたし、染色体不安定性をもたらすことが知られ、Suv39h KOマウスではB細胞性リンパ腫の自然発症や減数分裂の異常がみられることが報告されている。我々は、Zfp296がSuv39h1によって触媒されるH3K9me2とH3K9me3を減少させることをin vitroで示した。この結果からZfp296が染色体の安定性に対して抑制的に働くことが示唆され、このことは、急性白血病におけるZfp296による腫瘍進展のメカニズムを説明できるかもしれない。Suv39h1やEset、G9aなどH3K9メチル化酵素の抑制は、転写因子のゲノムへのアクセスを促進し、体細胞リプログラミングの効率を高めることが報告されている。一方、山中因子と共にZfp296を発現させることでiPS化を促進することが知られているが、これはZfp296の転写因子としての働きによるものと

解釈されている。そこで新たに、我々は、Zfp296によってiPS化が促進されるメカニズムとしてH3K9メチル化の抑制があるのではないかと推測している。結びとして、本研究では、Zfp296が生殖細胞の発生や胎仔成長において重要な役割を担っていることを示した(図)。また、Zfp296が、従来から報告されているDNA結合性の転写因子としてだけでなく、クロマチン制御因子としても働くことを示した。Zfp296によるエピジェネティック制御は、胎仔発生に限らず、悪性腫瘍の発症・進展や体細胞リプログラミングにおいても同様に重要であると考えている。また、このメカニズムの更なる研究は、基礎研究のみならず癌治療や再生医療などを見据えた医学研究においても鍵となるエピジェネティクスの一端的な解明につながると期待している。



< 引用文献 >

Dear, T. N. Cloning, structure, expression analysis, and assignment to mouse Chromosome 7 of the gene Zfp296 encoding a zinc finger protein. *Mammalian Genome* **11**, 1037-1039, doi:10.1007/s003350010182 (2000).

Fischedick, G. *et al.* Zfp296 is a novel, pluripotent-specific reprogramming factor. *PLoS One* **7**, e34645, doi:10.1371/journal.pone.0034645 (2012).

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 1 件)

Takemoto N, Yoshimura T, Miyazaki S, Tashiro F, Miyazaki J-i. Gtsf11 and Gtsf2 are specifically expressed in gonocytes and spermatids but are not essential for

spermatogenesis. *PLoS ONE* (査読有) 11(3), 2016, DOI: 10.1371/journal.pone.0150390

〔学会発表〕(計 2 件)

松浦巧、宮崎竜志、宮崎早月、田代文、宮崎純一 Znフィンガータンパク質 Ces1は、Suv39h に結合してヒストン H3K9メチル化を抑制し、胎仔成長や生殖細胞の分化を制御する、日本分子生物学会、2015年12月2日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

松浦巧、宮崎竜志、宮崎早月、田代文、宮崎純一 Ces1 遺伝子欠損マウス胎仔におけるヒストン H3K9 および DNA メチル化レベルの亢進と胎生致死・成長遅延および始原生殖細胞の分化異常、日本分子生物学会、2014年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田代 文 (TASHIRO, Fumi)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40136213

(2)研究協力者

上田 裕紀 (UEDA, Hironori)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号：90543463

松浦 巧 (MATSUURA, Takumi)