

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430085

研究課題名(和文) ヒストン修飾によるインプリンティング遺伝子制御の解析と周産期致死疾患モデルの開発

研究課題名(英文) The roles of histone modifications in the perinatal period.

研究代表者

成瀬 智恵 (Naruse, Chie)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30372486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：HP1 は神経幹細胞の条件的ヘテロクロマチン領域においてヒストンH3K9me3やH3K9me2だけでなく、H3K27me3の維持に関わることが示唆された。また、Jmjd3欠損マウス、Jmjd3酵素活性特異的変異マウスおよびUtx欠損マウスを作製し、UtxではなくJmjd3がHox遺伝子の制御に関わることを、Jmjd3はHox遺伝子の発現開始制御に関わることを、Jmjd3は脱メチル化酵素活性を介してHox遺伝子の制御に関わることを明らかにした。さらに、胎盤におけるインプリンティング遺伝子の発現異常がポリコム因子のリクルートができないことによる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：HP1gamma mutant neurospheres had tendency to differentiate into neurons and astrocytes, and not only H3K9 but H3K27 methylation decreased in HP1gamma mutant neurospheres. Jmjd3 and Utx are H3K27 demethylases and thought to be involved in the many human diseases, however, the functional differences between Jmjd3 and Utx in mammals are still unclear. We examined both Jmjd3 and Utx deficient embryos. The results suggest that Jmjd3, but not Utx is involved in the axial patterning through Hox regulation in mice in contrast to previous reports that not Jmjd3 but Utx determines the axis formation via Hox regulation in zebrafish and nematode. Furthermore, Jmjd3 mouse mutants lacking only demethylase activity were examined since Jmjd3 functions in two ways: demethylase-dependent and independent. They showed the same phenotypes as Jmjd3 deficient embryos, suggesting that demethylase activity of Jmjd3 is crucial for the axial patterning in mice.

研究分野：実験動物学

キーワード：マウス 脱メチル化酵素 ホメオティック変異

1. 研究開始当初の背景

近年、DNA のメチル化やヒストンの修飾によって、染色体の構造や染色体の特定の位置の核内局在が変化したり、転写因子や転写抑制因子の DNA への結合能が変化したりすることによって、遺伝子の発現が制御されることがわかってきた。この制御機構は DNA 塩基配列の変化を伴わずに子孫や分裂後の娘細胞に伝達され (エピジェネティック制御) 特に細胞の多能性の維持や分化に重要な役割を担うことがわかってきた。

ゲノムインプリンティングとは父親由来もしくは母親由来のゲノムからのみ遺伝子が転写される現象で、哺乳類の中でもマウス、ヒトを含む有胎盤類に特異的に観察される現象である。インプリンティング遺伝子の発現制御はエピジェネティック制御に依存しており、発現制御領域では主に抑制される方のアレルに DNA のメチル化やヒストン修飾が多く見られるが、発現するアレルの転写活性化に働くヒストン修飾も重要であることがわかってきている。近年、ゲノムインプリンティング現象の破綻がヒト疾患と深く関連することが明らかになってきた。しかしながら、ゲノムインプリンティングの成立するメカニズムやゲノムインプリンティングの破綻が個体に及ぼす影響については、哺乳類のモデル動物が少ないために未だ不明な点が多い。ゲノムインプリンティングは哺乳類で特異的に見られる現象なので、ゲノムインプリンティング異常が個体に及ぼす影響を調べるためには哺乳類の疾患モデル動物を作製することが必須である。そこで、我々はインプリンティングの制御に関連すると考えられるヒストン修飾の変異マウスを作製し、病態を解析することで、疾患モデル動物として確立することを考えた。

2. 研究の目的

本研究では HP1 変異マウスおよびヒストン H3K27 を脱メチル化して転写を活性化する Jmjd3 と Utx 変異マウスを用いて、インプリンティング遺伝子の発現異常が胎盤や胎仔に及ぼす影響を明らかにし、疾患モデルマウスとして確立することを目的とする。(I) HP1 変異マウスについて、周産期発育不全の病態を調べ、ユビキタスなインプリンティング遺伝子の発現変化と、HP1 による制御機構を解析する。(II) Jmjd3 変異胎盤の病態と胎盤特異的インプリンティング遺伝子の発現変化、及び Jmjd3 による制御機構を解析する。(III) Jmjd3 のファミリー分子である Utx や Uty についても遺伝子変異マウスを作製し、胎盤や胎仔での H3K27 脱メチル化酵素ファミリーがインプリンティング遺伝子を制御する機構について解析する。

3. 研究の方法

HP1 や Jmjd3 において修飾されるヒストンが周産期の胎仔の成長や胎盤の形成に果たす役割を明らかにするために、HP1 および Jmjd3 遺伝子変異マウスにおいて発現異常が観察されたインプリンティング遺伝子について、HP1 や Jmjd3 によってどのように発現が制御されているかを明らかにする。また、Jmjd3 と同じファミリーに属する Utx、Uty について遺伝子変異マウスを作製して、Jmjd3 を含め相補的に機能するかどうかなどの遺伝学的な解析を行う。また、周産期の死亡原因として神経系に属する呼吸中枢の障害が考えられるので HP1 および Jmjd3 の神経細胞特異的ノックアウトマウス (HP1 flox/Nestin-Cre, Jmjd3 flox/Nestin-Cre) を作製して病態を解析する。

HP1 変異マウスの解析

遺伝子変異マウスで見られる生後直後あるいは胎生 18.5 日齢の症状を生理学的・組

織学的に詳細に解析する。また、神経細胞に起こっている異常の原因を分子レベルで解析する。十分な細胞数が得られないなどの理由で動物個体を用いて行うことが難しい実験は、培養細胞などを用いて行う。

Jmjd3 と Utx 変異マウスの解析

Jmjd3 単純ノックアウトマウスは骨格形成に異常を示していたので、原因となる遺伝子発現変化を特定する。Jmjd3 の脱メチル化酵素活性の寄与を証明するため Jmjd3 脱メチル化酵素特異的変異マウスを作製し、さらに、ファミリー分子である Utx との機能の違いを明らかにするため、Utx 変異マウスを作製してそれぞれの表現型を比較する。インプリンティング遺伝子の発現変化が見られた胎盤での Jmjd3 の機能を調べるため、ポリコームなど、インプリンティング遺伝子の制御を行うと考えられる因子との相互作用を調べる。

4. 研究成果

HP1 変異マウスの解析

C57BL/6 背景の HP1 変異マウスは生後 1 時間以内に死亡してしまうことがわかった。HP1 は神経系に多く発現しているため、我々は呼吸中枢に問題を生じているのではないかと考えた。そこで、神経系特異的な HP1 変異マウス (HP1 flox/Nestin-Cre Tg) を作製したところ、予想に反して HP1 flox/Nestin-Cre マウスは成体まで生存したため、生後直後に死亡する原因は神経系にはないことが明らかになった。しかしながら、HP1 flox/Nestin-Cre マウスはオープンフィールドテストにおける低活動性など、行動解析によって異常を示したことから、高次神経機能において重要な役割を担っていることが示唆された。

そこで、神経系における HP1 の機能について解析を行うため、神経幹細胞を HP1

変異マウスより採取して遺伝子発現解析を行ったところ、野生型に比較して分化しやすい傾向を持つことが示唆された。また、野生型に比べて HP1 変異細胞において発現が上昇した遺伝子についてヒストン修飾解析を行った結果、HP1 タンパク質が結合して遺伝子発現を抑制すると考えられているヒストン H3K9me3 や H3K9me2 だけでなく、H3K27me3 も減少していることが明らかになった。一方、遺伝子発現を促進する H3K9me3 などのヒストン修飾には、野生型と HP1 変異細胞の間で違いが認められなかった (投稿準備中)。よって、H3K9me3, H3K9me2 および H3K27me3 の減少を阻止することで神経幹細胞の異常を回復させることができる可能性が示唆された。研究の進行に伴い解析の中心を神経系の異常に関することにおいたため、周産期の死亡原因とインプリンティング遺伝子との関連を明確に証明することはできなかった。

Jmjd3 と Utx 変異マウスの解析

Jmjd3 変異マウスは骨格のホメオティック変異が引き起こされて周産期に死亡することがわかっていたので、ホメオティック変異の原因がヒストン修飾の異常によるものなのか、この酵素の持つ他の機能によるものなのかを明らかにするために、発生期に発現低下の認められた Hox 遺伝子座のヒストン修飾を詳細に解析した。野生型と Jmjd3 変異胚を比較した結果、Hox 遺伝子座への H3K27me3 の集積が有意に亢進していたので、変異胚におけるホメオティック変異はヒストン修飾の異常が原因であることが強く示唆された。さらに、ヒストン修飾の異常が原因であることを明らかにするため、酵素活性部位のみを欠失した Jmjd3 変異マウス (DM) を作製したところ、Jmjd3 単純ノックアウトマウスと同じ表現型を示したことから、Jmjd3 におけるホメオティ

ック変異はヒストン修飾の異常が原因であることが明らかになった。同じ活性を持つファミリー分子である Utx 変異マウスを作製したところ、ホメオティック変異は観察されなかったことから、マウスの骨格形成には Jmjd3 が必須であることを示した。

周産期に致死となる原因として、骨格形成の異常または呼吸中枢の異常が考えられたため、Jmjd3flox/Nestin-Cre マウスを作製したところ、このマウスは骨格系には異常が認められなかったものの、生後直後から呼吸ができずに死亡した。よって、神経細胞における Jmjd3 の発現が生存に必須であることが明らかになった (Naruse et al. 論文投稿中)。

Jmjd3 変異マウスの胎盤の形成に異常が認められたため、胎盤におけるインプリンティング遺伝子の発現を解析したところ、Kcnq1 クラスター内の胎盤特異的なインプリンティング遺伝子群の発現が野生型に比べて一部上昇あるいは低下していた。これまでに知られている Jmjd3 の機能は遺伝子発現を促進するものであることから、一部遺伝子の発現低下は Jmjd3 の欠失で説明ができるが、発現上昇はこれまでの機能では説明できなかった。そこで、遺伝子発現を抑制するポリコム群と Jmjd3 が相互作用するのではないかと考え解析した結果、細胞内強制発現系において予想を支持する結果が得られたので、Jmjd3 が遺伝子発現抑制因子をリクルートする新たな機能を持つ可能性が示唆された (投稿準備中)。

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)

Ohno, R., Nakayama, M., Naruse, C., Okashita, N., Takano, O., Tachibana,

M., Asano, M., Saitou, M., and Seki, Y. A replication-dependent passive mechanism modulates DNA demethylation in mouse primordial germ cells. *Development* 140: 2892-2903, 2013. 査読有 DOI: 10.1242/dev.093229.

Ha, N., Pham, D-H., Naruse, C., Asano, M., and Thai, T-H. HP-1 γ controls high-affinity antibody response to T-dependent antigens. *Frontiers in Immunology* 5: 271, 2014. 査読有 DOI: 10.3389/fimmu.2014.00271.

[学会発表](計 4件)

川口隆之, 成瀬智恵, 柴田進和, 浅野雅秀「胎盤特異的インプリンティング遺伝子における Jmjd3 の機能解析」第 60 回日本実験動物学会, つくば国際会議場(茨城県), 2013 年 5 月 15 日

Sakanishi, K., Abe, K., Yoshihara, T., Naruse, C., Asano, M. “Loss of HP1 γ affected the character of neural stem cells in culture.” 第 37 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(神奈川県), 2014 年 11 月 25 日

成瀬智恵, 柴田進和, 阿部可奈恵, 川口隆之, 杉原一司, 伊川正人, 浅野雅秀「マウス体軸形成に対する Kdm6 ファミリーの関与」第 62 回日本実験動物学会, 京都テルサ(京都), 2015 年 5 月 30 日

成瀬智恵, 柴田進和, 阿部可奈恵, 川口隆之, 杉原一司, 伊川正人, 浅野雅秀「マウス体軸形成に対する Kdm6 ファミリーの機能」第 38 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド(兵庫), 2015 年 12 月 3-4 日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕 出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/research.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成瀬 智恵 (NARUSE, Chie)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30372486

(2) 研究分担者

浅野 雅秀 (ASANO, Masahide)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：50251450

(3) 連携研究者

杉原 一司 (SUGIHARA, Kazushi)

京都大学・大学院医学研究科・技術職員

研究者番号：10377418