

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業 ユニットタイプ
「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) エピゲノム成立の分子メカニズム解明と制御
(英語) Molecular mechanisms and manipulation of the epigenome establishment

研究開発担当者 (日本語) 大阪大学大学院 生命機能研究科・教授・仲野 徹
所属 役職 氏名： (英語) Osaka University, Professor, Toru Nakano

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語)
開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

『生殖細胞におけるエピゲノム状態確立の分子機構』および『DNA 脱メチル化によるエピゲノム状態の確立』という二つの大テーマについて、以下の実験をおこなった。

<生殖細胞におけるエピゲノム状態確立の分子機構>

1. 人為的 piRNA 産生システムを用いた DNA メチル化機構の解析と応用

胎仔期の精巣において *Dnmt3L* アンチセンス鎖を発現するトランスジェニックマウスは、piRNA を介した DNA メチル化により内在性の *Dnmt3L* 遺伝子にサイレンシングが生じる。このトランスジェニックマウスの全ゲノムシーケンスにより、二カ所にトランスジーン挿入があることがわかった。それぞれのトランスジーン領域を有するマウス系統を分離し、表現型を調べたところ、一方の系統は減数分裂期で精子形成が停止していたが、もう一方の系統では精子形成は正常に進行していることが明らかになった。それぞれの系統のゲノム解析と表現型の詳細な解析から、必ずしも piRNA を介するサイレンシングには piRNA クラスター領域が必須な要件ではなく、アンチセンス鎖の発現で十分ではないかということがわかってきた。

2. *de novo* DNA メチル化複合体の解析

piRNA を介した遺伝子発現のサイレンシングに必要な複合体をリクルートすることができると考えられる ZF-MIWI2 タンパク（Type A Line-1 のプロモーター領域を認識する zinc finger と MIWI2、および NLS の融合タンパク）を用いて、ZF-MIWI2 に結合するタンパクの探索をおこない、その候補として MORC3 を見いだした。ファミリータンパクである MORC1 がレトロトランスポゾン遺伝子の DNA メチル化に関与していることから、MORC3 も同様の機能を有している可能性があると考えて解析を進めている。また、piRNA の標的である LINE1 の制御領域には、他の領域より多くの H3K4me2 が局在していることなどを見出し、piRNA による遺伝子サイレンシングにおけるヒストン修飾の重要性を明らかにしつつある。

<DNA 脱メチル化によるエピゲノム状態の確立>

1. インプリンティング破綻の分子メカニズム

インプリンティング遺伝子の片アレル性の発現がどのように維持されているのかを明らかにするため、その破綻（Loss of imprinting: LOI）を検出できるレポーター細胞およびマウスの樹立を行った。LOI は ES 細胞の樹立過程においても生じていることを見出しており、父方発現インプリンティング遺伝子である *Phf17* も例外ではない。*Phf17* 遺伝子は、胚盤胞の段階では父方アレルからのみ発現しており、ES 細胞の樹立過程において母方アレルからの発現も上昇してくるが、その際に、*Phf17* 遺伝子の母方アレルに存在するヒストン H3 リジン 27 トリメチル化（H3K27me3）が脱メチル化されることにより、LOI が特異的に誘導されることがわかった。また、H3K27me3 依存的なインプリンティング遺伝子として、*Phf17* の他にも、*Sall1* や *Sfmbt2* などを新規に同定することができた。

2. Stella による DNA メチル化制御機構の解明

受精卵の雄性ゲノムにおける胚性遺伝子の活性化には、5 ヒドロキシメチル化シトシン（5hmC）と H2B S112GlcNAc 修飾の両者が必要であることを見出してきた。さらに詳細な分子メカニズムの解析をおこない、Tet3 タンパクの 5hmC を産生する酵素活性が、この胚性遺伝子の活性化に必須であることを明らかにした。

SUMMARY OF THE ACHIEVEMENTS

We carried out several lines of experiments on two major themes, “Molecular Mechanisms on the Establishment of Male Germ Cell Epigenome” and “Establishment of Epigenome State by DNA demethylation”.

<Molecular Mechanisms on the Establishment of Male Germ Cell Epigenome>

1. Induction of DNA methylation by artificial piRNA production system and its application

Two transgene insertion loci were found in the Tg-as3L mouse line, in which anti-sense RNA of *Dnmt3L* was expressed and subsequent gene silencing of the gene was brought about through piRNAs. Analyses of the two segregated mouse lines bearing only one of the transgenic loci of the Tg-as3L mice showed that one line exhibited the impaired spermatogenesis at meiosis and the other did not. Analysis of the linkage between the transgene insertional sites and the phenotypes strongly supports our hypothesis that expression of the anti-sense RNA *per se* is crucial and so called piRNA cluster region is not necessarily required for the piRNA biogenesis.

2. Analysis of the molecular machinery for piRNA dependent *de novo* DNA methylation

We have been studying the ZF-MIWI2 fusion protein, which consists of zinc finger protein recognizing the promoter sequence of Type A Line-1, MIWI2, and nuclear localization signal, and have revealed that the protein has the capacity to recruit the molecules necessary for piRNA dependent *de novo* DNA methylation. Using the protein, we identified that MORC3 bound to ZF-MIWI2 in the male embryonic germ cells at the timing of *de novo* DNA methylation. Considering that MORC1, a family protein of MORC3, has a role in silencing the expression of retrotransposons, MORC3 should be a strong candidate for a member of the methylation machinery. Another study showed that H3K4me2 was enriched in the Line-1 loci, which are the target of piRNA dependent *de novo* DNA methylation.

<Establishment of Epigenome State by DNA demethylation>

1. Molecular mechanisms of loss of genomic imprinting (LOI : loss of imprinting)

Reporter cells and mice, which could be useful to study the molecular mechanisms of LOI, were established to reveal the maintenance mechanisms of mono-allelic expression of the imprinted genes. We found that LOI took place during the derivation of embryonic stem (ES) cells from blastocysts and a paternally expressed gene, *Phf17*, was not exceptional. It was revealed that the induction of the expression of the gene from maternal allele was caused by a demethylase of H3K27me3 (trimethyl histone H3 (Lys27)). In addition, the other paternally expressed imprinted genes, such as *Sall1* and *Afmbt2*, exhibited similar expression induction in a H3K27me3 demethylase dependent manner.

2. Regulation of DNA methylation by Stella

Both 5-hydroxymethyl-cytosine (5-hmC) and H2B S112GlcNAc modification by O-linked N-acetylglucosamine transferase are necessary for the gene activation from paternal genome in zygotes. Further molecular analysis revealed that the enzymatic activity of Tet3 to produce 5hmC was required for the gene activation.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 1件）

1. Kojima-Kita K, Kuramochi-Miyagawa S, Nagamori I, Ogonuki N, Ogura A, Hasuwa H, Akazawa T, Inoue N, Nakano T.
MIWI2 as an Effector of DNA Methylation and Gene Silencing in Embryonic Male Germ Cells.
Cell Rep, 16:2819-2828, 2016

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. エピジェネティクス入門、口頭、仲野徹、第104回日本泌尿器科学会総会、2016/4/23、国内
2. 初期胚のクロマチン再構成におけるヒストンシャペロンの役割、口頭、荒川達彦、中谷庸寿、小田昌朗、木村康義、関田洋一、木村透、中村肇伸、仲野徹、第10回日本エピジェネティクス研究会年会、2016/5/19、国内
3. ES細胞における未分化状態とゲノム安定性を維持するシグナル経路、ポスター、小西理予、仲野徹、山口新平、第10回日本エピジェネティクス研究会年会、2016/5/19、国内
4. 胎生期雄性生殖細胞におけるDNAメチル化導入機構の解析、ポスター、永森一平、小林久人、城本悠介、西村徹、宮川さとみ、河野友宏、仲野徹、第10回日本エピジェネティクス研究会年会、2016/5/19、国内
5. 雄性生殖細胞におけるMIWI2によるDNAメチル化を介した遺伝子発現制御、ポスター、北(小島)加奈子、宮川(倉持)さとみ、仲野徹、第10回日本エピジェネティクス研究会年会、2016/5/19、国内
6. 始原生殖細胞特異的なペリセントロメアへの5hmC集積機構とその機能の解明、ポスター、前田隆寛、仲野徹、山口新平、第10回日本エピジェネティクス研究会年会、2016/5/20、国内
7. ES細胞における未分化状態の確立と維持に機能するシグナル経路、ポスター、小西理予、仲野徹、山口新平、第39回日本分子生物学会年会、2016/11/30、国内
8. 胎生期雄性生殖細胞におけるDNAメチル化導入機構の解析、ポスター、永森一平、小林久人、城本悠介、西村徹、山岸玲奈、宮川さとみ、河野友宏、仲野徹、第39回日本分子生物学会年会、2016/11/30、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 「科学とは何か? その考え方と倫理」、仲野 徹、兵庫県立明石北高等学校・出前講義
2016/7/13、国内

(4) 特許出願

なし

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業 ユニットタイプ「エピゲノム研究に基づく
診断・治療へ向けた新技術の創出」
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) エピゲノム成立の分子メカニズム解明と制御
(英語) Molecular mechanisms and manipulation of the epigenome establishment

研究開発担当者 (日本語) 大阪大学大学院 生命機能研究科・教授・仲野 徹
所属 役職 氏名： (英語) Osaka University, Professor, Toru Nakano

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) DNA 脱メチル化によるエピゲノム状態の確立
開発課題名： (英語) Establishment of Epigenome state by DNA demethylation.

研究開発分担者 (日本語) 中村 肇伸
所属 役職 氏名： (英語) Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, Associate Professor, Toshinobu
Nakamura

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発代表者による報告の場合
- ・ 研究開発分担者による報告の場合
研究開発代表者：長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・中村肇伸 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 4 件）

1. Tsuji A, Nakamura T, Shibata K. Effects of mild and severe vitamin B1 deficiencies on the meiotic maturation of mice oocytes. *Nutrition and Metabolic Insights*. 2017, 10, 1-9.
2. Tsuji A, Noguchi R, Nakamura T, Shibata K. Folic Acid Deficiency Does Not Adversely Affect Oocyte Meiosis in Mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 2016, 62 (6), 375-379.
3. Sekita Y, Nakamura T, Kimura T. Reprogramming of germ cells into pluripotency. *World Journal of Stem Cells*. 2016, 8 (8), 251-259.
4. Okai S, Usui F, Yokota S, Hori-I Y, Hasegawa M, Nakamura T, Kurosawa M, Okada S, Yamamoto K, Nishiyama E, Mori H, Yamada T, Kurokawa K, Matsumoto S, Nanno M, Naito T, Watanabe Y, Kato T, Miyauchi E, Ohno H, Shinkura R. High-affinity monoclonal IgA regulates gut microbiota and prevents colitis in mice. *Nature Microbiology*. 2016, 1, 16103.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ビタミン欠乏が卵母細胞の質におよぼす影響，口頭，辻愛，中村肇伸，柴田克己，日本農芸化学会 2017 年大会，2017/3/17，国内.
2. 金属メッシュデバイスによるマウス ES 細胞由来胚様体のサイズ分画法の検討，ポスター，長谷川慎，木村七海，井上有香，水上民夫，佐々木隆造，土田美江，中村肇伸，古田明日香，三浦佳子，神波誠治，近藤孝志，第 16 回日本再生医療学会総会，2017/3/9，国内.
3. Tet3 と OGT が胚性遺伝子の活性化に及ぼす影響，ポスター，中村肇伸，古田明日香，仲野徹，AMED-CREST「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」研究領域 第 6 回領域会議，ポスター，2017/2/3，国内.
4. 全能性細胞で特異的に発現する遺伝子群の機能解析，口頭，中村肇伸，奈良先端科学技術大学院大学セミナー，2016/12/9，国内.
5. ES 細胞に含まれる全能性細胞の可視化とその制御，ポスター，古田明日香，中村肇伸，第 39 回日本分子生物学会年会，2016,12,1，国内.
6. Induction of totipotent fraction in ES cell culture, poster, Furuta A, Nakamura T, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Germ Cells, 2016/10/5, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 再生医療研究の最前線～医療の未来を切り開く研究～, 中村肇伸, 京都高齢者大学校, 京都, 2016/6/17, 国内.
2. 幹細胞とクローン～基礎研究から再生医療研究まで～, 中村肇伸, 淡海生涯カレッジ, 滋賀, 2016/11/12, 国内.

(4) 特許出願