

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実績報告書**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	ゲノムプログラミングにおけるクロマチン修飾制御機構の解明
研究機関・部局・職名	九州大学・生体防御医学研究所・准教授
氏名	束田 裕一

1. 研究実施期間 平成23年 2月10日～平成25年 6月27日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	107,278,896	107,278,896	0	107,278,896	107,278,896	0	0
間接経費	32,183,668	32,183,668	0	32,183,668	32,183,668	0	0
合計	139,462,564	139,462,564	0	139,462,564	139,462,564	0	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	6,312,654	20,434,365	16,879,170	7,179,483	50,805,672
旅費	0	639,486	1,021,530	124,640	1,785,656
謝金・人件費等	0	5,769,224	7,083,462	1,248,279	14,100,965
その他	563,850	15,093,189	23,191,700	1,737,864	40,586,603
直接経費計	6,876,504	41,936,264	48,175,862	10,290,266	107,278,896
間接経費計	2,062,951	12,480,000	6,749,549	10,891,168	32,183,668
合計	8,939,455	54,416,264	54,925,411	21,181,434	139,462,564

4. 主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関名
三洋電機(株)超低温フリーザー	MDF-U53VS6	1	1,488,375	1,488,375	2011.3.23	九州大学
タイテック株式会社 中型恒温湿とう培	BR-43FL-MR	1	823,200	823,200	2011.3.28	九州大学
微量高速冷却遠心機 (株)トミー精工製	MX-305	1	846,720	846,720	2011.3.28	九州大学
フレーム中央大型実験台 (株)ダルトン		1	548,100	548,100	2011.3.28	九州大学
ハイオラボラトリス社製 C1000サーマルサイク	185-1048JA	1	1,050,000	1,050,000	2011.5.6	九州大学
UDP-6-N3-Glu	10mg	1	699,300	699,300	2011.5.19	九州大学
ハイオラボラトリス社製 C1000Touchサーマルサイクラー	185-1148JA	1	1,050,000	1,050,000	2011.8.8	九州大学
米国サッター社製 微小ガラス 針作製装置	P-97IVF	1	1,386,000	1,386,000	2011.9.30	九州大学
MetaMorph Basic オフラインソフトウェア	31032	1	661,500	661,500	2012.2.23	九州大学
島津ライフサイエンス分光光度計	BioSpec-nano	1	819,000	819,000	2011.12.1	九州大学
CV1000-SP2用対物レンズ	100倍オイルホルダー付	1	550,368	550,368	2011.10.25	九州大学
米国サーモフィッシャーサイエンティフィック社製PikoReal96システム	TCR0096	1	1,297,800	1,297,800	2013.3.6	九州大学
ハイオラボラトリス株式会社製C1000Touchサーマルサイクラー+2×48well	185-1148JA	1	1,050,000	1,050,000	2013.3.15	九州大学

5. 研究成果の概要

哺乳類受精卵で起こる大規模なクロマチンの脱メチル化は、配偶子が再び全能性を獲得するゲノムリプログラミング及びクローン動物作成時の人工ゲノムリプログラミングに極めて重要な役割を果たすと考えられてきた。本研究は、そのクロマチンメチル化修飾消去機構を解明することを目的として遂行し、受精卵の雄性DNA脱メチル化現象のメカニズム、および雄性DNA脱メチル化防御機構を明らかにした。本研究成果は受精卵のクロマチンメチル化修飾消去機構の全貌解明に向けた研究の進展に寄与すると共に、脱メチル化の役割について従来の変える可能性を示唆するものであった。本研究成果の発展は、ゲノムリプログラミング機構を応用した再生医療、生殖補助医療、畜産技術への波及効果が期待できる。

課題番号	LS092
------	-------

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 研究成果報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名 (下段英語表記)	ゲノムリプログラミングにおけるクロマチン修飾制御機構の解明
	Understanding the regulatory mechanisms of chromatin modification in the genome reprogramming
研究機関・部局・ 職名 (下段英語表記)	九州大学・生体防御医学研究所・准教授
	Associate Professor, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University
氏名 (下段英語表記)	東田 裕一
	Yuichi Tsukada

研究成果の概要

(和文):

哺乳類受精卵で起こる大規模なクロマチンの脱メチル化は、配偶子が再び全能性を獲得するゲノムリプログラミング及びクローン動物作成時の人工ゲノムリプログラミングに極めて重要な役割を果たすと考えられてきた。本研究では、クロマチンメチル化修飾消去機構を解明することを目的とし、受精卵の雄性 DNA 脱メチル化現象の分子メカニズム、および雄性 DNA 脱メチル化防御機構を明らかにした。本研究成果は受精卵のクロマチンメチル化修飾消去機構の全貌解明に向けた研究の進展に寄与するとともに、脱メチル化の役割について従来の概念を変える可能性を示唆するものであった。本研究成果の発展は、ゲノムリプログラミング機構を応用した再生医療、生殖補助医療、畜産技術への波及効果が期待できる。

(英文):

Chromatin demethylation in zygotes has been considered to play important roles in reprogramming processes of gametes to acquire totipotency. The study was aimed at elucidating the mechanism of chromatin demethylation and revealed the major mechanism of paternal DNA demethylation in zygote and that of protection against DNA demethylation in paternal DNA. These results can contribute to the advance of the basic research and be applied to innovation of more efficient methods to reprogram differentiated cells into pluripotent or totipotent stem cells, thereby will advance translational research in many areas of medicine.

1. 執行金額 139,462,564 円
 (うち、直接経費 107,278,896 円、 間接経費 32,183,668 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成25年6月27日

3. 研究目的

ゲノムの持つ遺伝情報の発現は、塩基配列と転写装置だけで制御されている訳ではなく、“エピジェネティクス”と呼ばれる DNA とヒストンなどのタンパク質から構成されるクロマチンの化学的・構造的な修飾による制御も受けており、これは発生の過程で確立され、その後細胞の記憶として働く。生命の発生、再生の本質的な制御機構である細胞のリプログラミング機構も、その実体はエピジェネティクスであると考えられているが、そのメカニズムは解明されておらず、その最大の謎はクロマチンのメチル化修飾消去機構である。哺乳類では細胞が全能性を獲得するためのリプログラミングが受精卵で起こる。

そこで、本研究では哺乳類受精卵で起こる大規模なクロマチンのメチル化修飾消去機構を、卵母細胞に特異的に発現する制御因子の同定と機能解析により解明し、細胞のリプログラミングの全貌解明へと発展させ、高効率の細胞リプログラミング法の開発といった重要なイノベーションの創出に繋げることを目的としている。

4. 研究計画・方法

ゲノムリプログラミングに関与するクロマチンメチル化修飾制御因子を、遺伝子発現情報解析およびプロテオーム解析により同定する。同定した制御因子の機能欠損受精卵を遺伝学的手法により作成し、受精卵で観察される大規模なクロマチンの脱メチル化における制御因子群の機能欠損の影響を DNA およびヒストンのメチル化修飾の免疫染色及び次世代シーケンサーを用いたメチローム解析といった細胞生物学・分子生物学的手法により明らかにする。さらに、作成した機能欠損受精卵を用いて、制御因子の機能欠損により引き起こされるクロマチンのメチル化修飾消去異常が個体発生にどのような影響を与えるかを染色体構造や遺伝子発現への影響を中心に解析することで、個体発生におけるクロマチンのメチル化修飾消去の役割を明らかにする。

5. 研究成果・波及効果

(1) 研究成果の概要

①マウス受精卵の雄性 DNA 脱メチル化メカニズムの解明
新規制御因子の同定

トランスクリプトーム解析及びバイオインフォマティクス解析により、哺乳類受精卵で起こる大規模なクロマチンのメチル化修飾消去機構に関与する制御因子の同定を試みた結果、卵母細胞に特異的に発現し、発生が進むにつれて急速に発現の低下するメチル化 DNA 水酸化酵素 TET3 を同定した(図1)。

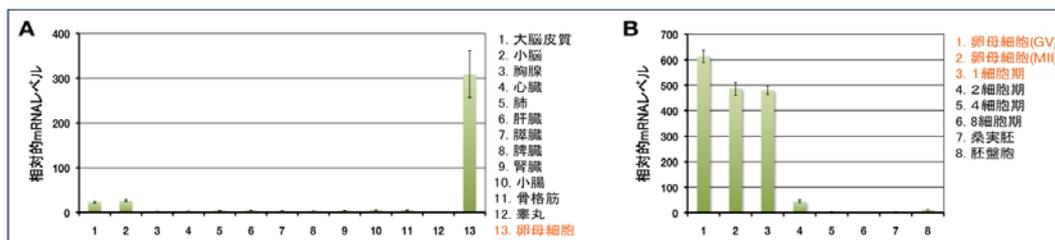


図1 | 新規制御因子 TET3 の同定. (A) TET3 のマウス組織別発現. (B) TET3 のマウス初期発生における発現.

マウス受精卵の雄性 DNA 脱メチル化メカニズムの解明

TET3 はクロマチンを構成する DNA において、そのメチル化修飾を水酸化する酵素として報告された。そこで、マウス受精卵の雄性 DNA の脱メチル化にメチル化修飾の水酸化が関与するかを調べた結果、雄性 DNA ではメチル化 DNA の減少と同時に水酸化されたメチル化 DNA が増加することを明らかにした(図 2)。本結果により、これまで観察されていた受精卵の雄性 DNA においてメチル化 DNA が減少する現象のメカニズムが、メチル化 DNA の水酸化により部分的に説明できることが示唆された。

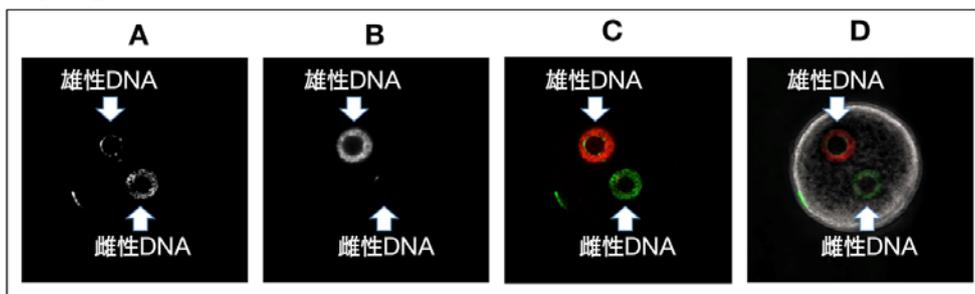


図 2 | マウス受精卵の雄性 DNA の水酸化. (A) メチル化 DNA、(B) 水酸化したメチル化 DNA、(C) メチル化 DNA : 緑、水酸化したメチル化 DNA : 赤、(D) メチル化 DNA : 緑、水酸化したメチル化 DNA : 赤、と受精卵の明視野像。

マウス受精卵の雄性 DNA 脱メチル化における TET3 の役割

上述の研究結果から明らかになったメチル化 DNA の水酸化は、水酸化酵素特異的阻害剤処理および TET3 の卵母細胞特異的ノックアウトマウスから作成した TET3 欠損受精卵では起こらないことから、TET3 が雄性メチル化 DNA 水酸化の責任分子であることを明らかにした(図 3, 4)。

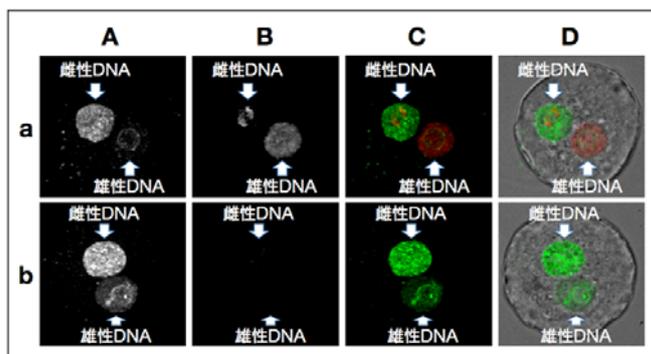


図 3 | マウス受精卵の雄性 DNA の水酸化. (A) メチル化 DNA、(B) 水酸化したメチル化 DNA、(C) メチル化 DNA : 緑、水酸化したメチル化 DNA : 赤、(D) メチル化 DNA : 緑、水酸化したメチル化 DNA : 赤、と受精卵の明視野像、(a) TET3 ヘテロ欠損受精卵、(b) TET3 ホモ欠損受精卵。

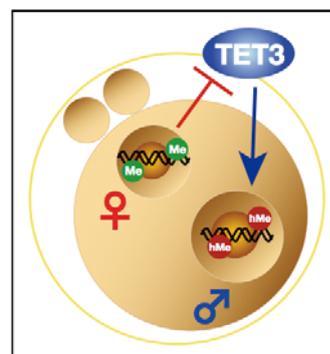


図 4 | マウス受精卵の雄性 DNA 脱メチル化 (水酸化) メカニズム

②マウス受精卵の雄性 DNA 脱メチル化防御メカニズムの解明

新規制御因子の同定

マウス受精卵の雄性 DNA では大規模な脱メチル化(水酸化)が起こるが、脱メチル化から守られている領域が存在する。この領域の一部は核小体前駆体周辺に局在する DNA 領域であり、その領域には各染色体のペリセントロメア領域に存在する major satellite repeat 配列が含まれる。本研究成果として、この脱メチル化から防御されている領域を人工的に脱メチル化させることに成功し、その責任分子としてヒストン脱アセチル化酵素 HDAC1-3 を同定した(図 5)。

マウス受精卵の雄性 DNA 脱メチル化防御メカニズムの解明

HDAC 阻害剤を用いた解析から、HDAC1-3 の酵素活性阻害により脱メチル化から防御されている核小体前駆体周辺に局在する DNA 領域において、ヒストンバリアントの H3.1 または H3.2 が H3.3 に置換されること、および TET3 がリクルートされることを明らかにした(図 6)。

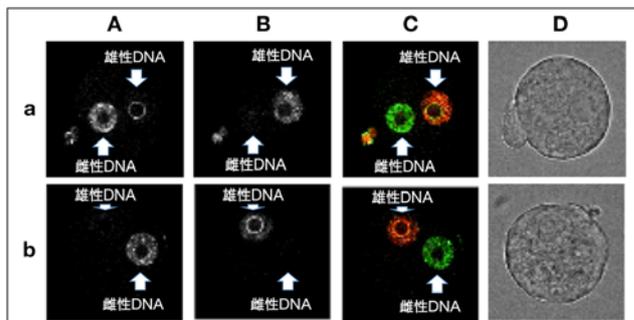


図 5 | マウス受精卵の雄性 DNA の人工的脱メチル化. (A) メチル化 DNA、(B) 水酸化したメチル化 DNA、(C) メチル化 DNA : 緑、水酸化したメチル化 DNA : 赤、(D) 明視野像、(b) 人工的脱メチル化状態.

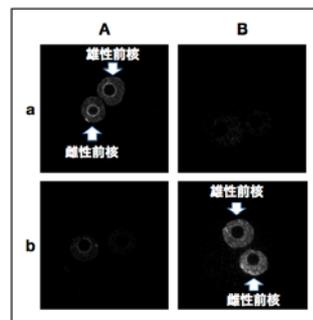


図 6 | ヒストン H3 バリエーションの置換. (A) H3.1/3.2、(B) H3.3、(a) コントロール、(b) HDAC 阻害剤処理.

本結果により、受精卵の雄性 DNA の脱メチル化防御メカニズムが、HDAC1-3 が触媒する脱アセチル化によりヒストンバリアントの H3.1/H3.2 の H3.3 による置換が阻害され、それが TET3 の対象 DNA 領域へのリクルートを阻害することにより部分的に説明できることが示唆された(図 7)。

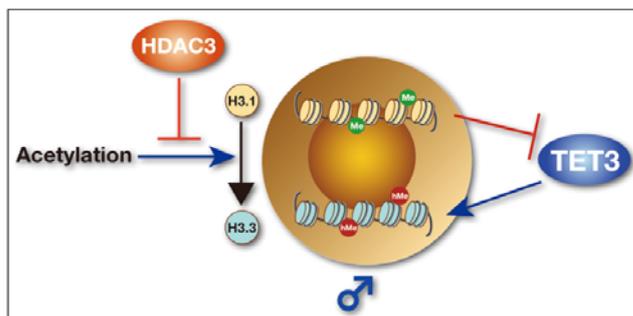


図 7 | マウス受精卵の核小体前駆体周辺雄性 DNA 領域の脱メチル化 (水酸化) 防御メカニズムモデル.

③マウス受精卵の大規模なクロマチン脱メチル化の個体発生における役割の解析

TET3 の遺伝子発現・個体発生における役割の解明

TET3 の機能欠損により引き起こされるクロマチンの脱メチル化異常が遺伝子発現および個体発生にどのような影響を与えるかを調べた結果、受精後の新しい生命の最初の遺伝子発現である zygotic gene activation の開始が TET3 欠損受精卵では早まることが明らかとなった(図 8)。さらに、TET3 を含めた水酸化酵素阻害剤である DMOG により水酸化を阻害することで初期発生において発現に影響を受ける遺伝子をマイクロアレイ解析により同定した(図 9)。また、母性 TET3 欠損受精卵は個体発生が可能であるが、産仔率が減少し、雌雄の発生率がメンデルの法則に従わないことを明らかにした。

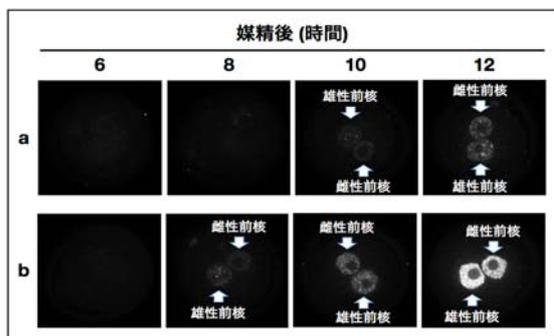


図8 | マウス受精卵の zygotic gene activation. (a) TET3 ヘテロ欠損受精卵、(b) TET3 ホモ欠損受精卵における転写量を示す。

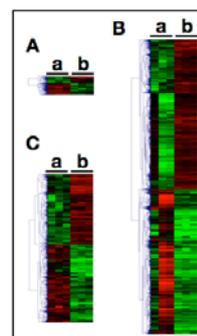


図9 | DNA 水酸化により制御される遺伝子の同定. (A) 1細胞期胚、(B) 2細胞期胚、(C) 4細胞期胚における (a) コントロール、(b) 阻害剤処理の遺伝子発現状態. 緑: 発現の減少、赤: 発現の増加を示す。

HDAC1-3 の遺伝子発現における役割の解明

HDAC1-3 の阻害により引き起こされるクロマチンの脱メチル化異常が遺伝子発現にどのような影響を与えるかを調べた結果、核小体前駆体周辺の脱メチル化から防護される領域に存在する major satellite repeat は脱メチル化により転写活性が上昇することが明らかとなった(図 10)。さらに、HDAC 阻害剤により初期発生において発現に影響を受ける遺伝子をマイクロアレイ解析により同定した。

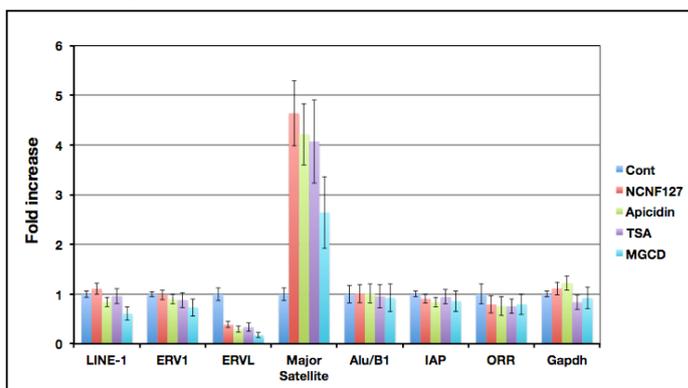


図10 | マウス受精卵のHDAC 阻害剤処理によるリピート配列の転写活性への影響。

(2) 研究の主な成果

哺乳類受精卵で起こる男性 DNA の脱メチル化は、これまで高度に最終分化した配偶子が再び全能性を獲得するゲノムリプログラミング及び体細胞核移植によるクローン動物作成時の人工ゲノムリプログラミングに極めて重要な役割を果たすと考えられてきた。本研究成果は、TET3 による水酸化が男性 DNA の脱メチル化に関与し、そのメカニズムを部分的に明らかにした。また、本研究により男性 DNA 脱メチル化が発生に必須ではないことが明らかになり、このことは、男性 DNA 脱メチル化はリプログラミングおよび個体発生に重要であるという従来の概念を大きく変える可能性がある。しかし、発生に必須ではないが、脱メチル化を起こさなくすると雌雄の産仔率がメンデルの法則に従わないことが明らかとなり、脱メチル化には雌雄の胚発生において異なる役割が存在する可能性が示唆された。このことは、男性 DNA 脱メチル化の役割を解明する上で先進性を持つ事実である。さらに、我々は、男性 DNA では脱メチル化から防護されている領域が存在し、その防御機構には HDAC1-3 が関与していることを見出した。男性 DNA の防御機構は女性 DNA のそれと異なり、世界的にまだ研究が進展していない状況であり、本研究成果の先進性、優位性が期待出来る。

(3) 研究の達成度・波及効果

本研究では哺乳類受精卵で起こる大規模なクロマチンのメチル化修飾消去機構を、卵母細胞に特異的に発現する制御因子の同定と機能解析により解明することを目的としている。本研究成果は、雄性 DNA の脱メチル化現象の具体的メカニズム、および雄性 DNA 脱メチル化防御機構について明らかにした。これらの成果は受精卵のクロマチンメチル化修飾消去機構の主要メカニズムを明らかにしたものであり、当初の目的を概ね達成したことで関連する研究分野の進展に寄与したと考えられる。また、本研究成果の一部は、従来の概念を大きく変える可能性を示唆するものであった。

受精卵のゲノムリプログラミング機構を理解し、全能性細胞の形成過程を理解することで、ゲノムリプログラミングを利用した再生医療、生殖補助医療に貢献する。具体的には、再生医療においては目的とする治療に用いる細胞の作成効率の向上に貢献する。生殖補助医療においては、その医療技術の向上に加え、生殖補助医療により引き起こされる可能性のあるエピゲノム異常について、それを予測し、その対策や診断が可能となる。さらに、ゲノムリプログラミング機構を利用することで、畜産における優良種の開発や増産、絶滅危惧種の保存などに貢献する。

6. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 1 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 1 件 Tsukada Yuichi: Hydroxylation mediates chromatin demethylation. <i>The Journal of Biochemistry</i> (2012) 153: 229-246. http://jb.oxfordjournals.org/content/151/3/229.long (掲載済み一査読無し) 計 0 件 (未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 5 件</p>	<p>専門家向け 計 3 件 日本分子生物学会第 12 回春季シンポジウム 東田 裕一 「細胞の記憶を消すメカニズムークロマチンのメチル化修飾制御機構ー」 山梨・平成 24 年 4 月 25-26 日 日本分子生物学会 さががけ「エピジェネティクスの制御と生命機能」領域 第一期研究成果報告会 東田 裕一 「クロマチンのメチル化修飾消去機構の解明」 東京・平成 25 年 1 月 30 日 独立行政法人 科学技術振興機構 第 8 回研究所ネットワーク国際シンポジウム 東田 裕一 「Regulation of chromatin demethylation」 京都・平成 25 年 6 月 27-28 日 京都大学再生医科学研究所 一般向け 計 2 件 九州大学 最先端・次世代研究開発支援プログラム研究発表会 東田 裕一 「ゲノムリプログラミングにおけるクロマチン修飾制御機構の解明」 福岡・平成 24 年 2 月 28 日 九州大学 高等研究院 九州大学 高等研究院 若手研究者交流セミナー 東田 裕一 「細胞の記憶を消す仕組みークロマチンのメチル化修飾消去機構ー」 福岡・平成 24 年 11 月 21 日 九州大学 高等研究院</p>
<p>図書 計 0 件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得 状況 計 1 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件 (出願中) 計 1 件 新規ヒドロキサム酸誘導体及びその用途 宮田直樹、鈴木孝禎、小笠弘貴、水上民夫、佐々木隆造、東田裕一 名古屋市立大学、関西文理総合学園、株式会社フロンティアファーマ、九州大学 特許、特願 2012-38977、2012 年 2 月 24 日、国内</p>

様式21

Webページ (URL)	<p>研究内容の発表、ウェブページの題名: 特色ある研究の取り組み、ウェブサイトの名称: 九州大学、</p> <p>アクセス URL: http://www.kyushu-u.ac.jp/research/topic/front.php</p>
国民との科学・技術対話の実施状況	<p>九州大学 最先端・次世代研究開発支援プログラム研究発表会 平成 24 年 2 月 28 日、アクロス福岡、一般向け、500 人、研究内容の紹介</p> <p>九州大学 高等研究院 若手研究者交流セミナー 平成 24 年 11 月 21 日、九州大学 医学部百年講堂、一般向け、50 人、研究内容の紹介</p> <p>九州大学の WEB サイトの中に特色ある研究の取り組みとして、本プログラムの内容を公開し、研究目的・研究内容の情報発信を行った。</p>
新聞・一般雑誌等掲載 計 0 件	
その他	

7. その他特記事項