

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)  
実施状況報告書(平成 23 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	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
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	東田 裕一

1. 当該年度の研究目的

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し、発生が進むにつれて急速に発現の低下するヒストン脱メチル化酵素 KDMX を中心とした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。

当該年度は、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ヒストン脱メチル化酵素 KDMX のマウス受精卵のクロマチンメチル化修飾消去機構における役割を明らかにするため、昨年度に引き続き KDMX の機能欠損受精卵の作製に取り組む。さらに、作成した KDMX 機能欠損受精卵を用いて、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 KDMX 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により調べる。

また、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 KDMX 以外の制御因子として同定した TET3 について、KDMX と同様にその機能欠損受精卵を作製し、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個体発生にどのような影響を与えるかを調べる。

さらに、KDMX、TET3 に加え、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る。

2. 研究の実施状況

**(1)KDMX 機能欠損受精卵の作成**

ヒストン脱メチル化酵素 KDMX の機能欠損卵母細胞(ノックダウン、ドミナントネガティブ変異体過剰発現、ノックアウト)の作成を試みた。しかしながら、ノックダウン、ドミナントネガティブ変異体過剰発現による方法では効果的な KDMX 機能欠損卵母細胞の作製は極めて困難であることが判明した。また、ノックアウトによる方法では戻し交配により KDMX のホモ欠損マウスが得られなくなることが判明し、現在卵母細胞特異的なノックアウトマウスの作製を試みている。

**(2)マウス受精卵の父親由来 DNA の脱メチル化メカニズムにおける TET3 の役割**

昨年度にクロマチンのメチル化修飾消去機構の制御因子として同定した TET3 について以下の解析を行った。

①マウス受精卵の父親由来 DNA の脱メチル化メカニズム

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、マウス受精卵の父親由来 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、父親由来 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1)。

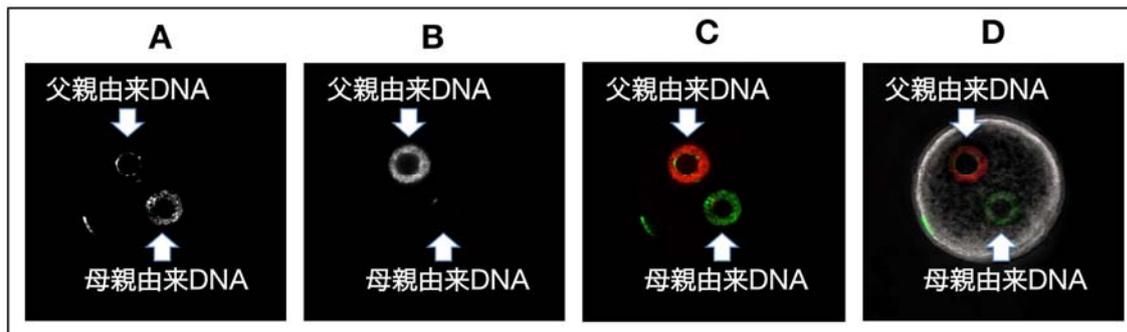


図1 | マウス受精卵の父親由来 DNA の水酸化. (A) メチル化 DNA、(B) 水酸化したメチル化 DNA、(C) メチル化 DNA: 緑、水酸化したメチル化 DNA: 赤、(D) メチル化 DNA: 緑、水酸化したメチル化 DNA: 赤、と受精卵の明視野像。

②マウス受精卵の父親由来 DNA の脱メチル化における TET3 の役割

①の研究の結果明らかになったメチル化 DNA の水酸化において、TET3 がこの現象の責任分子であることを明らかにした。

③TET3 ノックアウトマウスの作製

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個体発生にどのような影響を与えるかを調べるために、TET3 のノックアウトマウスの作製を試み、現在も継続中である。

**(3)新規制御因子の同定**

マウス受精卵の父親由来 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。この領域を人工的に脱メチル化させることに成功し、現在その責任分子の同定を試みている(図2)。

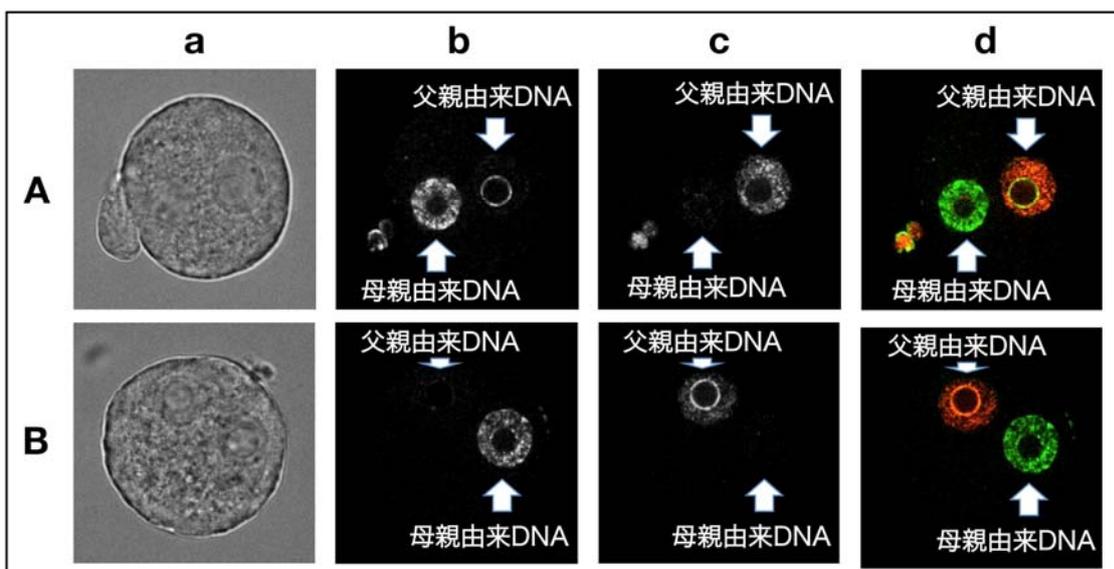


図2 | 父親由来 DNA の人工的脱メチル化. (A) コントロール、(B) 人工的脱メチル化 DNA、(a) 受精卵の明視野像、(b) メチル化 DNA、(c) 水酸化されたメチル化 DNA、(d) メチル化 DNA: 緑、水酸化したメチル化 DNA: 赤. Ab でリング状に見られる父親由来のメチル化 DNA(脱メチル化から守られている領域)が Bb では消失(脱メチル化)している。

3. 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. <a href="http://jb.oxfordjournals.org/content/151/3/229.long">http://jb.oxfordjournals.org/content/151/3/229.long</a></p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 1 件</p>	<p>専門家向け 計 0 件</p> <p>一般向け 計 1 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</p>
<p>図書 計 0 件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状 況 計 0 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 0 件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<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、 アクセス URL: <a href="http://www.kyushu-u.ac.jp/research/topic/front.php">http://www.kyushu-u.ac.jp/research/topic/front.php</a></p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<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 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>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計 0 件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	117,000,000	48,600,000	0	68,400,000	0
間接経費	35,100,000	14,580,000	0	20,520,000	0
合計	152,100,000	63,180,000	0	88,920,000	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	41,723,496	0	0	41,723,496	41,936,264	-212,768	0
間接経費	12,517,049	0	0	12,517,049	12,480,000	37,049	0
合計	54,240,545	0	0	54,240,545	54,416,264	-175,719	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	20,434,365	試薬、抗体、マウス 等
旅費	639,486	
謝金・人件費等	5,769,224	
その他	15,093,189	クローン作製、リース代 等
直接経費計	41,936,264	
間接経費計	12,480,000	
合計	54,416,264	

## 4. 当該年度の主な購入物品(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
ハイオホトリス社 製 C1000サーマルサ イクル	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
ハイオホトリス社 製 C1000Touch サーマルサイクル	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