

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24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、前年度に引き続き KDMX の卵母細胞特異的ノックアウトマウスを作製し、KDMX 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発生過程の遺伝子発現パターンに与える影響を DNA マイクロアレイ解析及び次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析により明らかにする。

一方、前年度までの研究の結果、受精卵で観察される大規模なクロマチンの脱メチル化の制御因子として TET3 を新たに同定した。そこで、KDMX と同様に TET3 の卵母細胞特異的ノックアウトマウスを作製し、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について以下の解析を行う。次世代シーケンサーを用いたメチローム解析により、TET3 の機能欠損により引き起こされるゲノムの脱メチル化異常領域を同定する。そして、KDMX と同様に TET3 の機能欠損により引き起こされる発生過程の遺伝子発現パターンに与える影響を DNA マイクロアレイ解析及び次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析により明らかにする。

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、そ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。

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 のノックアウトマウスの作成を試みたが、ホモ欠損マウスは得られないことが明らかになった。そこで、卵母細胞特異的なノックアウトマウスの作製を試み、ヘテロマウスの作製まで完了した。

**(2)マウス受精卵の雄性 DNA 脱メチル化メカニズムにおける TET3 の役割**  
昨年度にマウス受精卵の雄性 DNA 脱メチル化がメチル基の水酸化によるものであり、この現象に TET3 が関与することを明らかにした。そこで、新規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。

①TET3 ノックアウトマウスの作製  
卵母細胞特異的なノックアウトマウスを作製し、卵母細胞での TET3 のノックアウトにより、メチル基の水

酸化が起こらなくなることを明らかにした(図1)。

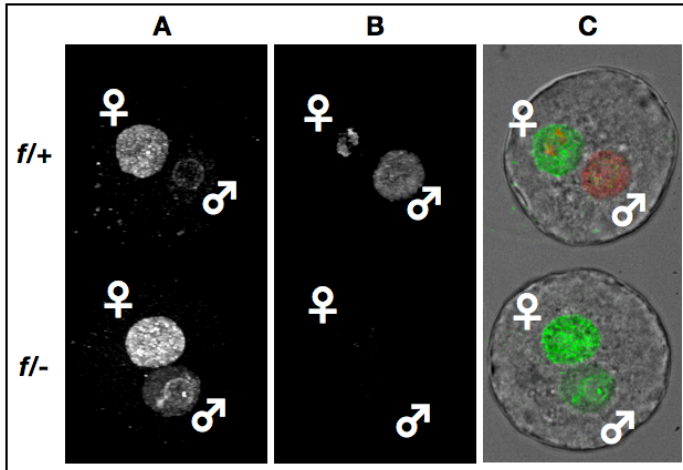


図1 | マウス受精卵の雄性 DNA 水酸化における TET3 の役割. (A) メチル化 DNA、(B) 水酸化したメチル化 DNA、(C) メチル化 DNA: 緑、水酸化したメチル化 DNA: 赤と受精卵の明視野像. (f/+) TET3 ヘテロ欠損、(f/-) TET3 ホモ欠損、(♂) 雄性前核、(♀) 雌性前核. TET3 ホモ欠損卵母細胞の受精卵では水酸化が起こらない(B, f/-).

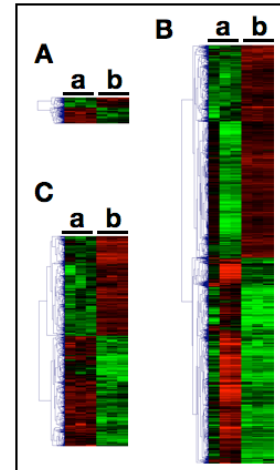


図2 | DNA 水酸化により制御される遺伝子の同定. (A) 1 細胞期胚、(B) 2 細胞期胚、(C) 4 細胞期胚における (a) コントロール、(b)阻害剤処理の遺伝子発現状態. 緑:発現の減少、赤:発現の増加を示す.

②TET3 によるマウス受精卵の雄性 DNA の水酸化が初期発生の転写制御において果たす役割

DNA の水酸化が初期発生の転写制御において果たす役割を明らかにするために、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2)。

(3)新規制御因子の同定と機能解析

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。昨年度は、この領域を人工的に脱メチル化させることに成功した。

①新規制御因子の同定

昨年度に成功した人工的な脱メチル化について、その責任分子として HDAC1-3 を同定した(図3)。

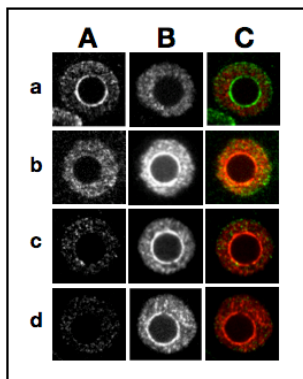


図3 | 脱メチル化防御の責任分子の同定. (A) メチル化 DNA、(B) 水酸化したメチル化 DNA、(C) メチル化 DNA: 緑、水酸化したメチル化 DNA: 赤、(a) コントロール、(b-d) 各 HDAC 特異的阻害剤処理.

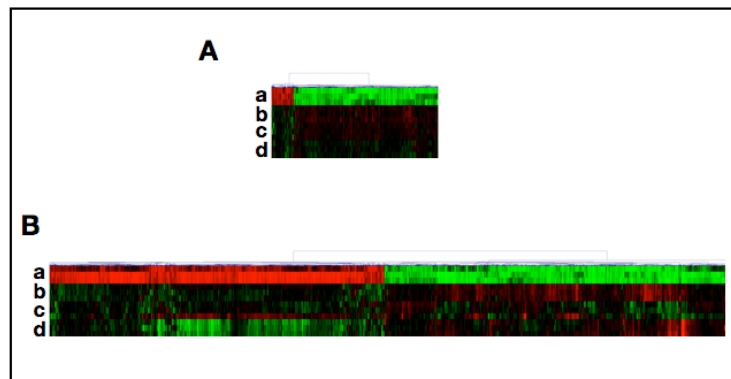


図4 | DNA 水酸化により発現に影響を受ける遺伝子の同定. (A) 1 細胞期胚、(B) 2 細胞期胚における、(a) コントロール、(b) HDAC 阻害剤 TSA 処理、(c) HDAC 阻害剤 MGCD 処理、(d) HDAC 阻害剤 Apicidin 処理. 緑:発現の減少、赤:発現の増加を示す.

②HDAC1-3 機能欠損受精卵の作製

HDAC1-3 の卵母細胞特異的なノックアウトマウスの作製を完了し、その機能欠損受精卵の使用が可能となった。

③HDAC1-3 による DNA の水酸化制御が初期発生の転写において果たす役割

HDAC1-3 による DNA の水酸化制御が初期発生の転写において果たす役割を明らかにするために、HDAC1-3 の特異的阻害剤処理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4)。

3. 研究発表等

雑誌論文 計0件	(掲載済みー査読有り) 計0件  (掲載済みー査読無し) 計0件  (未掲載) 計0件
会議発表 計3件	<p>専門家向け 計2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</p> <p>さきがけ「エピジェネティクスの制御と生命機能」領域 第一期生研究成果報告会 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</p> <p>一般向け 計1件 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>
図書 計0件	
産業財産権 出願・取得状況 計0件	(取得済み) 計0件  (出願中) 計0件
Webページ (URL)	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>
国民との科学・技術対話の実施状況	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  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。
新聞・一般雑誌等掲載 計0件	

様式19 別紙1

その他	
-----	--

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

## 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	45,600,000	22,800,000	0
間接経費	35,100,000	14,580,000	13,680,000	6,840,000	0
合計	152,100,000	63,180,000	59,280,000	29,640,000	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	-212,768	45,600,000	0	45,387,232	48,175,862	-2,788,630	0
間接経費	37,049	13,680,000	0	13,717,049	6,749,549	6,967,500	0
合計	-175,719	59,280,000	0	59,104,281	54,925,411	4,178,870	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	16,879,170	試薬、抗体、マウス 等
旅費	1,021,530	国内旅費
謝金・人件費等	7,083,462	人件費 等
その他	23,191,700	クローン作製、リース代 等
直接経費計	48,175,862	
間接経費計	6,749,549	
合計	54,925,411	

## 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
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
バイオ・ラッドラボラトリー 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