[シンポジウム 1 エピジェネティクスと RNA ワールド]

DNA メチル化による胚発生エピジェネティクス制御

岡 野 正 樹

SUMMARY

DNA methylation plays important roles in repressing gene expression and transmitting the silenced state to daughter cells. During embryogenesis, DNA methylation of the mammalian genome is dynamically regulated in stage-, sequence- and lineage-dependent manners. Loss of DNA methylation by inactivation of DNA methyltransferase genes resulted in developmental arrest in mice. These observations suggest that DNA methylation controls developmental gene regulation during embryogenesis, but its regulatory mechanisms remain largely unclear. Here we show that CpG islands associated with the X-linked homeobox gene cluster *Rhox*, which is highly expressed in the extraembryonic trophoderm, are differentially methylated in a stage- and lineage-specific manner during the post-implantation development of mice. Inactivation of both *Dnmt3a* and *Dnmt3b*, DNA methyltransferases essential for the initiation of *de novo* DNA methylation, abolished the establishment of DNA methylation and the silencing of *Rhox* cluster genes in the embryo proper. The *Dnmt3*-dependent CpG island methylation at the *Rhox* locus extended for a large genomic region (about 1 Mb) containing the *Rhox* cluster and its surrounding genes. Complementation experiments using ES cells deficient in the DNA methyltransferases suggested that the regulation of *Dnmt3a* and *Dnmt3b* was restricted within this large genomic region, and did not affect the neighboring genes outside it, implicating the existence of region-specific boundaries. Our results suggest that DNA methylation plays important roles in both long-range gene silencing and lineage-specific silencing in embryogenesis.

Key words: *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Rhox*.

はじめに

DNA メチル化は、主に抑制的な遺伝子発現プログラムを細胞分裂後の娘細胞に伝えるエピジェネティクス制御機構である¹⁾。哺乳類胚発生過程において、胚を構成する種々の細胞ゲノムの DNA メチル化は、時間的・空間的に変化し、その結果、組織・細胞種特異的な DNA メチル化プロファイルが形成される²⁾。この特異的なゲノム DNA メチル化プロファイルは、様々な作用機序・クロストークを介して、広範な生理／病理現象に大きな役割あるいは影響をもつ^{3,4)}。

哺乳類初期胚発生においてゲノム DNA メチル化は動的

に制御される^{2,3)}。受精直後から胞胚期にかけて起こるゲノム全体のメチル化低下と、胞胚の子宮着床から原腸胚・器官形成にかけて起こる *de novo* メチル化によって、胚の基本的なゲノム配列特異のおよび組織特異的な DNA メチル化プロファイルが形成されると考えられている。主に反復配列における DNA メチル化変化の研究から、将来の胚・成体を形成する内部細胞塊／エピブラスト系列では、ゲノム全体が高度にメチル化され、胎盤・羊膜など胚体外組織を形成する栄養外胚葉や原始内胚葉系列では、ゲノム全体のメチル化は比較的低いレベルである。これらの胚発生に伴う動的な DNA メチル化プロファイル変化は、平行して進行する核内構造や DNA クロマチン修飾の動的変化と

Epigenetic regulation by DNA methylation during mammalian embryogenesis.

Masaki Okano; 独立行政法人理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 哺乳類エピジェネティクス研究チーム

Correspondence address: Masaki Okano; Laboratory for Mammalian Epigenetic Studies, Center for Developmental Biology, RIKEN, 2-2-3 Minatojima-Minamimachi, Chuo-ku, Kobe 650-0047, Japan.

略号一覧: *Dnmt*, DNA methyltransferase; *Rhox*, reproductive homeobox on the X chromosome.

第 57 回日本電気泳動学会総会

(受付 2007 年 3 月 7 日, 受理 2007 年 8 月 10 日, 刊行 2007 年 9 月 15 日)

Fig. 1. Structures of Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b.

PCNA, Proliferating Cell Nuclear Antigen-binding domain; RFT, Replication Foci Targeting domain; CXXC, CXXC domain; BAH, Bromo-Adjacent Homology domain; PWWP, PWWP domain; PHD, Plant Homeobox Domain.

もに核再プログラム化現象と呼ばれる。核再プログラム化は細胞の多能性を規定するのではないかと想定されているが、その機能や作用機序の多くは不明のままである。

哺乳類ゲノムの DNA メチル化プロファイルは、互いに異なる特性をもつ DNA メチル化酵素 Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b によって形成・維持される (Fig. 1)⁵⁾。Dnmt1 は、ヘミメチル化 DNA に対して高い酵素活性を示し、S 期特異的に DNA 複製部位に局在する。Dnmt1 を欠損したマウス細胞ではゲノム全体にわたり、ほぼ無差別に DNA メチル化が低下する⁶⁾。これらの知見から、Dnmt1 は DNA 複製と協調して DNA メチル化プロファイルを娘細胞に伝える機能 (メチル化維持) をもつと考えられている。Dnmt1 機能を欠損させたマウスおよびアフリカツメガエルでは胚発生が停止することから、DNA メチル化は胚発生の正常な進行に必須であることが示唆される^{6,7)}。Dnmt3a および Dnmt3b は互いに相同な DNA メチル化酵素であり、発生特異的に発現が調節される。Dnmt3a/Dnmt3b 両欠損マウスおよび変異 ES 細胞の解析結果から、Dnmt3a および Dnmt3b は、ES 細胞における de novo メチル化の開始、着床胚における高メチル化ゲノムの確立や生殖細胞におけるインプリント遺伝子のメチル化確立など、種々の DNA メチル化動的变化過程に必須であることが明らかになっている^{8,9)}。Dnmt3a 欠損マウスは離乳期致死、Dnmt3b 欠損マウスは後期胚発生致死、Dnmt3a/Dnmt3b 両欠損マウス胚は着床後まもなく致死となることから、DNA メチル化動的变化がマウス胚発生および恒常性維持に重要な役割を果たすことが示唆される^{8,10)}。

これらのノックアウトマウスの結果は、Dnmt3a と Dnmt3b の機能重複を示すと同時に、それぞれの酵素の機能分担も示唆する。既に、マウス生殖細胞におけるインプリント遺伝子のメチル化には Dnmt3a が主要な役割を果たし、マウス ES 細胞におけるサテライト反復配列のメチル化には Dnmt3b の寄与がおおきいことがわかっている。Dnmt3a と Dnmt3b の酵素活性ドメインはアミノ酸一次配列上、互いに高い相同性をもっている。しかし、立体構造予測から予想される

表面電荷の分布は両者で大きく異なる。実際、DNA 基質に対するプロセシビティなど酵素学的特性の違いが示されている¹¹⁾。また、選択的スプライシングあるいは異なるプロモーター利用により、さまざまなアイソフォーム分子 (Dnmt3a, Dnmt3a2, Dnmt3b1, Dnmt3b2, Dnmt3b3, Dnmt3b6 など) が存在し、それぞれ異なる分子特性をもっている⁵⁾。今後のゲノムワイドな詳細な解析により、Dnmt3a, Dnmt3b の共通および独自の DNA メチル化標的遺伝子・配列が明確にされると予想される。

DNA メチル化による組織特異的遺伝子抑制¹²⁾

我々は、哺乳類胚発生における最初の細胞分化、内部細胞塊一栄養外胚葉分化に着目し、栄養外胚葉特異的に発現するホメオボックス遺伝子 Rhox6 (Psx1) が DNA メチル化によって調節されることを見いだした。Rhox6 のプロモーター近傍 CpG アイランドは、発現組織であるマウス胎生 9.5 日胚栄養外胚葉において低メチル化であるのに対して、非発現組織である内部細胞塊/エピプラスト由来の胚体では高度にメチル化を受けていた。胞胚 (3.5 日胚) における Rhox6 の CpG アイランドがメチル化されていないことから、Rhox6 の組織特異的メチル化は胞胚の着床後におこる de novo メチル化によって形成されることがわかった。Dnmt3a および Dnmt3b ノックアウトマウスの解析から、Rhox6 の細胞系列特異的 DNA メチル化の形成および組織特異的転写抑制には、Dnmt3a と Dnmt3b が必須であり、かつ互いに機能重複していることが明らかとなった。

DNA メチル化による遺伝子クラスター転写抑制¹²⁾

染色体上において Rhox6 遺伝子の周辺にはホメオボックス遺伝子群がクラスターを形成している (Rhox クラスター)¹³⁾。一方、Dnmt3a の生殖細胞における標的遺伝子群としてインプリント遺伝子が知られているが⁹⁾、その代表的な特徴は染色体上でクラスターを形成することである。これらのことから、Dnmt3 依存的メチル化機構が Rhox6 遺伝子単独ではなく、周辺領域全体を協調的に制御する可能性が考えられた。Rhox6 周辺の 0.7 Mb にわたる Rhox クラスター遺伝子群は、正常胚の内部細胞塊/エピプラスト由来の胚体において、遺伝子転写発現が抑制されている (Gm9, Rhox1, Rhox2, Rhox3, Rhox4, Rhox5, Rhox6, Rhox9)。ところが、これらの Rhox クラスター遺伝子群は Dnmt3a/Dnmt3b ダブルノックアウトマウス胎児において転写脱抑制されることが見いだされた。さらに、Rhox クラスターを含む約 1 Mb にわたる広範なゲノム領域内の遺伝子プロモーター CpG アイランドが、発生段階、細胞系列特異的メチル化調節を受けていること、それらの特異的メチル化が Dnmt3 に依存的であることが見いだされた。この結果は、Dnmt3a/Dnmt3b ダブルノックアウト ES 細胞に Dnmt3a 分子を強制発現させ

文 献

Fig. 2. Dnmt3-dependent long-range gene silencing of an X-linked homeobox gene cluster, *Rhox*, in a lineage-specific manner.

る実験によって、細胞レベルでも確かめられた。興味深いことに、*Rhox* クラスター周辺 1 Mb 染色体領域の外側では Dnmt3a 強制発現によるプロモーター CpG アイランドメチル化は起こらなかった。この結果は、Dnmt3a が機能する染色体領域を規定する分子機構が存在することが示唆される。以上の結果から、哺乳類胚発生における Dnmt3 依存的な *de novo* メチル化の機能の一つとして、広範なゲノム領域に集積する遺伝子群の転写発現を協調的かつ細胞系列特異的に制御することが示唆された (Fig. 2)。

まとめ

これまでの一連の研究により、Dnmt3a および Dnmt3b は胚発生におけるゲノムの DNA メチル化プロファイルを決定する中心的な制御因子のひとつであることが明らかとなった。Dnmt3 依存的な *de novo* メチル化の作用機序の解明は、胚発生における核再プログラム化の機能を明らかにするとともに、癌などの病理状態における DNA メチル化異常の作用機序解明に貢献することが期待される。

本稿で紹介した研究は、理研 CDB 哺乳類エピジェネティクス研究チームの小田昌朗博士、山際晶子氏、中山貴生氏、津村明子博士 (現 Max-Planck 研究所)、同胚誘導研究チーム佐々木洋チームリーダー、山元進司博士、同変異マウス開発チーム中尾和貴副チームリーダー、及び Novartis Institute for Biomedical Research の En Li 博士との共同で行ったものです。マウス初期胚採取および DNA 配列解析について理研 CDB 変異マウス開発チームおよびゲノム資源開発サブユニットのスタッフの方々に多大な協力をいただきました。この場を借りて御礼を申し上げます。

- 1) Klose RJ and Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 2006;31:89–97.
- 2) Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005;14 Spec No 1:R47–58.
- 3) Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2002;3:662–673.
- 4) Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004;429:457–463.
- 5) Chen T, Li E. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr Top Dev Biol* 2004;60:55–89.
- 6) Lei H, Oh SP, Okano M, Juttermann R, Goss KA, Jaenisch R, Li E. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* 1996;122:3195–3205.
- 7) Stancheva I, Meehan RR. Transient depletion of xDnmt1 leads to premature gene activation in *Xenopus* embryos. *Genes Dev* 2000;14:313–327.
- 8) Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell* 1999;99:247–257.
- 9) Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, Sasaki H. Essential role for *de novo* DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 2004;429:900–903.
- 10) Ueda Y, Okano M, Williams C, Chen T, Georgopoulos K, Li E. Roles for Dnmt3b in mammalian development: a mouse model for the ICF syndrome. *Development* 2006;133:1183–1192.
- 11) Jeltsch A. Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;301:203–225.
- 12) Oda M, Yamagiwa A, Yamamoto S, Nakayama T, Tsumura A, Sasaki H, Nakao K, Li E, Okano M. DNA methylation regulates long-range gene silencing of an X-linked homeobox gene cluster in a lineage-specific manner. *Genes Dev* 2006;20:3382–3394.
- 13) Maclean JA, 2nd, Chen MA, Wayne CM, Bruce SR, Rao M, Meistrich ML, Macleod C, Wilkinson MF. *Rhox*: a new homeobox gene cluster. *Cell* 2005;120:369–382.