

受賞者

佐藤 憲子

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・分子疫学分野

## 研究テーマ

核内受容体GCNFによる新生DNAメチル化制御機構

### 1. はじめに

哺乳動物では発生初期にゲノム全体のDNAメチル化模様の書き換えがおこる。しかし、一旦メチル化の情報が消去された後に、どのようにして新たにメチル化されるべき場所が決定されるのか、その機構は明らかにされていない。ここで、体細胞ゲノムのメチル化CpGの大部分は、セントロメアヘテロクロマチン、レトロトランスポゾン由来の反復配列や偽遺伝子領域に検出され、全般的にはDNAメチル化模様と塩基配列コンテキストとの関係は希薄と報告されている<sup>1</sup>。しかし、これは(メチル化CpG全体のうちに占める割合としては少ない)遺伝子領域におけるCpGのメチル化制御が塩基配列コンテキストに依存することを否定するものではない。実際にCooneyらは、オーファン核内受容体GCNF (Germ cell nuclear factor)の欠損マウスを作製し、GCNFがpluripotency遺伝子のOct4の転写抑制因子であることを示しただけでなく、GCNF欠損ES細胞においては、分化によって通常誘導されるOct4プロモーター領域のDNAメチル化が誘導されないことを示した<sup>2,3</sup>。一方、我々は、強制発現系を用いた免疫沈降実験によってGCNFタンパク質が新生DNAメチル化酵素であるDnmt3a/bタンパク質と相互作用することを示し、GCNFはDnmt3a/bをクロマチンに動員する因子の一つではないかと考えた<sup>4</sup>。

本研究の目的はGCNFに対する特異的モノクローナル抗体を作製し、その抗GCNF抗体を用いて内因性GCNFタンパク質がDnmt3a/bのどのアイソフォームと相互作用するのかを明らかにすること、さらに、GCNFによるDNAメチル化誘導機構をより明らかにするためにGCNFと相互作用する他のタンパク質を同定することである。

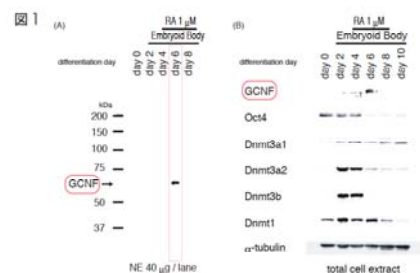
### 2. 方法

内因性GCNFタンパク質を解析する際には、マウスES細胞を胚様体形成により分化させた。多くの研究では細胞を単一にした後にLIFを除去しレチノイン酸を添加して単層培養にてES細胞を分化させているが、この方法では、主に原始内胚葉(胚体外組織)に分化する<sup>5</sup>。我々はBainの方法<sup>6</sup>に準じ、LIF非存在下で浮遊培養して胚様体を形成させ4日目から4日間 1  $\mu$ Mレチノイン酸を添加した。この系では、外層に原始内胚葉が分化するが、内側では細胞は神経系を始めとした三胚葉の細胞へ分化する。

### 3. 結果

(1)内因性GCNFタンパク質とDnmt3各アイソフォームとの相互作用について

上記に述べたES細胞の分化条件では、分化誘導後6日目にGCNFタンパク質の発現はピークとなる(図1A)。一方、Dnmt3a2とDnmt3bが分化誘導後2から4日目にかけて高い発現を示すが、6日目以降ではDnmt3a1が主に発現するアイソフォームとなる(図1B)。次に抗GCNF抗体を用いた免疫沈降を行い、Dnmt3各アイソフォームに対するWestern blotを行ったところ、分化誘導4日目にはGCNFは主にDnmt3a2、Dnmt3bと相互作用し、分化誘導6日目には主にDnmt3a1と相互作用することがわかった(図2)。



(2) GCNFタンパク質と相互作用するタンパク質について

ES細胞の分化誘導6日目の細胞抽出液、核抽出液あるいは、FLAGタグGCNFとDnmt3a1を発現させたHEK293細胞の安定形質変換細胞株の核抽出液を用いて3種類の抗GCNF抗体による免疫沈降を行い、その免疫沈降物に含まれるタンパク質をMSショットガン法により解析した。その結果ES細胞及びHEK293細胞の両方で複数の抗GCNF抗体に共通してTrim28タンパク質が同定された。そこで、COS7細胞にFLAGタグTrim28とタグのないGCNFを発現させて抗GCNF抗体による免疫沈降をおこなったところ、免疫沈降物にFLAG-Trim28が検出された(図3)。

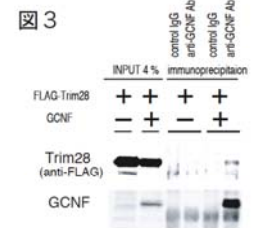
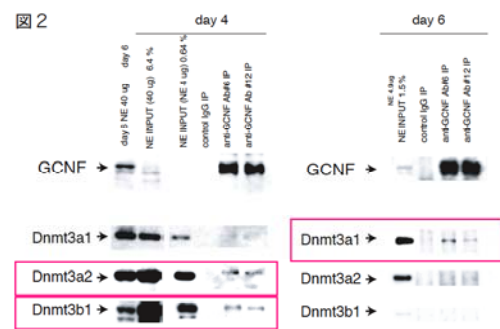
#### 4. 考察 まとめ

GCNFとDnmt3a/bは胚性細胞の分化過程で以下のように二段階の相互作用様式をとると考えられる。分化初期にはGCNFの発現レベルは低く、Oct4の転写活性も維持されている。Oct4自身が制御するmi R 290 clusterはRbl2の発現を抑制することによりDnmt3a2/bの発現を正に制御する<sup>7,8</sup>。GCNFは量は少ないがDnmt3a2/bと結合し、Oct4の発現レベルを微細に制御する。分化が進行するとGCNFの発現が上昇し、Oct4、miR 290、Dnmt3a2/bの発現が低下する。GCNFはmiR290の制御下にはないDnmt3a1と結合し、Oct4プロモーターDNAメチル化を加速させる。実際に調べたOct4プロモーターDNAメチル化の時間的タイミングはこの考えと矛盾しない<sup>4</sup>。

今回GCNFとTrim28との相互作用が新規に見いだされた。Trim28のHP1 binding domainがOct4の発現調節に関与することが示唆されている<sup>9</sup>。また、Trim28が発生初期の新生DNAメチル化に関与していることも報告されている<sup>10</sup>。今後GCNFとTrim28との機能的関連を明らかにしたい。

#### 5. 参考文献

- 1) Meissner, A. *et al.* "Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells." *Nature*. 2008; 454(7205): 766-70.
- 2) Fuhrmann, G. *et al.* "Mouse germline restriction of Oct4 expression by germ cell nuclear factor." *Dev Cell*. 2001:377-87.
- 3) Gu, P. *et al.* "Differential recruitment of methylated CpG binding domains by the orphan receptor GCNF initiates the repression and silencing of Oct4 expression." *Mol Cell Biol*. 2006; 26(24): 9471-83.
- 4) Sato, N. *et al.* "The orphan nuclear receptor GCNF recruits DNA methyltransferase for Oct-3/4 silencing." *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 344(3): 845-51.
- 5) Capocchichi, CD. *et al.* "Perception of differentiation cues by GATA factors in primitive endoderm lineage determination of mouse embryonic stem cells." *Dev Biol*. 2005; 286(2): 574-86.
- 6) Bain, G. *et al.* "Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro." *Dev Biol*. 1995; 168(2):342-57.
- 7) Marson, A. *et al.* "Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells." *Cell*. 2008; 134(3):521-33.
- 8) Sinkkonen, L. *et al.* "MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional



repressors in mouse embryonic stem cells.” *Nat Struct Mol Biol.* 2008 ;15(3):259–67.

9) Cammas, F. *et al.* “Association of the transcriptional corepressor TIF1beta with heterochromatin protein 1 (HP1): an essential role for progression through differentiation.” *Genes Dev.* 2004;18(17):2147–60.

10) Wiznerowicz, M. *et al.* “The Kruppel-associated box repressor domain can trigger de novo promoter methylation during mouse early embryogenesis.” *J Biol Chem.* 2007;282(47):34535–41.