

DNA メチル化酵素 DNMT3A および DNMT3B の特異的機能の発見 ー哺乳類の発生過程やがん発症のメカニズム解明に貢献ー

1. 発表者：

山田 泰広（東京大学医科学研究所 システム疾患モデル研究センター 先進病態モデル研究分野教授）

山本 拓也（京都大学 iPS 細胞研究所（CiRA）未来生命科学開拓部門/京都大学高等研究院ヒト生物学高等研究拠点（ASHBi）准教授）

八木 正樹（ハーバード大学 リサーチフェロー、元東京大学医科学研究所 システム疾患モデル研究センター 先進病態モデル研究分野 助教）

蒲田 未央（京都大学 iPS 細胞研究所（CiRA）未来生命科学開拓部門 特定職員）

2. 研究のポイント：

- ◆DNA メチル化（注 1）の異常は、がん発症の原因に大きくかかわっている。研究グループは、DNA 低メチル化 ES 細胞（注 2）を用いた実験により、世界で初めて DNA メチル化酵素 DNMT3A と DNMT3B（注 3）の特異的標的部位の同定に成功し、哺乳類の発生過程での DNA メチル化制御機構の一端を明らかにした。
- ◆DNMT3A は分化関連遺伝子を、DNMT3B は X 染色体遺伝子を特異的にメチル化することを明らかにした。また *DNMT3* 遺伝子に変異を有するがん・疾患に特徴的な DNA メチル化異常部位を同定した。
- ◆本研究成果により、DNA メチル化異常を有するがん・疾患の発症メカニズムがより詳細に解明され、同種のがんに対する新規治療戦略の確立に貢献することが期待される。

3. 研究概要：

DNA のメチル化は哺乳類の個体発生に必須であり、その異常は白血病などのがん発症の原因となることが知られています。八木正樹 研究員（ハーバード大学、元東京大学医科学研究所）、蒲田未央 特定職員（京都大学 iPS 細胞研究所（CiRA））、山本拓也 准教授（京都大学 iPS 細胞研究所（CiRA）、同高等研究院ヒト生物学高等研究拠点（ASHBi））、山田泰広 教授（東京大学医科学研究所）らの研究グループは、多能性幹細胞（注 4）における遺伝子破壊技術と網羅的な DNA メチル化解析技術を組み合わせることにより、DNA メチル化酵素である DNMT3A と DNMT3B の特異的な標的部位の同定に世界で初めて成功しました。また個体発生過程において、DNMT3A は分化関連遺伝子を、DNMT3B は X 染色体遺伝子を特異的に制御していることが分かりました。

さらに本研究で同定した DNMT3 の特異的標的遺伝子は、*DNMT3* 遺伝子に変異を持つがんや疾患においてもメチル化に異常があることが分かりました。本研究成果は、哺乳類の発生過

程での DNA メチル化制御機構の一端の解明に繋がり、さらには DNA メチル化異常を有するがん・疾患の発症メカニズムの解明や新規治療戦略の確立に貢献できる可能性があります。

4. 研究内容：

遺伝子発現調節を司る DNA メチル化によるエピゲノム制御（注 5）は、細胞分化や個体発生など様々な生命現象に重要であり、エピゲノム制御の破綻はがん・疾患の発症に関与することが報告されています。また以前、山田泰広教授らの研究グループは、DNA メチル化が多能性幹細胞の品質維持に重要であることを示しています（Yagi et al., *Nature* 2017, Yagi et al., *Stem Cell Reports* 2019）。

哺乳類発生において DNA メチル化は、着床前に大部分が消去され、着床後の分化過程で DNA メチル化酵素 DNMT3A と DNMT3B によって獲得されます。DNMT3A、DNMT3B のノックアウトマウス（注 6）はそれぞれ早期致死であることから、DNA メチル化酵素は哺乳類個体の発生に必須であることが示唆されていました。しかし、これまでに DNMT3A と DNMT3B の機能の違いは分かっていませんでした。そこで、本研究では、DNMT3A と DNMT3B の標的遺伝子の違いを探索することで、DNA メチル化による発生メカニズムの解明、さらには DNA メチル化異常によるがん・疾患の発症機構を明らかにすることを目指しました。

これまでに、山田泰広教授らの研究グループは、ゲノム情報は正常であるものの大部分が DNA メチル化されていないマウス ES 細胞の樹立方法を見出していました（Yagi et al., *Nature* 2017）が、今回、この DNA 低メチル化 ES 細胞を用いて、生体内（*In vivo*）の発生で起こる DNA メチル化獲得プロセスを試験管内（*In vitro*）の分化過程で再現しました。遺伝子破壊技術と DNA メチル化解析を組み合わせることで、発生過程における DNMT3A と DNMT3B の特異的標的部位の同定が可能になると仮定し、研究を行いました。独自に樹立したこの ES 細胞から、DNMT3A と DNMT3B の欠損株を作製し、分化誘導後の体細胞の DNA メチル化状態を網羅的に調べました（図 1）。

その結果、DNMT3A と DNMT3B の特異的標的部位を同定することに成功しました。DNMT3A は分化関連遺伝子を、DNMT3B は X 染色体遺伝子を特異的にメチル化するという、より詳細な仕組みを突き止めることにも成功しました。野生型、DNMT3A 欠損、DNMT3B 欠損の状態の遺伝子において、それぞれの体細胞における DNA メチル化の状態を比較解析したところ、これまでの報告と同様、多くの遺伝子は DNMT3A、DNMT3B 両方によって制御されました。一方で、発生に重要な分化関連遺伝子（注 7：例: *Hox*, *Tbx*, *Cbx*, *Fox* 遺伝子群など）は DNMT3A によって、X 染色体遺伝子（注 8）は DNMT3B によって特異的にメチル化の制御を受けることが分かりました（図 2）。また、DNMT3A、DNMT3B の DNA 上への結合能力の違いがそれら遺伝子の機能の違いを生み出すことを発見しました。

加えて本研究では、DNMT3 変異を有するがん・疾患に特徴的な新規 DNA メチル化異常の詳細な仕組みも明らかにすることができました。がんや疾患において、しばしば DNA メチル化異常が報告されています。本研究で同定した DNMT3 により特異的に DNA メチル化を受ける遺伝子に着目し、DNMT3 変異を有するがんや疾患の DNA メチル化状態を詳細に解析しました。その結果、DNMT3A の機能欠損変異を有する AML（急性骨髄性白血病）患者、DNMT3B の機能欠損変異を有する ICF 症候群（immunodeficiency - centromeric instability - facial anomalies syndrome, 注 9）患者において、DNMT3 によって特異的に DNA メチル化を受ける遺伝子のメチル化レベルは、変異のない同患者と比して有意に低いことが分かりました。これによって、

DNMT3 変異を有するがん・疾患における新規の DNA メチル化異常の部位を同定することができました (図 3)。

結論として、本研究では、DNA 低メチル化 ES 細胞を用いることで、これまで不明であった哺乳類の発生過程での *DNMT3A* と *DNMT3B* の標的遺伝子の同定に、世界で初めて成功しました。*DNMT3A* は発生に重要な多くの分化関連遺伝子を、*DNMT3B* は X 染色体遺伝子を特異的にメチル化していることが明らかとなり、*DNMT3* 遺伝子は発生や X 染色体不活化 (注 10) の制御に重要な役割を果たすことが示唆されました (図 4)。

DNMT3 変異を有するがん・疾患に特徴的な DNA メチル化異常を発見した本研究成果は、DNA メチル化による哺乳類発生メカニズムの一端の解明に繋がり、DNA メチル化異常によるがん・疾患の発症メカニズムの解明や新たな治療法開発にも貢献できることが期待されます。

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の革新的先端研究開発支援事業 (AMED-CREST) 「全ライフコースを対象とした個体の機能低下機構の解明」、次世代がん医療創生研究事業 (P-CREATE)、および日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費助成事業の研究助成により実施しました。

5. 発表雑誌 :

雑誌名 : *Nature Communications* (6 月 24 日オンライン版)

論文タイトル : Identification of distinct loci for *de novo* DNA methylation by *DNMT3A* and *DNMT3B* during mammalian development

著者 : Masaki Yagi[#], Mio Kabata[#], Akito Tanaka, Tomoyo Ukai, Sho Ohta, Kazuhiko Nakabayashi, Masahito Shimizu, Kenichiro Hata, Alexander Meissner, Takuya Yamamoto*, Yasuhiro Yamada* ([#]:共同第一著者、*:共同責任著者)

DOI 番号 : 10.1038/s41467-020-16989-w

6. 用語解説 :

(注 1) DNA メチル化

DNA の中の主に CG 配列の部分においてメチル基が付加される化学反応。メチル基が付加される CG 配列は細胞の種類によって異なり、遺伝子の発現量と相関する。哺乳類の個体発生に必須で、その異常は白血病などのがん発生の原因となることが知られている。

(注 2) DNA 低メチル化 ES 細胞

DNA メチル化をほとんど持たない胚性幹細胞 (ES 細胞)。通常、ES 細胞の DNA は高度にメチル化されている。研究グループは、特殊な化合物の存在下で樹立した ES 細胞は大部分の DNA メチル化を失っていることを見出している (Yagi et al., *Nature* 2017)。

(注 3) DNA メチル化酵素 *DNMT3A*、*DNMT3B*

DNA にメチル基を付加する酵素のことを指し、*DNMT3A* と *DNMT3B* が代表的なメチル化酵素として知られている。

(注 4) 多能性幹細胞

ほぼ無限に増殖することができ、様々な細胞へと分化する能力を有する細胞を指す。代表的な多能性幹細胞として、iPS細胞（人工多能性幹細胞）やES細胞（胚性幹細胞）が挙げられる。

(注5) エピゲノム制御

DNAの塩基配列の変化を伴わずに、遺伝子発現を制御する機構であり、発生に重要な役割を果たす。DNAメチル化やヒストン修飾は代表的なエピゲノム制御として知られている。

(注6) ノックアウトマウス

全身の細胞で特定の遺伝子の機能を破壊したマウス。

(注7) 分化関連遺伝子

発生に重要な役割を果たす転写因子（遺伝子）を指し、主にDNAメチル化とヒストン修飾により発現制御を受ける。

(注8) X染色体遺伝子

哺乳類の性染色体の一つであるX染色体上の遺伝子を指す。

(注9) ICF症候群（immunodeficiency - centromeric instability - facial anomalies syndrome）

免疫不全や顔貌異常を伴う先天性疾患でDNAメチル化酵素DNMT3Bに遺伝子変異がみられる。

(注10) X染色体不活化

雄では1本、雌では2本のX染色体が存在する。X染色体遺伝子の発現量を雌雄間で等価にするために、雌のX染色体の2本のうち1本が着床後に不活化される現象を指す。

7. 参考文献

Yagi M, Kishigami S, Tanaka A, Semi K, Mizutani E, Wakayama S, Wakayama T, *Yamamoto T, *Yamada Y. Derivation of ground-state female ES cells maintaining gamete-derived DNA methylation. *Nature*. 2017 Aug 10;548(7666):224-227.

Yagi M, Kabata M, Ukai T, Ohta S, Tanaka A, Shimada Y, Sugimoto M, Araki K, Okita K, Woltjen K, Hochedlinger K, *Yamamoto T, *Yamada Y. De novo DNA methylation at imprinted loci during reprogramming into naive and primed pluripotency. *Stem Cell Reports*. 2019 May 14;12(5):1113-1128. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.04.008

8. 添付資料：

図1. DNMT3AとDNMT3Bの特異的標的部位同定のためのアプローチ

DNMT3AとDNMT3BはDNAにメチル基を付加する酵素

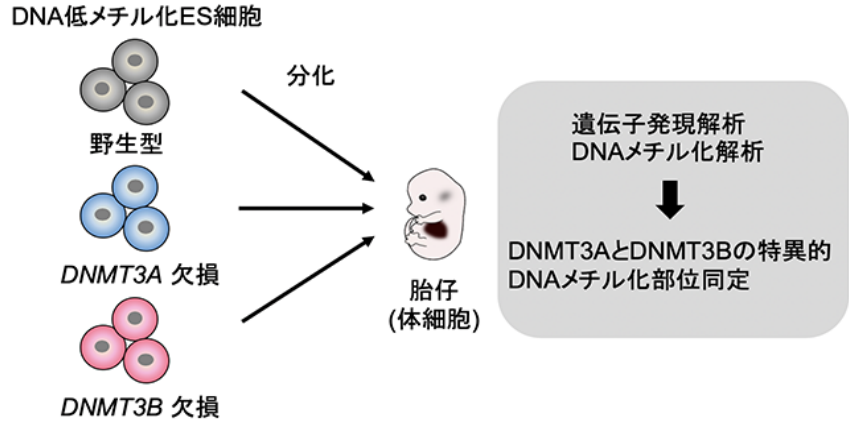
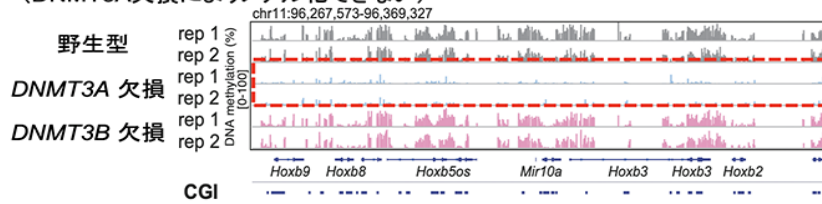


図2. DNMT3AとDNMT3Bの特異的標的遺伝子の例

DNMT3AはHox遺伝子群を特異的にメチル化する
(DNMT3A欠損によりメチル化できない)



DNMT3BはX染色体遺伝子群を特異的にメチル化する
(DNMT3B欠損によりメチル化できない)

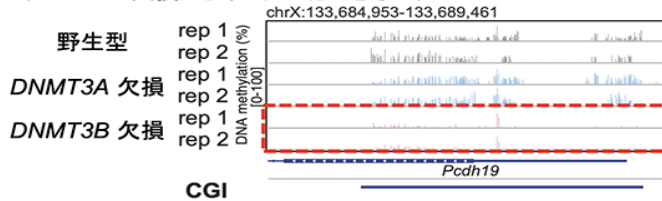


図3. DNMT3変異を有するがん・疾患の新規DNAメチル化異常の例

DNMT3Aに変異を持つAML(白血病)での解析
 HOXB3とMEIS1はDNMT3AによりDNAメチル化される遺伝子

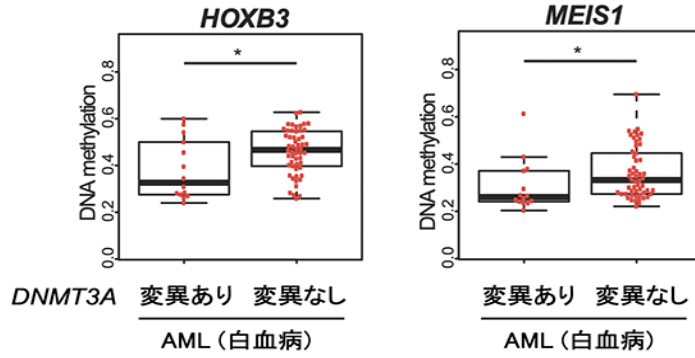


図4. 本研究のまとめ ~ DNMT3AとDNMT3Bの特異的制御遺伝子の同定~

