

令和4(2022)年度

東邦大学理学研究科生物学専攻

博士前期課程 修士学位論文

Effects of chromatin relaxation on the induction of
de novo DNA methylation in mouse embryonic stem cells

マウス ES 細胞における
新規 DNA メチル化誘導にもたらすクロマチン緩和の効果

6221008 相馬 公貴

幹細胞リプログラミング研究室

指導教員：山口 新平

目次

要旨	3
序論	5
結果	8
考察	10
材料・方法	13
謝辞	16
参考文献	17
図 1-9	20

要旨

DNA シトシンのメチル化 (5mC) は、哺乳類の胚発生制御に必須なエピジェネティクスの一つで、主に *de novo* 型の DNMT3A と DNMT3B、維持型の DNMT1 が担っている。近年、DNMT1 の *de novo* 型メチル化活性が注目されているが、胚発生制御における生理的機能については未だ不明である。DNMT1 は無細胞系では未修飾の DNA をメチル化できるが、ヒストンとヌクレオソーム構造をとった DNA に対しては作用できない。ヌクレオソームが開いたリンカーDNA 領域には接近できることから、DNMT1 が *de novo* メチル化活性を示すには DNA への接近性を制御することが必要だと予想される。

本研究室の先行研究では、*Dnmt1/3a/3b* の三重欠損 (Triple Knock Out: TKO) のマウス多能性幹細胞 (ESCs) に DNMT1 全長 (Full length: FL) を発現させた TKO+FL ESCs をエピプラスト様細胞に分化誘導し、さらに原腸陥入誘導に働く Activin A を添加したところ、5mC とその酸化体であるヒドロキシメチルシトシン (5hmC) がゲノムワイドに増加することを見出した。これは、細胞分化シグナルの活性化によってクロマチンが緩和し、DNMT1 が未修飾 DNA へ接近可能となって *de novo* メチル化活性を発揮したことを示唆している。Activin A は遅延型の WNT/ β -カテニンシグナル経路を活性化することから、DNMT1 の *de novo* メチル化活性は WNT シグナル経路の活性化が直接誘導しているのではないかと考えた。

そこで本研究では、マウス TKO+FL ESCs を *in vitro* 分化誘導し、その過程で Wnt3a を加えることで WNT シグナルを活性化し、それが 5mC と 5hmC レベルに与える影響を解析した。しかし、蛍光免疫染色および dot blot 解析の結果、Wnt3a を添加しても DNMT1 によるゲノムワイドな *de novo* メチル化活性は確認できなかった。

先行研究では、TKO ESCs で原始内胚葉 (PrE) 分化制御遺伝子の発現が亢進しているが、TKO+FL ESCs では DNMT1 の *de novo* メチル化活性が機能してその発現が抑制されていることを見出している。PrE 分化は WNT/ β カテニンシグナルにより活性化されることも分かっている。これらの知見を総合すると、DNMT1 の *de novo* DNA メチル化標的領域は、一種類のシグナル経路によって制御されているのではなく、複数種類のシグナルによってダイナミックに制御されていると考えられる。DNMT1 の *de novo* メチル化によって付加される DNA メチル化は、それらの遺伝子の発現を抑制する機能を通じて、DNMT3 群の酵素とともに初期胚発生制御に寄与している可能性がある。

Abstract

Methylated DNA cytosine (5mC) is an essential epigenetic regulator of mammalian embryogenesis, established mainly by the *de novo*-type enzymes DNMT3A and DNMT3B and the maintenance-type enzyme DNMT1. Recently, the *de novo* methylation activity of DNMT1 has attracted attention, but its physiological function in the regulation of embryogenesis remains unclear. DNMT1 can methylate unmodified DNA in cell-free systems but cannot act on nucleosome-structured DNA wrapped around histones. Since DNMT1 is only accessible to linker DNA between nucleosomes, it is expected that DNMT1's *de novo* methylation activity would require control of its accessibility to DNA.

In a previous study from this laboratory, it was found that the full length (FL) of DNMT1 forcibly expressed in *Dnmt1/3a/3b* triple knockout mouse pluripotent stem cells (TKO+FL ESCs) can induce a genome-wide increase in 5mC and its oxidised form, 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), when cells were differentiated into epiblast-like cells and treated with Activin A. This suggests that the activation of cell differentiation signalling led to chromatin relaxation, allowing DNMT1 to access unmodified DNA for *de novo* methylation. Since Activin A has the property of activating the delayed WNT/ β -catenin signalling pathway, it was hypothesised that the WNT signalling pathway could directly activate the *de novo* methylation activity of DNMT1. Therefore, it became necessary to investigate the possibility that WNT signalling directly increases DNMT1-mediated DNA methylation activity.

In the present study, therefore, mouse TKO+FL ESCs were induced to differentiate *in vitro*, and Wnt3a was added to the cell culture medium to analyse the effect of WNT signalling activation on 5mC and 5hmC levels using immunofluorescent staining and dot blotting. However, activation of the WNT signalling pathway did not promote genome-wide *de novo* methylation by DNMT1.

Previous studies in this laboratory have shown that the expression of genes controlling primitive endoderm (PrE) differentiation induced by WNT/ β -catenin signalling is upregulated in TKO ESCs and repressed by the *de novo* methylation activity of DNMT1 in TKO+FL ESCs. Thus, it is suggested that the *de novo* DNA methylation region of DNMT1 is not regulated by a single signalling pathway but may be dynamically regulated to methylate diverse targets by multiple signalling pathways that are progressively activated during embryogenesis by DNMT1. Once DNA methylation is added by DNMT1, DNA methylation selectively established by its maintenance DNA methylation activity may contribute to the regulation of early embryonic development together with DNMT3 family enzymes by its repressive function on gene expression.

序論

DNA シトシンのメチル化 (5-methylcytosine, 5mC) は、哺乳類の正確な胚発生制御に重要である。その修飾を主に *de novo* 型の DNMT3A と DNMT3B、維持型の DNMT1 が担うことは、DNMT3A と DNMT3B の二重欠損 (double knockout, DKO) 胚や DNMT1 の欠損 (1KO) 胚が致死となることから明らかである (Li et al., 1992; Okano et al., 1999)。近年、DNMT1 の *de novo* メチル化活性が DKO 胚や DNMT1 のみを含むマウス多能性幹細胞 (embryonic stem cells, ESCs) で明らかになったが、その胚発生制御における生理的機能については未だ不明なままである (Haggerty et al., 2021)。

DNA メチル化レベルは、*Dnmt1/3a/3b* 遺伝子発現レベルやターゲット領域の DNA に DNMT1/3A/3B 酵素を誘導する補助因子による制御を受ける。特に、酵素活性ドメインを欠く DNMT3L は、DNMT3A と DNMT3B を安定化してメチル化レベルを増加させ、DNA メチル化レベルを増加させる (Suetake et al., 2004)。また、DNMT3L は DNMT3A とヘテロダイマーを形成し、領域特異的メチル化を制御できる (Chedin et al., 2002; Veland et al., 2019)。一方、DNMT1 の維持メチル化活性は、主に、その N 末端の RFTS ドメインに結合する UHRF1 によって制御されている (Li et al., 2018)。UHRF1 は S 期の複製開始点やヒストン H3 の 9 番目のメチル化リジンとの直接的・間接的に結合することで DNMT1 が DNA への接近性を媒介する (Nishiyama et al., 2020)。DNMT1 は、無細胞系では無修飾の裸の DNA を容易にメチル化できるが、人工的にジヌクレオソーム構造を構築させた DNA に対しては作用できず、20 bp 以上の間隔を空けたリンカー領域の DNA には接近できる (Gross et al., 2015)。よって、DNMT1 によるヘテロクロマチン領域の維持メチル化制御は UHRF1 の特性で理解することが可能であるが、DNMT1 が無修飾の CpG 配列のシトシン (cytosine, C) へ接近して *de novo* メチル化活性を示すためにはターゲット領域のクロマチン構造の制御が欠かせないと予想されるが、その修飾が胚発生に与えるインパクトなどはほとんど明らかになっていない。

本研究室の先行研究では、*Dnmt1/Dnmt3a/Dnmt3b* を三重欠損した ESCs (TKO ESCs) と *Dnmt1* のアミノ酸のコード領域全長を TKO ESCs で強制発現させた TKO+FL ESCs を用いて、DNMT1 は未分化状態では領域特異的、中内胚葉分化過程でゲノムを広範に *de novo* メチル化できることを見いだした (Ito et al., in preparation)。TKO ESCs の核移植クローン胚は、胚体の三胚葉や始原生殖細胞へと分化する多能性細胞であるエピプラスト (epiblast) に分化できないが栄養外胚葉 (trophectoderm, TE) や原始内胚葉 (primitive endoderm, PrE) への分化は可能である (Sakaue et al., 2010)。また、*in vitro* 分化誘導でも、TKO ESCs はエピプラスト様細胞 (epiblast-like cells, EpiLCs) に分化できない (Hayakawa et al., 2006)。よって、DNMT1 の導入によって TKO+FL ESCs が分化能を再獲得できた本研究室の先行研究結果は、とりもなおさず、DNMT1 に分化制御可能な *de novo* DNA メチル化活性を持つことを示している。事実、全ゲノムバイサルファイトシーケンス (Whole Genome Bisulfite Sequencing, WGBS) 法や 5mC 抗体を用いた抗体蛍光染色 (Immunofluorescence staining, IF staining) 法によって、TKO+FL ESCs や分化誘導細胞で DNA メチル化の増加が検出された。また、TET1/2/3 酵素を発現する幹細胞系列では、5mC を酸化して 5-ヒドロキシメチル化シトシン (5-hydroxymethylcytosine, 5hmC) に変換する特性があるため (Tahiliani et al., 2009)、DNMT1 による DNA メチル化領域やその活性は 5mC と 5hmC の総和として予測することが必要である。先行研究では、TKO+FL ESCs の EpiLCs 分化誘導過程で原腸換入 (primitive streak, PS) を誘導する NODAL シグナルのリガンドとして働く Activin A を培養液に添加することで、ゲノムワイドな 5hmC 化を IF staining で検出した。以上から、DNMT1 が無修飾 DNA へ接近し *de novo* メチル化活性が発揮されることに細胞分化誘導シグナル経路の活性化が関連する可能性が浮上した。

そこで本研究では、Activin A が DNMT1 の *de novo* メチル化活性を増加させる経路の詳細を明らかにすることを目的とした。Activin は Nodal と機能的に識別不可能なリガンドであり、両者はタイプ I (ACVR1IA/1IB) およびタイプ II 膜貫通型受容体 (ALK4/7) に結合して受容体複合体を活性化し、その下流の SMAD2 と SMAD3 をリン酸化して SMAD4 と複合体を形成し核内に移

動する (Pauklin and Vallier, 2015)。SMAD タンパク質は、配列特異的な転写因子によって標的化されて転写調節因子として振る舞い、CBP/p300 などのアセチル化酵素をリクルートすることで標的遺伝子の転写制御領域を緩和ができる (Pauklin and Vallier, 2015; Coda et al., 2022)。このような Activin A の効果により、周囲のクロマチン構造によって露出していなかった DNA 領域に対して DNMT1 が接近できるようになった可能性がある。また、Activin/Nodal シグナル経路は ZIC3 を介して *Wnt3* の遺伝子発現を直接誘導する。WNT3 はその後 β -カテニンとリン酸化 SMAD が作用して標的遺伝子の発現を相乗的に活性化することから (Coda et al., 2022)、Activin A 処理により開始された遅延型の WNT/ β -カテニンの活性化が直接 DNMT1 の *de novo* メチル化活性を増加させた可能性を検討する必要性が生じた。

マウスでは、WNT シグナル伝達経路はエピブラストからの PS 誘導だけでなく、内部細胞塊 (inner cell mass, ICM) 細胞からの PrE 誘導にも関与している (Pricen et al., 2013)。受容体 (Frizzled、LRP5/6) に WNT が結合していない場合、 β -カテニンは GSK3 によりリン酸化されユビキチン化により分解されるが、WNT が結合すると β -カテニンの分解が抑制され標的遺伝子を活性化する。 β -カテニンは CBP や SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体の構成要素である BRG1 をターゲット領域にリクルートするため (Clevers et al., 2006)、これらが DNMT1 の DNA 接近性を高める可能性が考えられる。一方で、ICM 細胞や ESCs からエピブラストや EpiLCs の分化が促進されるためには、PrE 分化や ICM や ESCs の安定性を高める WNT/ β -カテニンシグナル経路の下流にある遺伝子の発現抑制が欠かせない。よって、分化シグナルにより DNA に接近した DNMT1 がその *de novo* DNA メチル化がもたらす遺伝子発現抑制効果によって細胞分化を促進できるならば、その *de novo* DNA メチル化活性が極めて低いとしてもその機能を見捨てることはできず、詳細な活性制御機構の解析が必要である。

そこで本研究では、マウス TKO+FL ESCs を *in vitro* 分化誘導し、その過程で細胞培養液に Wnt3a (50 ng/ml) を加えることで、WNT3 シグナル経路の活性化が DNMT1 の *de novo* メチル化活性に与える影響を IF staining と dot blot 法によって解析したところ、Wnt3a 単独では DNMT1

の *de novo* メチル化活性を増加させるには不十分であることがわかった。

結果

Wnt3a 添加による TKO+FL ESCs の分化細胞形態への影響

TKO+FL ESCs の他に、ポジティブコントロールとして野生型 (wild-type, WT) ESCs とネガティブコントロールとして *Dnmt1/3a/3b* TKO ESCs を用いた (Fig. 1a)。本研究の先行研究で、分化 day 1-2 の TKO ESCs では中胚葉マーカーである *T/Brachyury* の発現増加が、分化 day 4-5 には ActivinA 添加でゲノムワイドな DNMT1 による DNA メチル化増加が見られている。そこで、これら 3 種類の ESCs の分化 day 1-2 と day 4-5 における Wnt3a (50 ng/ml) の効果を検討した (Fig. 1b)。また、TKO+FL ESCs では、分化依存的に DNMT1 による DNA メチル化増加が見られることから、未分化 (day 0) を分化前コントロールとして用いた。ESCs の EpiLCs 分化を誘導する目的で、ESCs 用培養液で培養していた細胞からフィーダー細胞を除去し、LIF を除いた培養液で胚様体 (embryoid bodies, EBs) 形成させ、その後 6-well plate に均等に播種した。

細胞形態は、day 0 で各細胞間に違いが観察されなかったが、day 2 TKO+FL ESCs の分化細胞集団は TKO ESCs のものと比較して、金平糖状の細胞形態を示す分化細胞が散見された。しかし、day 1-2 の Wnt3a 処理による分化形態の差は見られなかった。day 5 では、TKO と TKO+FL ESCs 由来分化細胞の双方で細胞死が生じたものの、細胞コロニー周辺に顕著な細胞分化が観察された。しかし、Wnt3a 処理による分化の影響の差を観察することはできなかった (Fig. 2)。

Wnt3a 添加による TKO+FL ESCs の DNA メチル化レベルへの影響

IF staining による解析

まず、DNMT3A/3B が主要な *de novo* DNA メチル化酵素として働いている WT ESCs の分化過

程において、Wnt3a がゲノムワイドな DNA メチル化に影響を与えるか否かを検討する
目的で、抗 5mC 抗体と抗 5hmC 抗体を用いた IF staining を実施した。結果、Wnt3a の非処理群
(NC) においては、共に day 2 で増加し、day 5 にかけて減少した。Wnt3a の処理群では、予想
に反して day 2 で 5mC と 5hmC シグナルの有意な減少が見られたが、day 5 では共に増加した
(Figs. 3, 5 および 6)。

一方、DNMT1 のみが主要な DNA メチル化酵素として働いている TKO+FL ESCs 由来の分化
細胞では、Wnt3a 処理が分化に伴う 5mC と 5hmC の増加を有意に減少させた (Figs. 4, 5 および
6)。しかしながら、WT ESCs よりも TKO+FL ESCs で分化細胞の核サイズにばらつきが生じてい
ること (Fig. 6a) や細胞形態の変化から、遺伝子発現解析で検証する必要性はあるものの、TKO+FL
ESCs において DNMT1 の *de novo* メチル化活性が細胞分化に機能していることは再確認できた。
よって、以上の結果は、Wnt3a は WT ESCs において DNMT3A/B によるゲノムワイドなメチル
化レベルの増加をもたらす可能性がある一方、DNMT1 の *de novo* メチル化活性による有意な
DNA メチル化増加をもたらさないことを示している。

DNA dot blot による解析

1 細胞レベルの IF staining 解析では検出できない DNMT1 の *de novo* メチル化活性制御におけ
る Wnt3a の効果がある可能性を検討する目的で、day 0 WT、TKO、TKO+FL ESCs ならびにそれ
らの day 2 と day 5 の分化細胞からゲノム DNA を抽出して、抗 5mC 抗体と抗 5hmC 抗体を用い
た dot blot 解析を実施した。その結果、WT ESCs の分化過程では、5mC レベルが増加し、5hmC
は day 2 で増加したものの day 5 で減少した。また、Wnt3a 処理は、day 5 で 5mC レベルを有意
に減少させ、day 2 と day 5 で 5hmC レベルを有意に減少させた (Fig. 7)。このことから、WT ESCs
において、Wnt3a による DNMT3A/3B の *de novo* メチル化活性増加効果を再確認できなかった。
また、TKO+FL ESCs でも、day 2 で Wnt3a 処理と非処理で 5hmC レベルに有意な差が見られた
ものの、分化依存的な DNA メチル化レベルの増加は見られなかった (Fig. 8)。以上の結果は、

Wnt3a 単独では、DNMT1 によるゲノムワイドな DNA メチル化増加を誘導できないことを示している。

考察

唯一の維持メチル化酵素である DNMT1 は、無細胞系では *de novo* メチル化活性があることが知られていた (Vilkaitis et al., 2005)。近年、DNMT1 と DNA の接近を媒介する UHRF1 が過剰に集積する領域やレトロトランスポゾンの IAPEz-int 配列などの限られた領域が DNMT1 の *de novo* メチル化の標的になることが明らかになってきた (Haggerty et al., 2021)。本研究室の先行研究では、*Dnmt1/3a/3b* の TKO ESCs に *Dnmt1* を強制発現させた TKO+FL ESCs を用いることで、ESCs の PrE 分化を抑制し EpiLCs 分化を促進させると共に、Activin A を培養液に添加することで主に非コード領域からなるゲノムワイドな 5mC と 5hmC レベルを増加できることを見出した (Ito et al., in preparation)。この Activin A による Nodal シグナル経路の活性化が直接的または間接的に DNMT1 のターゲット領域を制御するのか否かは、未だ検討されていなかった。そこで本研究では、Activin/Nodal シグナルは ZIC3 を介して Wnt3 を誘導する特性をもち (Pauklin et al., 2015; Coda et al., 2022)、DNMT1 が Wnt シグナル経路の下流で活性化される PrE 分化関連遺伝子を抑制することから (Ito et al., in preparation)、Activin/Nodal シグナルにより開始される Wnt3 シグナル経路の活性化がクロマチンの緩和を招き DNMT1 の DNA 接近性を増加させる可能性があるかと予想した。しかし、Wnt3 シグナルを活性化するために TKO+FL ESCs を Wnt3a 処理しても DNMT1 による 5mC や 5hmC レベルは増加しなかった。この結果は、Wnt3 シグナルの活性のみでは、DNMT1 による *de novo* メチル化のターゲット領域は Wnt3 が制御する下流遺伝子に限定され、免疫蛍光染色レベルで可視化できるような広範な DNA メチル化を誘導できないと考えられる。

ESCs の EpiLCs 分化後に Activin A を添加して培養すると Nodal シグナル経路の活性化を経て

原腸陥入を *in vitro* で再現した中内胚葉誘導が起こる。これを機に、本格的に ESCs から三胚葉性の体細胞分化や始原生殖細胞分化が始まる (Tam et al., 1997)。Nodal シグナルが活性化されると、リン酸化された Smad2/3 は、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性を持つ転写活性化因子 p300 や CBP の活性を上げることでヒストンをアセチル化し (Thompson et al., 2004)、クロマチンリモデリング因子の BRG1 のリクルートを介して広範なクロマチンの緩和を誘導できる (Coda et al., 2022)。また、Nodal-Smads2/3 シグナル伝達経路は、ヒストン H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化 (H3K27me3) の脱メチル化酵素 JMJD3 を標的遺伝子に動員し、それによってポリコームによる遺伝子発現抑制を打ち消す働きを持つ (Dahle et al., 2010)。また、原腸換入誘導以降、周囲の体細胞に比べ、ヒストン H3 の 9 番目のリジンのトリメチル化 (H3K9me3) が低下していることも免疫蛍光染色で示されている (Seki et al., 2004)。これらの報告は、Activin/Nodal シグナル経路の活性化は、H3K9me3 や H3K27me3 の消去やヒストンのアセチル化を伴う広範なクロマチンの緩和を誘導することで、DNMT1 が DNA へ接近性を高めることができる発生分化上稀なチャンスを提供し、DNMT1 によるゲノムワイドな *de novo* メチル化レベルの増加を誘導できると考えられる (Fig. 9a, b, c, d)。付加された DNA メチル化は、N 末端依存的な DNMT1 の維持メチル化活性により集積され、領域特異的な不活性クロマチン構築に関与すると考えられる。結果、胚発生過程で連続して異なるシグナル経路が活性化される状況下において、活性化領域に入り込んだ DNMT1 がその *de novo* メチル化による遺伝子発現抑制効果を発揮することで、次の分化段階へのシフトを可能にしていると考えている。

本研究では、TKO+FL ESCs の分化誘導過程において、Wnt3a 処理によって免疫蛍光染色や dot blot 法によって検出できるレベルの DNA メチル化レベルの増加を誘導できなかった。TKO+FL ESCs の EpiLCs 分化過程では、DNMT1 による PrE 分化制御因子の DNA メチル化を介した発現抑制を介して EpiLCs 分化や中内胚葉誘導を間接的に促進できる (Ito et al., in preparation)。よって、Wnt3a 単独では、その標的遺伝子に対して限定的にクロマチン緩和を誘導し、DNMT1 と DNA の接近性を高めていると考えられる。このことを確かめるためには、領域特異的な DNA メチル

化解析が必須であった。また、DNMT1 の *de novo* DNA メチル化が抑制マークとして機能的しているかを検証するためには、遺伝子発現解析を併せて行うことが必須であった。残念ながら、本研究の成果は、Wnt3a が DNMT1 によるゲノム全体の DNA メチル化レベルに与える効果乏しいことがわかったことに留まるが、今後、Nodal シグナル活性化時期の DNMT1 の *de novo* DNA メチル化制御機構に注目することで、これまで顕在化してこなかった DNMT1 の生理的な機能に迫れると考えられる。

材料・方法

ESCs の培養

マウス ESCs は、J1 WT、TKO、TKO+FL の 3 種類を使用した。0.1%ゼラチンコートした直径 60 mm のディッシュ (Corning) にマイトマイシン C (MMC) 処理をしたマウス胎児由来線維芽細胞 (MEF) をフィーダー細胞として D-MEM (Wako) に 10% FBS (Corning) を加えた培養液 (MEF medium) で培養し、この MEF 上にそれぞれの ESCs を播種した。細胞培養は 37°C の 5% CO₂ インキュベーターで行った。ESCs は、D-MEM F12 (Wako) に 10% FBS と 1000 U/ml ESGRO® LIF (Merk) を加えた培養液 (ES medium) で培養した。

ESCs 分化誘導

ESCs を 0.25% Trypsin (Gibco) /EDTA (Dojindo) -PBS で剥離後、0.1%ゼラチンコートした直径 100 mm のディッシュ (Corning) に細胞懸濁液を入れ、30–60 分静置し、MEF を除去した。ESCs のみを非接着性の直径 100 mm の培養皿 (Falcon) に播種し、1 日間、MEF medium で浮遊培養して胚様体 (EBs) を形成した。次に EBs を 0.1%ゼラチンコートした 6-well プレート (Corning) に移し、Wnt3a (50ng/ml) を day 1–day 2 間と day 4–day 5 間に培養液に加え、37°C の 5% CO₂ インキュベーターで培養し、それぞれ day 2 と day 5 に細胞を回収した。非処理群についても、day 2 と day 5 に細胞を回収した。

電気泳動

1%アガロースで泳動用ゲルを作製し、1×TAE の入った電気泳動装置 (Takara bio) に設置した。各ウェルに 1/40 量の Midori Green (Nippon Genetic) を入れた DNA および ladder (DNA Ladder One, Nacalai Tesque) を入れ、100V、40 分で電気泳動した。FAS-V (NIPPON Genetics) で検出した。

Dot blot

各サンプルの DNA を超音波破碎装置 BIORUPTOR (Cosmobio) を用いて 500 bp 程度に超音波処理した後、100°C で 10 分間熱変性させた。プロッター (Bio-Rad Laboratories) を用いて Hybond-N+ナイロン膜 (GE Healthcare) にプロットイングし、 $7 \times 10^4 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ の UV でクロスリンクさせた。次に、そのナイロン膜を 3%skim milk /PBS に 4°C で 1 日ブロッキングした。一次抗体としてマウス抗 5mC 抗体 (1:1000) とウサギ抗 5hmC 抗体 (1:5000) (Active Motif) を室温で 1 時間反応させ、その後、0.1%Tween20/PBS (PBST) を用いて室温で 5 分、3 回洗浄した。また、二次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体 (1:3000)、抗ウサギ IgG 抗体 (1:5000) (GE Healthcare) を室温で 1 時間反応させ、その後、PBST を用いて室温で 5 分、3 回洗浄した。Clarity Max Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories) を用いて 3 分反応させ、Amersham Imager 680 (Cytiva) で抗体反応量を発光で検出した。

5mC と 5hmC に対する免疫蛍光染色

2%PFA で 5 分間固定し、PBS で洗浄後、室温で 4N HCl に 10 分間浸けて DNA を変性させた。PBS で洗浄し、0.4% Triton X に 20 分間浸けて透過処理をした。PBS で洗浄して 2% skim milk /PBS で 30 分間ブロッキング処理をした。一次抗体としてマウス抗 5mC 抗体 (1:1000) とウサギ抗 5hmC 抗体 (1:1000) (Active Motif) で室温で 1 時間反応させ、その後、0.05%Tween20 を含む PBST を用いて室温で 5 分、3 回洗浄した。また、二次抗体として抗マウス IgG 抗体 Alexa Fluor 488 と抗ウサギ IgG 抗体 Alexa Fluor 546 (Thermo Fisher Scientific) を室温で 1 時間反応させ、その後、0.05%Tween20/PBS (PBST) を用いて室温で 5 分、3 回洗浄した。PBS で 1000 倍希釈した Hoechst33258 (Merck) を加え、遮光して室温で 30 分間反応させた。PBS で 5 分洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡 ECLIPSE Ti Series (Nikon) で観察した。

統計分析

IF staining や dot blotting により得られた画像を用いて、Image J により蛍光および発光量を算出した。得られた値が WT、TKO、TKO+FL 細胞において Wnt3a 処理と非処理の細胞群間で有意な差があるかを評価するために、マン・ホイットニーの U 検定を行った。* , $p<0.05$; ** , $p<0.01$; *** , $p<0.001$ 。

謝辞

研究においてご指導してくださった幹細胞リプログラミング研究室の多田政子教授、山口新平講師に深く感謝いたします。本研究は、東邦大学理学部生物学科教室研究費によって支援されています。

参考文献

- Chedin, F., M. R. Lieber and C. L. Hsieh (2002). "The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26): 16916-16921.
- Clevers, H. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." *Cell* 127(3): 469-480.
- Coda, D. M., H. Patel, I. Gori, T. E. Gaarenstroom, O. R. Song, M. Howell and C. S. Hill (2022). "A network of transcription factors governs the dynamics of NODAL/Activin transcriptional responses." *J Cell Sci* 135(8).
- Dahle, Ø., A. Kumar and M. R. Kuehn (2010). "Nodal signaling recruits the histone demethylase Jmjd3 to counteract polycomb-mediated repression at target genes." *Sci Signal* 3(127): ra48.
- Görisch, S. M., M. Wachsmuth, K. F. Tóth, P. Lichter and K. Rippe (2005). "Histone acetylation increases chromatin accessibility." *J Cell Sci* 118 (Pt 24): 5825-5834.
- Haggerty, C., H. Kretzmer, C. Riemenschneider, A. S. Kumar, A. L. Mattei, N. Bailly, J. Gottfreund, P. Giesselmann, R. Weigert, B. Brändl, P. Giehr, R. Buschow, C. Galonska, F. von Meyenn, M. B. Pappalardi, M. T. McCabe, L. Wittler, C. Giesecke-Thiel, T. Mielke, D. Meierhofer, B. Timmermann, F. J. Müller, J. Walter and A. Meissner (2021). "Dnmt1 has de novo activity targeted to transposable elements." *Nat Struct Mol Biol* 28(7): 594-603.
- Li, E., T. H. Bestor and R. Jaenisch (1992). "Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality." *Cell* 69(6): 915-926.
- Li, T., L. Wang, Y. Du, S. Xie, X. Yang, F. Lian, Z. Zhou and C. Qian (2018). "Structural and mechanistic insights into UHRF1-mediated DNMT1 activation in the maintenance DNA methylation." *Nucleic Acids Res* 46(6): 3218-3231.
- Nishiyama, A., C. B. Mulholland, S. Bultmann, S. Kori, A. Endo, Y. Saeki, W. Qin, C. Trummer, Y. Chiba, H. Yokoyama, S. Kumamoto, T. Kawakami, H. Hojo, G. Nagae, H. Aburatani, K. Tanaka, K. Arita, H.

- Leonhardt and M. Nakanishi (2020). "Two distinct modes of DNMT1 recruitment ensure stable maintenance DNA methylation." *Nat Commun* 11(1): 1222.
- Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber and E. Li (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." *Cell* 99(3): 247-257.
- Pauklin, S. and L. Vallier (2015). "Activin/Nodal signalling in stem cells." *Development* 142(4): 607-619.
- Price, F. D., H. Yin, A. Jones, W. van Ijcken, F. Grosveld and M. A. Rudnicki (2013). "Canonical Wnt signaling induces a primitive endoderm metastable state in mouse embryonic stem cells." *Stem Cells* 31(4): 752-764.
- Sakaue, M., H. Ohta, Y. Kumaki, M. Oda, Y. Sakaide, C. Matsuoka, A. Yamagiwa, H. Niwa, T. Wakayama and M. Okano (2010). "DNA methylation is dispensable for the growth and survival of the extraembryonic lineages." *Curr Biol* 20(16): 1452-1457.
- Schrader, A., T. Gross, V. Thalhammer and G. Längst (2015). "Characterization of Dnmt1 Binding and DNA Methylation on Nucleosomes and Nucleosomal Arrays." *PLoS One* 10(10): e0140076.
- Seki, Y., K. Hayashi, K. Itoh, M. Mizugaki, M. Saitou and Y. Matsui (2005). "Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice." *Dev Biol* 278(2): 440-458.
- Suetake, I., F. Shinozaki, J. Miyagawa, H. Takeshima and S. Tajima (2004). "DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction." *J Biol Chem* 279(26): 27816-27823.
- Tahiliani, M., K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind and A. Rao (2009). "Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1." *Science* 324(5929): 930-935.
- Tam, P. P. and R. R. Behringer (1997). "Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan." *Mech Dev* 68(1-2): 3-25.

Thompson, P. R., D. Wang, L. Wang, M. Fulco, N. Pediconi, D. Zhang, W. An, Q. Ge, R. G.

Roeder, J. Wong, M. Levrero, V. Sartorelli, R. J. Cotter and P. A. Cole (2004). "Regulation of the p300 HAT domain via a novel activation loop." *Nat Struct Mol Biol* 11(4): 308-315.

Tsumura, A., T. Hayakawa, Y. Kumaki, S. Takebayashi, M. Sakaue, C. Matsuoka, K. Shimotohno, F. Ishikawa, E. Li, H. R. Ueda, J. Nakayama and M. Okano (2006). "Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b." *Genes Cells* 11(7): 805-814.

Veland, N., Y. Lu, S. Hardikar, S. Gaddis, Y. Zeng, B. Liu, M. R. Estecio, Y. Takata, K. Lin, M. W. Tomida, J. Shen, D. Saha, H. Gowher, H. Zhao and T. Chen (2019). "DNMT3L facilitates DNA methylation partly by maintaining DNMT3A stability in mouse embryonic stem cells." *Nucleic Acids Res* 47(1): 152-167.

Vilkaitis, G., I. Suetake, S. Klimasauskas and S. Tajima (2005). "Processive methylation of hemimethylated CpG sites by mouse Dnmt1 DNA methyltransferase." *J Biol Chem* 280(1): 64-72.

a

	WT	TKO	TKO+FL
<i>Dnmt1</i>	■	□	■
<i>Dnmt3a</i>	■	□	□
<i>Dnmt3b</i>	■	□	□

b

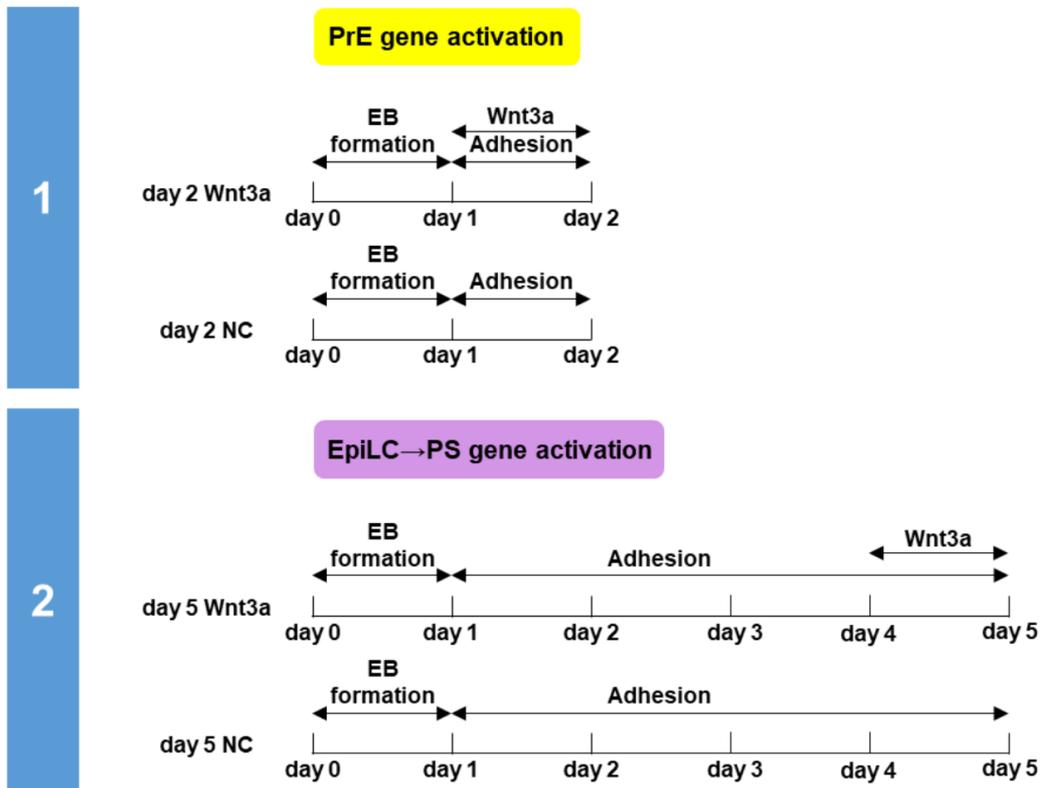


Fig. 1. 本研究で用いた胚性幹細胞(ESCs)の特徴と実験概要

a. ESCs の DNA メチル化酵素の構成。

WT, 野生型 ESCs; TKO, *Dnmt1/3a/3b* の三重欠損 ESCs ; TKO+FL, *Dnmt1* のコード領域を CAG プロモーター下で強制発現させた TKO ESCs。

b. 2 種類の Wnt3a 添加培養条件とそれぞれの非処理対象群の培養条件。

条件 1 では primitive endoderm (PrE) 形成促進のために分化誘導 day 1-day 2 に、条件 2 では primitive streak (PS) 形成促進のため分化誘導 day 4-day 5 に 50 ng/ml Wnt3a を添加した。条件 1 では day 2 に、条件 2 では day 5 に DNA メチル化レベルの変化を解析した。

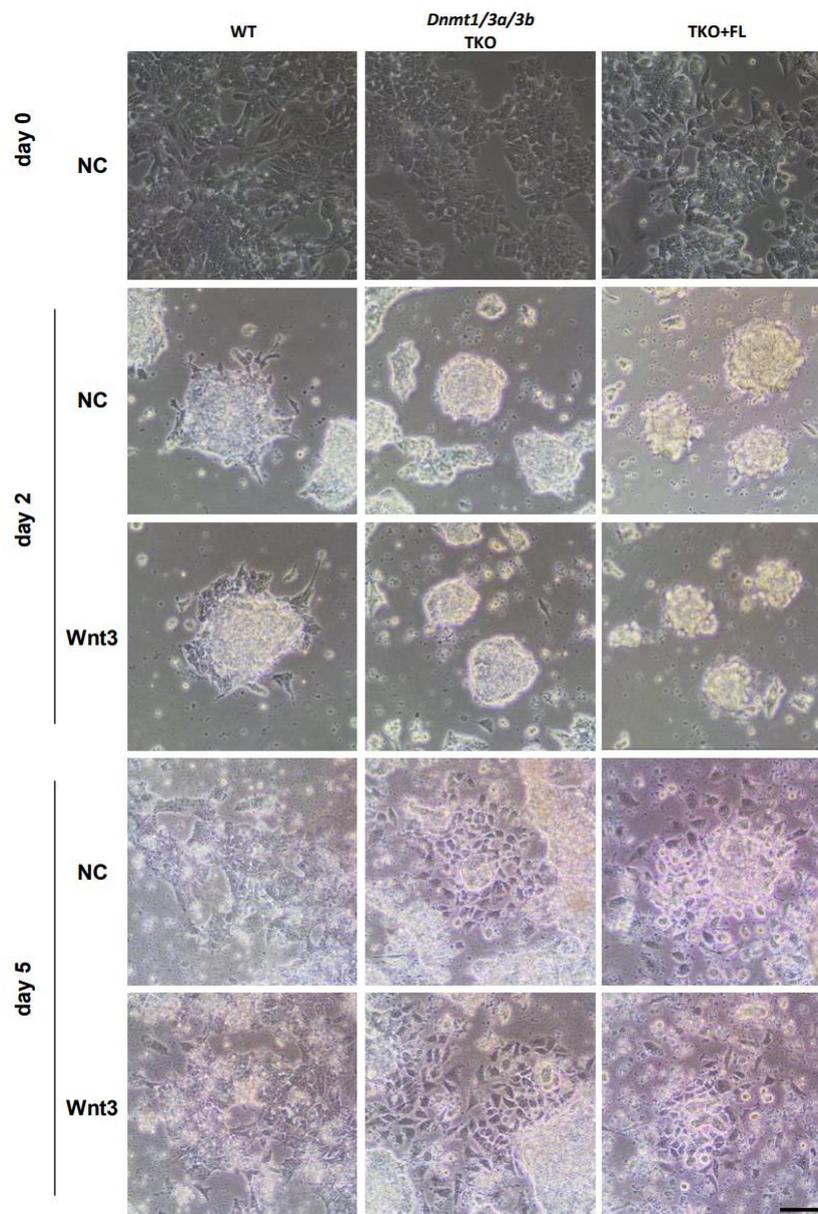


Fig. 2. Wnt3a 処理による細胞形態変化

WT、TKO、TKO+FL ESCs において、分化前 (day 0) に対し、分化 day 2 と day 5 における Wnt3a 処理が細胞形態に与える顕著な影響は見られない。スケールバー：100 μ m

WT ESCs

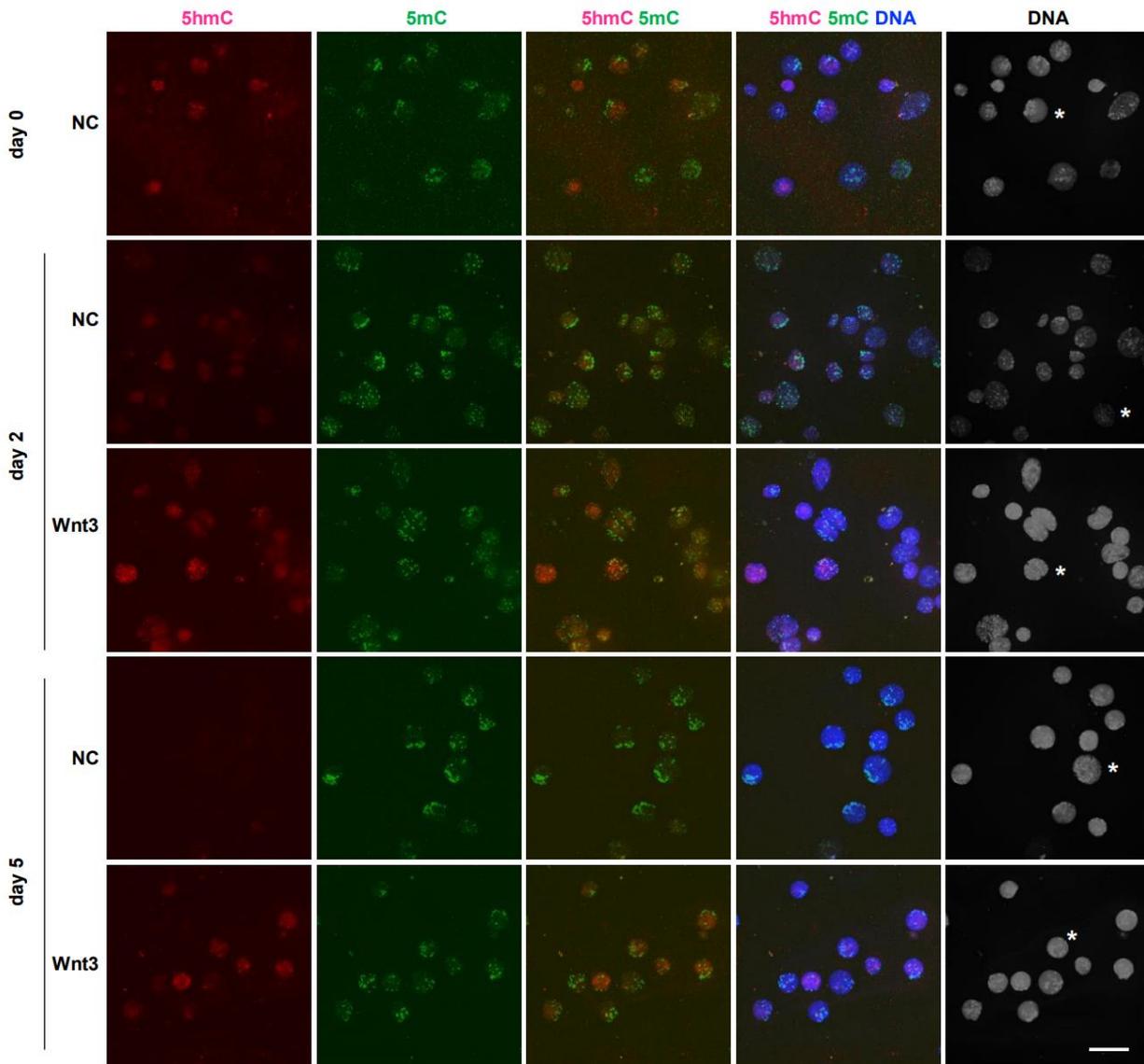


Fig. 3. 免疫蛍光染色による WT ESCs におけるメチル化活性にもたらず Wnt3a の効果の解析
 WT ESCs において、分化前 (day 0) に対し、分化 day 2 と day 5 における Wnt3a 処理が DNA
 メチル化に与える影響を 5mC と 5hmC に対する免疫蛍光染色で解析した。

Wnt3, Wnt3a 処理群; NC, non-treated control, 非処理群; 赤, 5hmC; 緑, 5mC; 青と白黒, 核 DNA;
 *, Fig. 5 で拡大表示。スケールバー : 50 μ m

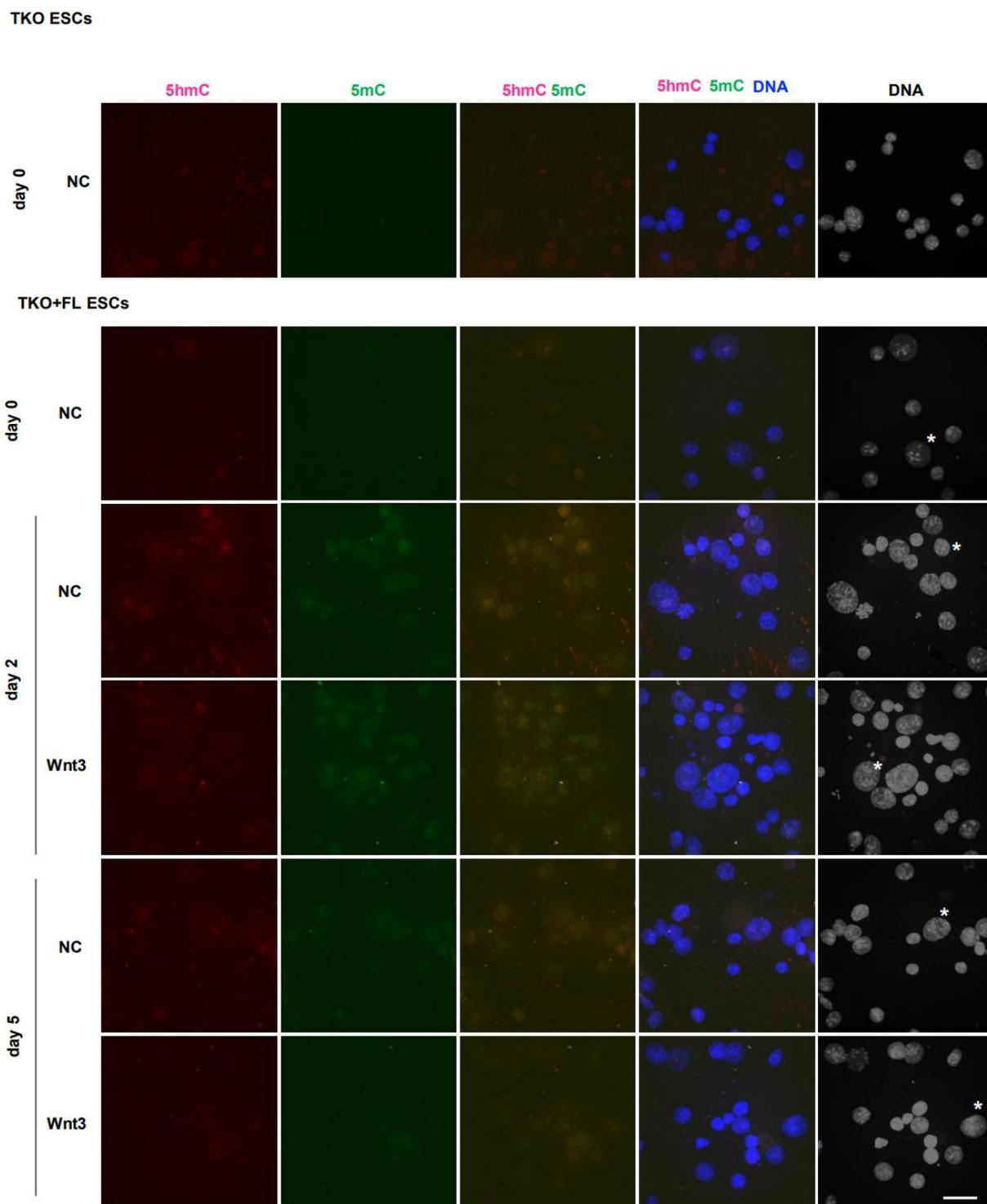


Fig. 4. 免疫蛍光染色による DNMT1 がもたらす DNA メチル化活性に与える Wnt3a の効果の解析

TKO+FL ESCs において、分化前 (day 0) に対し、分化 day 2 と day 5 における Wnt3a 処理が DNA メチル化に与える影響を 5mC と 5hmC に対する免疫蛍光染色で解析した。TKO ESCs, TKO+FL ESCs の親株 ; Wnt3, Wnt3a 処理群 ; NC, non-treated control, 非処理群 ; 赤, 5hmC ; 緑, 5mC ; 青と白, 核 DNA ; *, Fig. 5 で拡大表示。スケールバー : 50 μ m

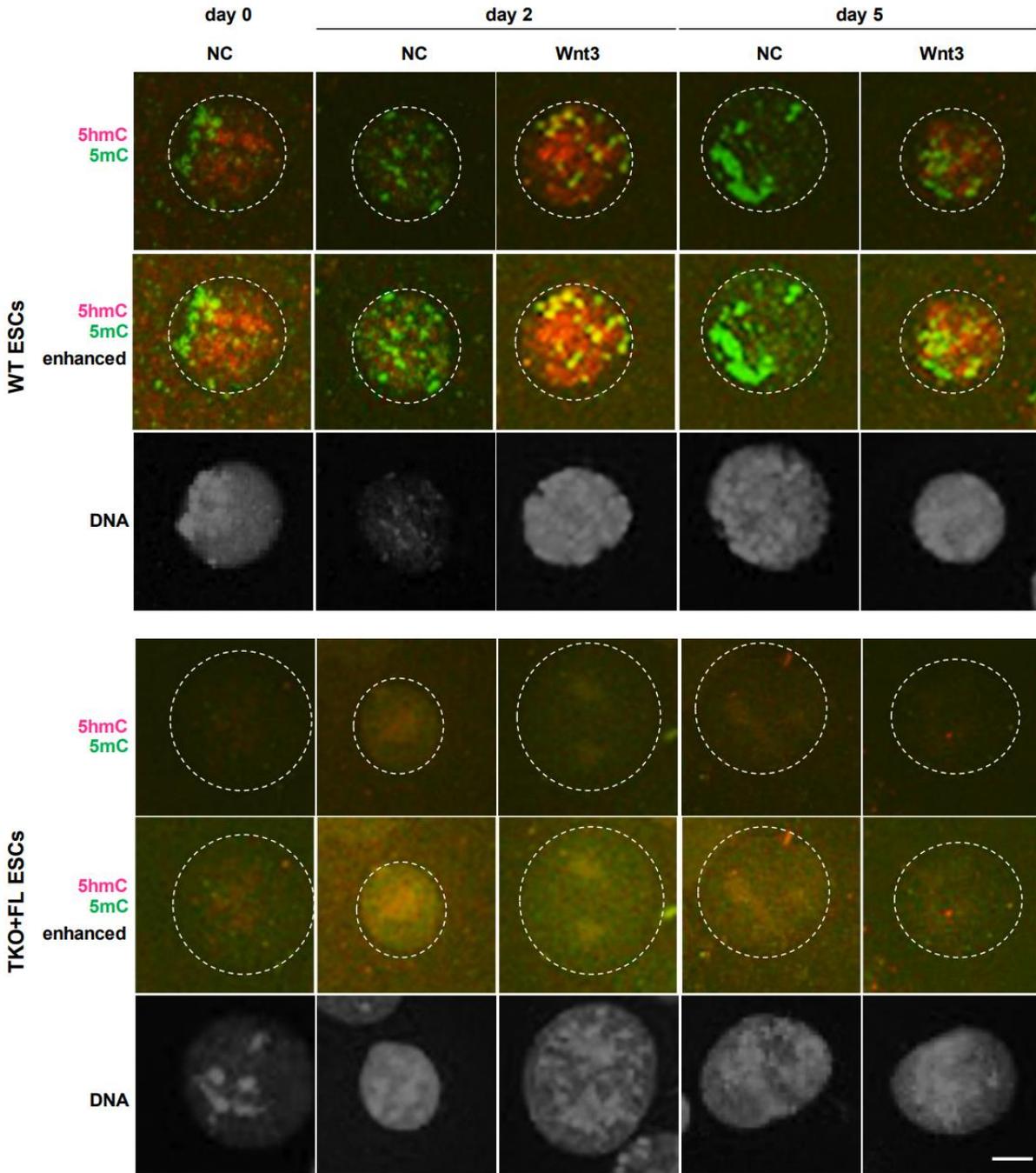


Fig. 5. WT ESC 核と TKO+FL ESC 核における 5mC と 5hmC の核内分布

WT ESCs では、5mC に対する緑色の免疫蛍光染色シグナルはヘテロクロマチン領域に、5hmC に対する赤色のシグナルはユークロマチンの存在する核質に見られる。TKO+FL ESCs では、5mC シグナルは検出されず、弱い 5hmC シグナルが検出される。破線、核膜の位置を示す。スケールバー：10 μ m

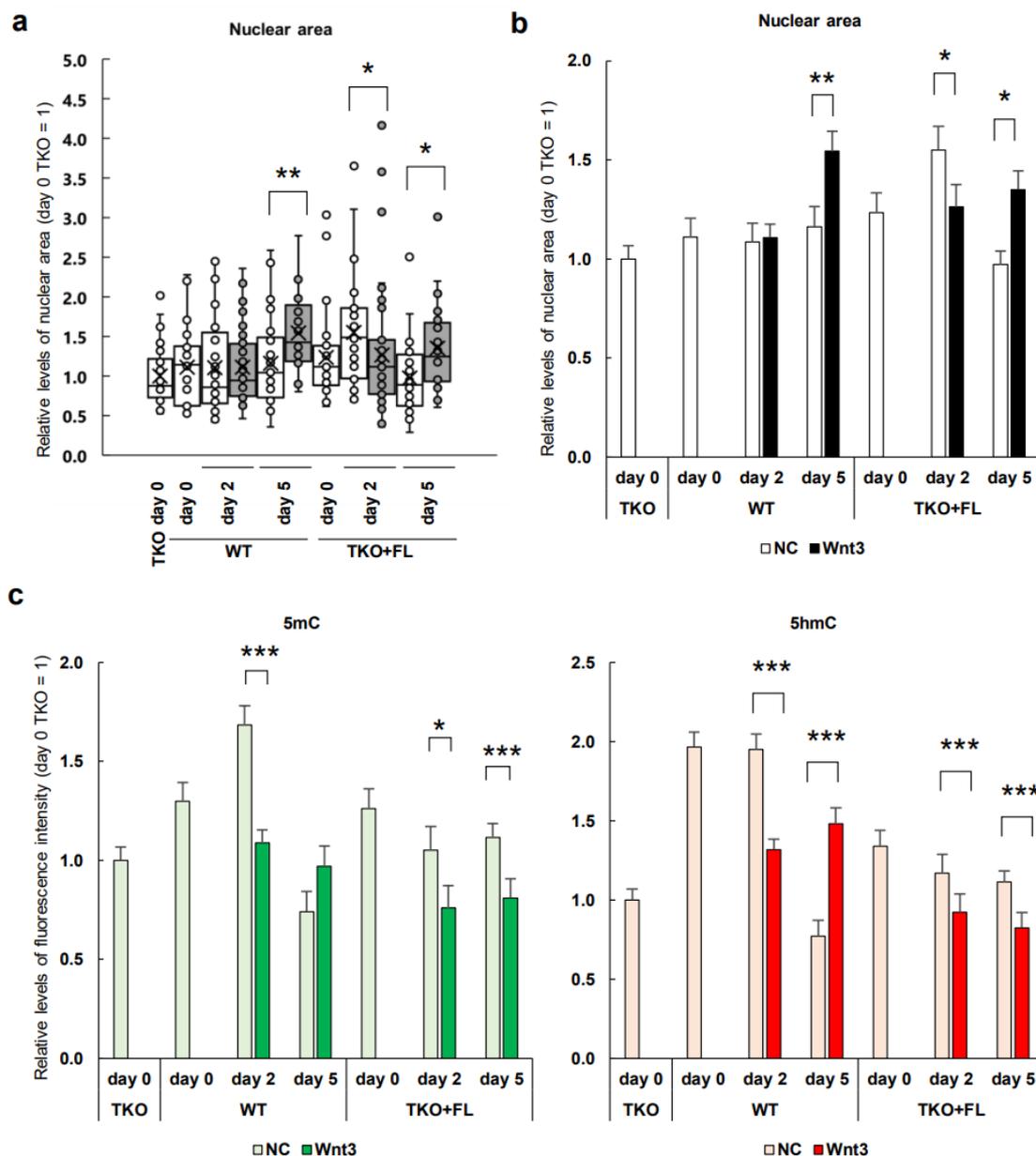
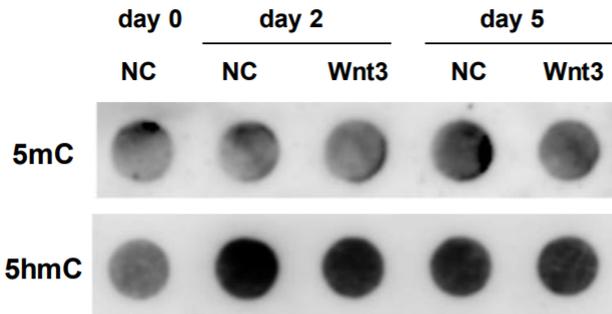


Fig. 6. 免疫蛍光染色の画像解析結果は WT ESCs と TKO+FL ESCs 分化において Wnt3a が 5mC と 5hmC の増加効果を持たないことを示す

- a.** WT ESCs と TKO+FL ESCs の分化過程における細胞核サイズ。Wnt3a 処理の有無に関わらず、TKO+FL 細胞は WT ESCs より核サイズの不均質性を示す箱ひげ図。黒, Wnt3a 処理 ; 白, Nontreated Control (NC)。day 0 TKO ESCs の値を 1 とした相対値。
- b.** WT ESCs と TKO+FL ESCs の分化 day 5 で Wnt3a による細胞核サイズの増加を示す棒グラフ。平均値+標準誤差で示した。
- c.** WT ESCs と TKO+FL ESCs において Wnt3a が 5mC や 5hmC の増加効果を持たないことを示す棒グラフ。平均値+標準誤差で示した。

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ 。

a WT ESCs



b

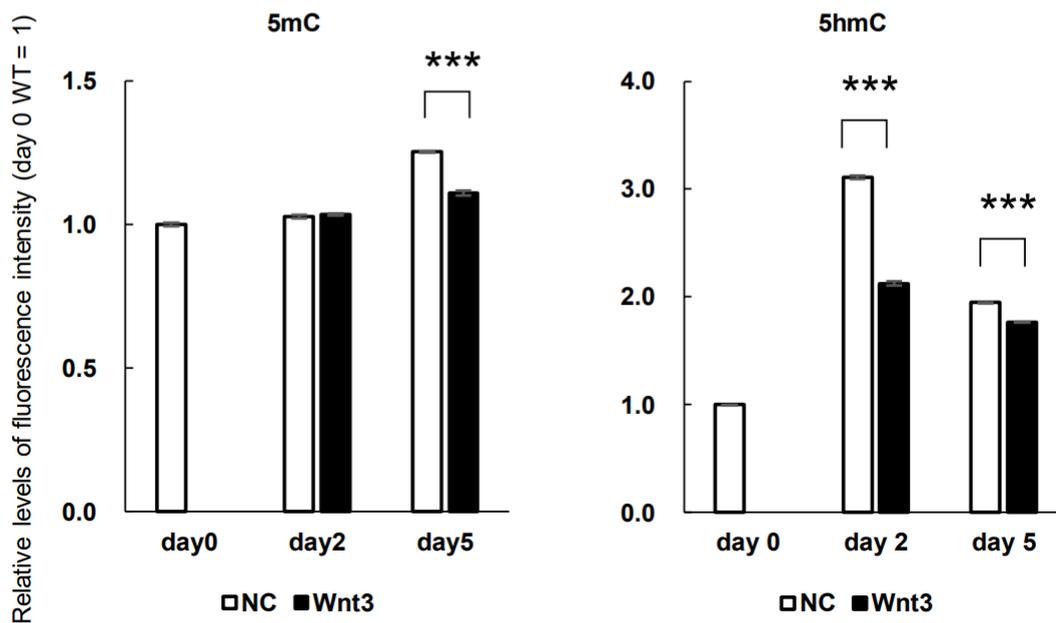


Fig. 7. dot blot の解析画像結果は Wnt3a が WT ESCs 分化において 5mC と 5hmC の増加効果を持たないことを示す

- a. 5mC と 5hmC に対する抗体を用いた DNA dot blot 画像。
- b. dot blot の画像解析による 5mC と 5hmC 量を示す棒グラフ。
day 0 WT ESCs = 1 とした相対値。黒, Wnt3a 処理 ; 白, Nontreated Control (NC)。
平均値+標準誤差で示した。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ 。

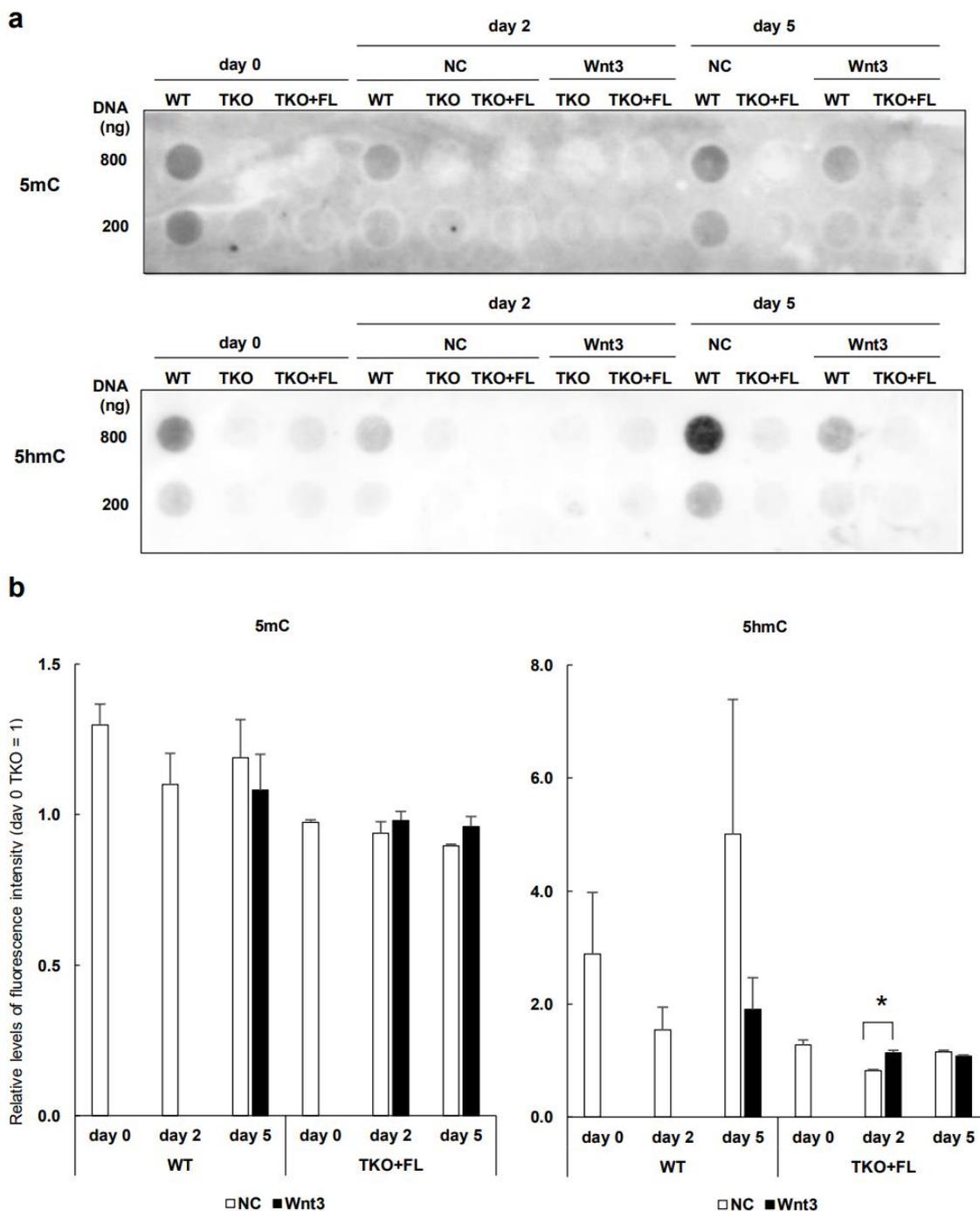


Fig. 8. dot blot 解析画像解析は Wnt3a が TKO+FL ESCs 分化において DNMT1 の *de novo* DNA メチル化活性に影響を与えないことを示す

a. 5mC と 5hmC に対する抗体を用いた DNA dot blot の画像

b. dot blot の画像解析による 5mC と 5hmC 量を示す棒グラフ

day 0 TKO ESCs = 1 とした相対値。黒, Wnt3a ; 白, Nontreated Control (NC)。

平均値+標準誤差で示した。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ 。

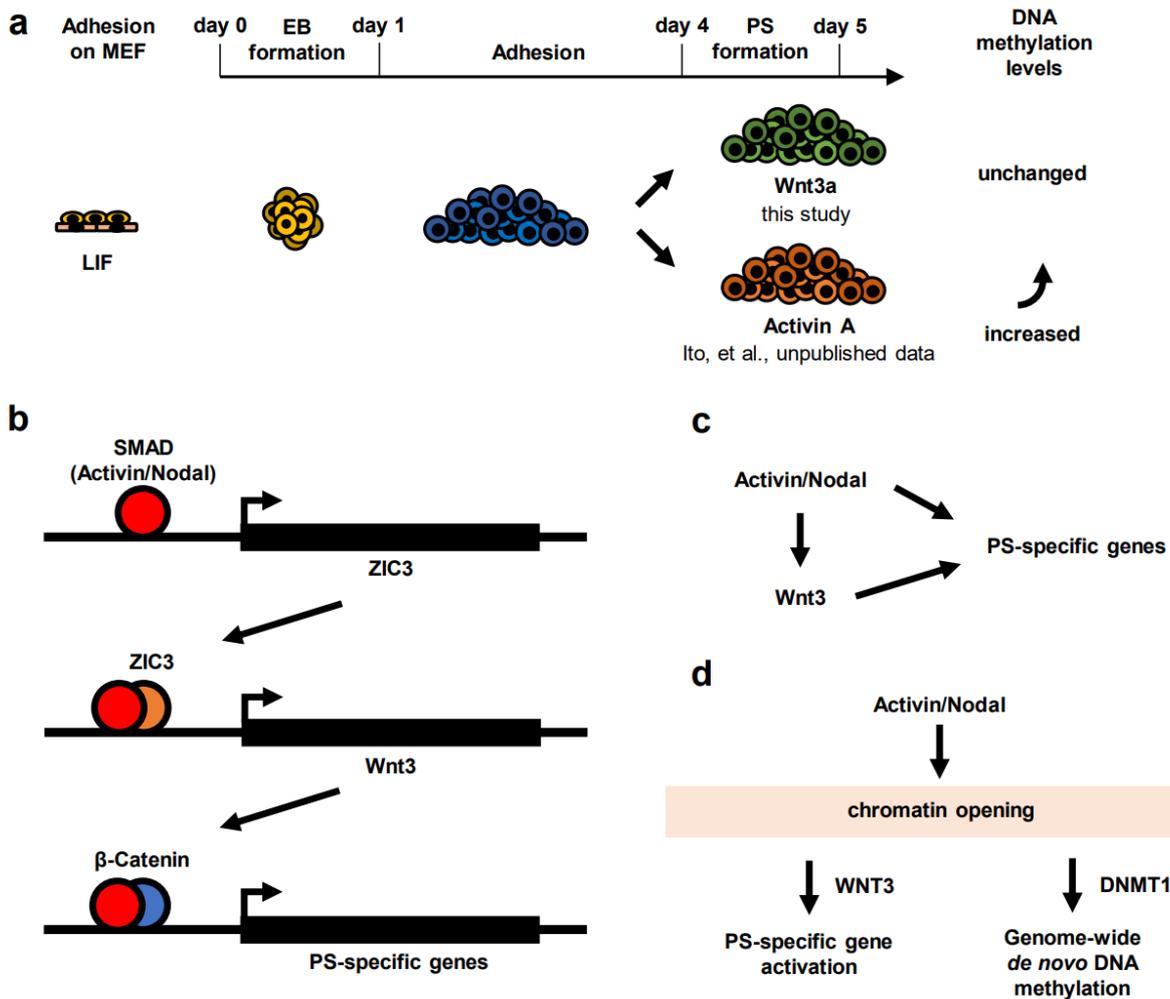


Fig. 9. DNMT1 の *de novo* DNA メチル化活性における Activin/Nodal シグナルと Wnt3 シグナルとの相互関係を示すモデル図

a. TKO+FL ESCs の PS 形成誘導時における Activin A と Wnt3a の DNA メチル化増加効果の違い。

本研究室の先行研究では、EB 形成 4 日目に 10 ng/ml Activin A を培養液に加えると DNMT1 によるゲノムワイドな DNA メチル化増加を誘導できたが (Ito et al., in preparation)、本研究では Activin A により活性化される Wnt/ β カテニンシグナルを 50 ng/ml Wnt3a で活性化させたが、IF staining や dot blot で検出可能なレベルの DNA メチル化を誘導できなかった。

b. Activin/Nodal シグナルは ZIC3 を介して間接的に Wnt3 シグナルを誘導する。WNT3 は SMAD と共同して PS-specific genes を活性化することを示す模式図 (Pauklin and Vallier, 2015 ; Coda et al. 2022)。

c. Activin/Nodal シグナルが Wnt3 シグナル経路の活性化を招くことを示す簡易モデル図。

d. DNMT1 の分化段階特異的な *de novo* メチル化活性増加を招く Activin/Nodal シグナル経路の活性化と Wnt3 シグナルとの関係を示すモデル図。

Activin/Nodal シグナル経路の活性化はクロマチン緩和を誘導し、遅延型の Wnt3 シグナル経路の活性化を招き、同時に DNMT1 の無修飾 DNA への接近性を高めゲノムワイドな DNA メチル化を誘導すると考えられる。