

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2008
課題番号：19770188
研究課題名（和文） 生殖巣との共培養がインプリント遺伝子の刷り込みに及ぼす影響
研究課題名（英文） Influence of co-culture with germ cells that exert on genomic imprinting of imprinted genes
研究代表者
堀居 拓郎（HORII TAKURO）
群馬大学・生体調節研究所・助教
研究者番号：00361387

## 研究成果の概要：

生殖細胞の性特異的なゲノムの刷り込みはマウスの場合、妊娠8.5-12.5日の間に生じる。しかし、そのような修飾が遺伝的に決まっているのか、周囲の環境によって決まるのか明らかではない。我々は妊娠8.5日目の始原生殖細胞より樹立した生殖幹細胞を異性の生殖原基と培養することで性特異的なゲノムの刷り込みを変化させることができるのか調べた。その結果、少なくとも8.5日目の始原生殖細胞由来生殖幹細胞ではすでに運命が決定されていることが分かった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：インプリンティング、刷り込み、始原生殖細胞、ES細胞、EG細胞、生殖原基

## 1. 研究開始当初の背景

2種類の異なる個体由来の細胞からなる動物をキメラ動物という。キメラ動物では、しばしばドナー細胞と宿主動物との性が異なることがある。そして生殖巣では、例えば卵巣の中に雄の細胞が存在したり、精巣の中に雌の細胞が存在することがある。さらに、確率は低いですが雄の細胞から卵子ができることが確認されている。このような配偶子から

子孫が得られたという報告は今のところないが、見かけは卵子だが雄のゲノムをもつ、もしくは見かけは精子だが雌のゲノムをもつ細胞が、実際の性はどちらなのかという点で非常に興味深い。

McLaren らの研究（Development 129, 1155-1164, 2002）によると、マウスでは妊娠12日目の胎児までは生殖細胞の性決定はなされていない。彼女らは様々な時期の異

なる性の始原生殖細胞と生殖巣を体外で共培養することによって、配偶子がどちらの性に分化するのか調べた。例えば、妊娠12日目の雄の始原生殖細胞と雌の生殖巣を共培養すると、雄のゲノムをもつ卵子になる。しかし、生後13日目を超えると細胞自体が持つ性によって性決定され、精子へと分化する。これら一連の研究から、見かけ上の性は生後12日目までは周囲の環境に、それ以降は細胞の持つ性によって決定されると考えられる。また異性間のキメラ実験から、少なくとも精巣内に入った雌の細胞は精子と同じパターンでのゲノムの修飾（「刷り込み」もしくは「インプリンティング」という）を保有することが分かった。このことから、配偶子特異的なゲノムの刷り込みは環境によって決定されると考えられる。しかし、具体的にどの時期の生殖巣環境が配偶子特異的なゲノムの刷り込みを決定するのかは分からない。また、ゲノムの刷り込みを体外で人工的に操作することは、これまで報告がない。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず遺伝子修飾レベルでの性はいつの時期の環境が決定するのか調べることが目的とする。さて、哺乳類では胎生期に生殖原基への移動を完了した始原生殖細胞は、これまで保有していた体細胞型の遺伝子修飾、つまり刷り込み（インプリンティング）を一度リセットする。その後、生殖細胞における刷り込みの再構築は、雌雄で異なる道を進ることになる。すなわち、雌では雌配偶子特異的に刷り込みを受ける遺伝子が刷り込まれるのに対し、雄では雄配偶子特異的に刷り込みを受ける遺伝子が刷り込みを受けることになる。これらの雌雄配偶子で異なる刷り込みパターンは受精後もそのまま維持され、個体発生に重要な役割を果たす。よって、生殖細胞の持つ遺伝子修飾レベルでの性は、ゲノムの刷り込みパターンを調べれば判明する。

また、体外において刷り込みパターンを制御することができれば、新たな展開が広がる。現在、体外で幹細胞に刷り込みの消去、構築を行わせる報告はされていない。しかし、例えば、始原生殖細胞に性質の近いEG細胞（生殖幹細胞）やES細胞（胚性幹細胞）などの培養細胞を生殖巣と共培養することで、生殖細胞の刷り込みパターンを獲得させることができるかもしれない。また、ゲノムの修飾が環境に影響を受ければ、それらの幹細胞から配偶子を体外で分化誘導できるかもしれない。

## 3. 研究の方法

本研究を実施するにあたり、まず異性間のキメラ生殖巣を作製しなければならない。これは近年 McLaren ら (Development 129, 1155-1164, 2002) によって用いられた方法を応用して行う。すなわち、各発生段階の胎児期のマウスより採取した生殖巣をいったん解離させたあと、異性間どうしの始原生殖細胞と生殖巣を混合する（図1）。本研究ではドナー始原生殖細胞を明らかにするために、始原生殖細胞にはGFPが発現して光るベクターを予め組み込んだマウスを用いる。これらを遠心してペレットにし、培養液を浸透させた寒天上で培養を行う。5日～2週間ほど共培養を行った後、GFP陽性細胞をマイクロマニピュレーターにより回収する。

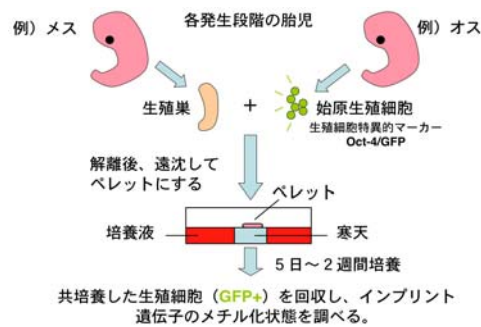


図1 始原生殖細胞と生殖巣の共培養法

見かけの性は12日目の胎児では環境に、それ以降では自己の性によって決定がなされるので、この時期を中心にしてキメラ生殖巣を作製する。採取したGFP陽性生殖細胞より常法によりDNAを回収し、バイサルファイト処理を行う（図2）。この処理によりメチル化（刷り込み、インプリント）されているDNAとメチル化（刷り込み、インプリント）されていないDNAが塩基配列の違いで区別できるようになる。このDNAを鋳型にしてPCRによりDNAを増幅させた後、メチル化DNA配列特異的に認識する制限酵素でDNAを切断し、電気泳動によりその比率を確認する。また、同時にシーケンシングにより塩基配列を解読する。解析の結果、ドナー始原生殖細胞の刷り込みパターンが生殖巣の性のパターンになれば、その発生段階の生殖巣にはドナー細胞の刷り込みパターンの運命を変更できる能力があることになる。一方、ドナー始原生殖細胞の性の刷り込みパターンがドナーの性と同一であれば、その発生段階ではすでに生殖巣には刷り込みパターンを変更する能力がないということになる。こうして、どの時期の生殖巣に刷り込みを行う能力があ

るのか見極めることができる。

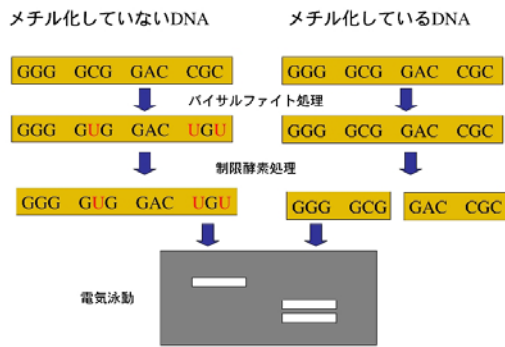


図2 コブラ法によるメチル化状態の検定

続いて、刷り込みパターンの変更能のある生殖巣と、始原生殖細胞由来の幹細胞である胚性生殖細胞 (EG cell)、より未分化な胚性幹細胞 (ES cell)、より分化した生殖幹細胞 (GS cell) を始めとする各種幹細胞とを共培養し、体外で刷り込みパターンを改変できるのか検討する (図3)。

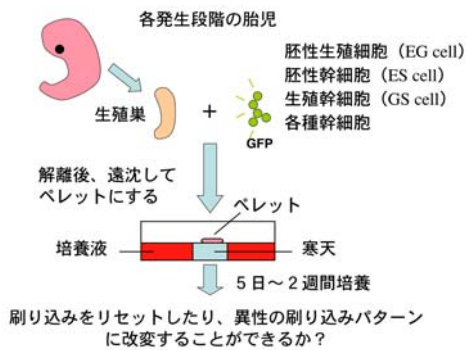


図3 幹細胞と生殖巣の共培養により刷り込みパターンを変える

各種幹細胞の樹立、培養法について、すでに我々は様々な技術を考案している (国際特許出願済)。これらの幹細胞を使用して、例えば、精子型の刷り込みパターンをもつ幹細胞を雌の生殖巣と共培養することで、卵子型の刷り込みパターンに改変できるのか?すでに刷り込みを受けた細胞を、刷り込みを消去する時期の生殖巣と共培養することで、刷り込みを人為的に消去できるのか?といった実験を行う。さらには、体外で刷り込みを操作して人工的に発生運命付けた精原細胞、卵原細胞をそれぞれ生体の精巣、卵巣に移植することで配偶子を作製できるのか確認する。体内の未成熟な卵子や精子を生殖巣に導入して成熟させる技術はすでに報告されており、我々の研究グループも獲得している (未発表)。

#### 4. 研究成果

まず始めに始原生殖細胞の性質に比較的近い生殖幹細胞 (Embryonic germ cell; EG 細胞) を樹立し、さらにその細胞を生きた状態で可視化するために EGFP を発現する細胞株を作製した。このEG細胞をin vitroで数日間分化誘導を行い、胚様体 (embryoid body) の作製を行った。この胚様体をトリプシン処理により単一細胞にした後、始原生殖細胞マーカーである SSEA-1 陽性細胞を精製し、予め準備した胎児の生殖原基とアグリゲーションさせて共培養を行った。驚くことに、EG細胞は生殖原基に取り込まれて行き、あたかも周囲の環境に合わせて分化が進んでいるように見られた (図4)。一方、たまたま取り込まれなかったEG細胞は新たに胚様体様の細胞塊を形成し、秩序だった分化誘導は行われていなかった (図4 矢印)。生殖原基内で共培養を行った始原生殖細胞およびEG細胞由来細胞を1週間後に回収し、DNAを抽出した。メチル化状態を調べるために、DNAをバイサルファイト処理し、メチル化解析 (COBRA 法およびバイサルファイトシーケンシング法) を行った。

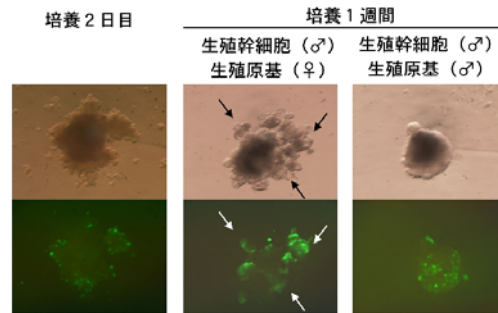


図4 生殖原基と生殖幹細胞の共培養

今回実験に用いたEG細胞は雄細胞株なので、雄の生殖原基に入れた場合は、精子特異的に刷り込みを受ける遺伝子 (H19) はメチル化されると考えられる。一方、雌の生殖原基に入れた場合は脱メチル化されると考えられる。そこで精子特異的な刷り込みを受けるH19遺伝子のメチル化領域を調べたが、培養前後で両者に大きなメチル化の変化は見られなかった。このことから、少なくとも妊娠8.5日目の始原生殖細胞では刷り込みは環境ではなく、細胞自身のもつプログラムによって制御されている可能性が示唆された。今後はもっと前の段階にある生殖細胞を用いて研究を行う必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Horii T, Kimura M, Morita S, Nagao Y, and Hatada I. Derivation of Embryonic Stem Cells from Mouse Tetraploid Embryos and Their Character.

*Biol Reprod.* special issue: 118, 2008. 査読有

② Horii T, Kimura M, Morita S, Nagao Y, Hatada I. Loss of Genomic Imprinting in Mouse Parthenogenetic Embryonic Stem Cells.

*Stem Cells.* 26: 79-88, 2008. 査読有

③ Horii T, Kimura M Nagao Y and Hatada I. Loss of imprints of parthenogenetic ES cells in murine chimeras.

*Reprod. Fertil. Dev.* 19: 228, 2007. 査読有

[学会発表] (計2件)

① 堀居拓郎、木村美香、森田純代、柳澤永吉、長尾恭光、畑田出穂「マウス四倍体ES細胞の樹立とその性質」第31回日本分子生物学会年会、神戸、2008年12月9～12日

② Horii T, Kimura M, Morita S, Nagao Y, and Hatada I. Derivation of Embryonic Stem Cells from Mouse Tetraploid Embryos and Their Character. The 41st Society for the study of reproduction, Hawaii, 26-30 May. 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀居 拓郎 (HORII TAKURO)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：00361387