

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06460

研究課題名(和文) 世代を通じた導入遺伝子の発現安定化を目指したDNAメチル化の人為的制御法の確立

研究課題名(英文) Establishment of artificial control of DNA methylation for stabilization of transgene expression through generations

研究代表者

山本 耕裕 (Yamamoto, Yasuhiro)

大阪医科薬科大学・医学部・講師

研究者番号：20613558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：導入遺伝子の発現状態が世代を超えるに従ってサイレンシングを受ける原因は導入遺伝子プロモーターの高DNAメチル化に起因すると考えられている。メダカ雌雄配偶子形成過程と初期発生におけるDNAメチル化パターンの変動をDNAメチル化の特異的である5メチルシトシン抗体を用いた免疫組織的手法により解析した。さらに、次世代シーケンサーによるDNAメチル化状態の網羅的解析からどのような遺伝子群においてDNAメチル化の変動が起こるのかを解析した。卵形成過程においてDNAメチルの減少が認められるため、母方より導入遺伝子が次世代に伝わる際に遺伝子サイレンシングが起こると示唆できる結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

導入遺伝子の安定した発現維持は基礎研究にも応用研究にも関わる重要な事項であり、世代を越えると導入遺伝子の発現が抑制される“導入遺伝子サイレンシング”は解決すべき大きな問題である。導入遺伝子のサイレンシングはプロモーターの高メチル化に起因すると考えられているが、これら因果関係を直接解析した報告は無いため、サイレンシングを回避する効果的な方法は未だ確立されていない。本研究では、導入遺伝子のDNAメチル化を人為的に制御することで、サイレンシングを回避する方法の確立を目的とした。

研究成果の概要(英文)：High DNA methylation of the transgene promoter is thought to be the cause of silencing of the transgene expression state over generations. We analyzed the variation in DNA methylation patterns during medaka gametogenesis and early development by immunohistological methods using 5-methylcytosine antibody, which is specific for DNA methylation. Furthermore, we analyzed which gene groups undergo DNA methylation variation based on comprehensive analysis of DNA methylation status using next-generation sequencers. The results showed that DNA methylation decreased during the egg formation process, suggesting that gene silencing occurs when genes introduced from the mother are transmitted to the next generation.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：生殖内分泌

キーワード：Transgenerational DNA methylation

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝子改変技術は遺伝子機能解析のみならず育種にも用いられているため、導入遺伝子が世代を超えて安定的に発現することが極めて重要と考えられる。しかしながら、導入遺伝子の発現を一旦確立したラインから発現が非常に弱い個体が現れる”導入遺伝子サイレンシング”と呼ばれる現象が多く動物で確認されている(図1)(Michela et al. Mol. Cell. Biol. 2002)。導入遺伝子の発現減少とプロモーター領域の DNA メチル化の上昇に相関が認められ(Courtney et al. Dev. Biol. 2011)、In vitro ではプロモーターの高メチル化が導入遺伝子のサイレンシングを導くことから(Lorincz et al. Nat. Struct. Mol. Biol. 2004)、サイレンシングの実体はプロモーターの高メチル化に起因すると考えられている。また、これら高メチル化は新規にメチル化を誘導することができるメチル化修飾酵素 *Dnmt3a*, *3b* により触媒されることが示唆されている(Zhou et al. Mol. Biol. Rep. 2014)。ほ乳類では配偶子形成と初期発生期で DNA メチル化状態が大きく変動することが明らかになっているが、魚類では初期発生において大規模な DNA メチル化の消失は起こらないことが示された(Jiang et al. Cell. 2013)。この報告から、魚類配偶子形成期における DNA メチル化状態を明らかにすることが導入遺伝子サイレンシングの回避に繋がると考えられた。

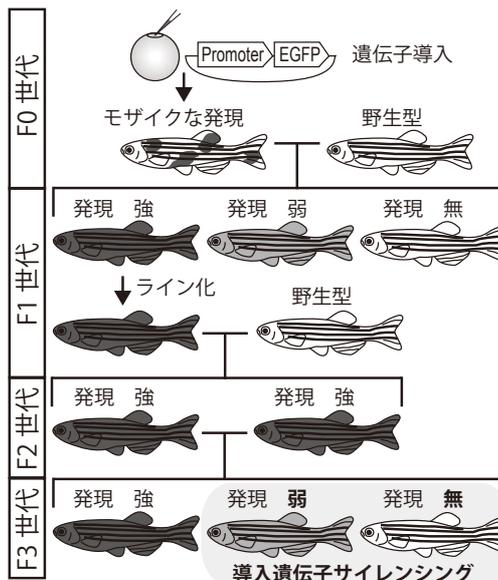


図1 導入遺伝子はサイレンシングを受ける

### 2. 研究の目的

モデル動物であるメダカを用いて、配偶子形成期における DNA メチル化の変動を明らかにする。また、DNA メチル化の修飾酵素である *Dnmt* 遺伝子のノックアウトメダカを作成することで、配偶子形成期における DNA メチル化の機能を解析する。これらの解析からメダカ配偶子形成での DNA メチル化と導入遺伝子サイレンシングの分子基盤の理解に貢献することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 配偶子形成期の DNA メチル化状態の解析

DNA メチル化は CG 配列のシトシン塩基を化学修飾することで転写状態を制御する。5-メチルシトシン特異的抗体を用いてメダカ生殖腺における免疫染色を行い、配偶子形成の分化段階における、DNA メチル化状態を解析した。雌雄それぞれの幹細胞型の生殖細胞と卵および精子からライブラリを作製し、次世代シーケンサーを用いて網羅的に DNA メチル化状態を解析した。

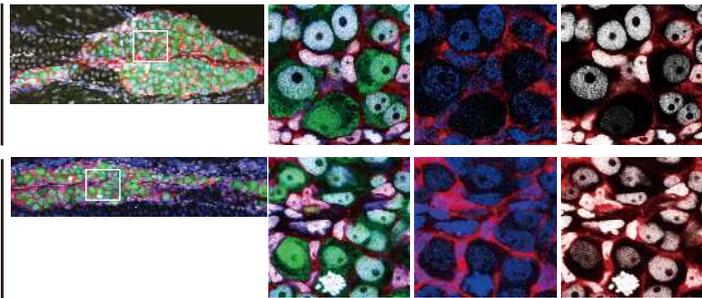
#### (2) *Dnmt* ノックアウトメダカの作製

配偶子形成における *Dnmt* の機能を明らかにするため、CRISPR-Cas9 システムを用いて、*Dnmt* ノックアウトメダカを作製した。メダカではメチル化修飾酵素は *Dnmt1*, *3a*, *3b-1*, *3b-2* の4種類が存在するため、すべての変異体を作製および交配することで、ダブルノックアウト、トリプルノックアウトの作製を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 配偶子形成での DNA メチル化変動

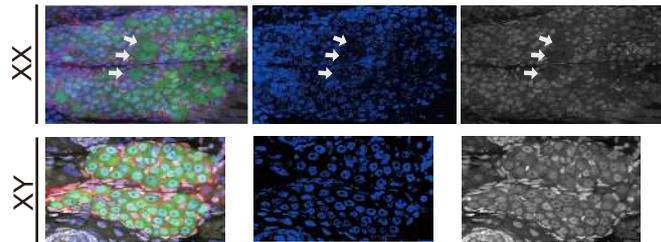
5-メチルシトシン抗体を用いてメダカ生殖腺における免疫染色を行ったところ、減数分裂前の幹細胞型の生殖細胞は高メチル化状態であることが示された(図2)。これら DNA メチル化状態に雌雄差は認められなかった。減数分裂後の卵母細胞では DNA メチル化状態が減少することが明らかになった(図3)。



Gray: DAPI Green: 生殖細胞マーカー Red: 生殖腺体細胞マーカー Blue: 5メチルシトシン

図2 幹細胞型の生殖細胞では高メチル化状態である

しかしながら、精子形成では分化段階による DNA メチル化の大きな変動は認められなかった。これらの解析からメダカ配偶子形成において、DNA メチル化状態は卵母細胞期に変動することが明らかになったが、哺乳類で認められるようなダイナミックな変動は起こらないことが示された。



Gray: DAPI Green: 生殖細胞マーカー Red: 生殖腺体細胞マーカー Blue: 5メチルシトシン 矢印: oocyte

図3 Oocyteでは低メチル化状態である

##### (2) 網羅的解析によるメダカ配偶子形成における DNA メチル化状態の変動

免疫染色による解析を更に検証するため、次世代シーケンサーによる DNA メチル化状態の解析を行なった。雌雄幹細胞型の生殖細胞、卵母細胞を FACS により選別した。更に成熟精子を加えた4サンプルでの DNA メチル化状態を PBAT 法により網羅的に解析した。メダカゲノムへのマッピングを行い、DNA メチル化修飾状態を調べたところ、他の動物種と同様にメチル化修飾を受けるのはほとんどが CG 配列であることが明らかになった(図4:左)。更にこれらの DNA メチル化修飾がメダカゲノムのどのような領域に特徴づけられるのかを解析したところ、転写開始点

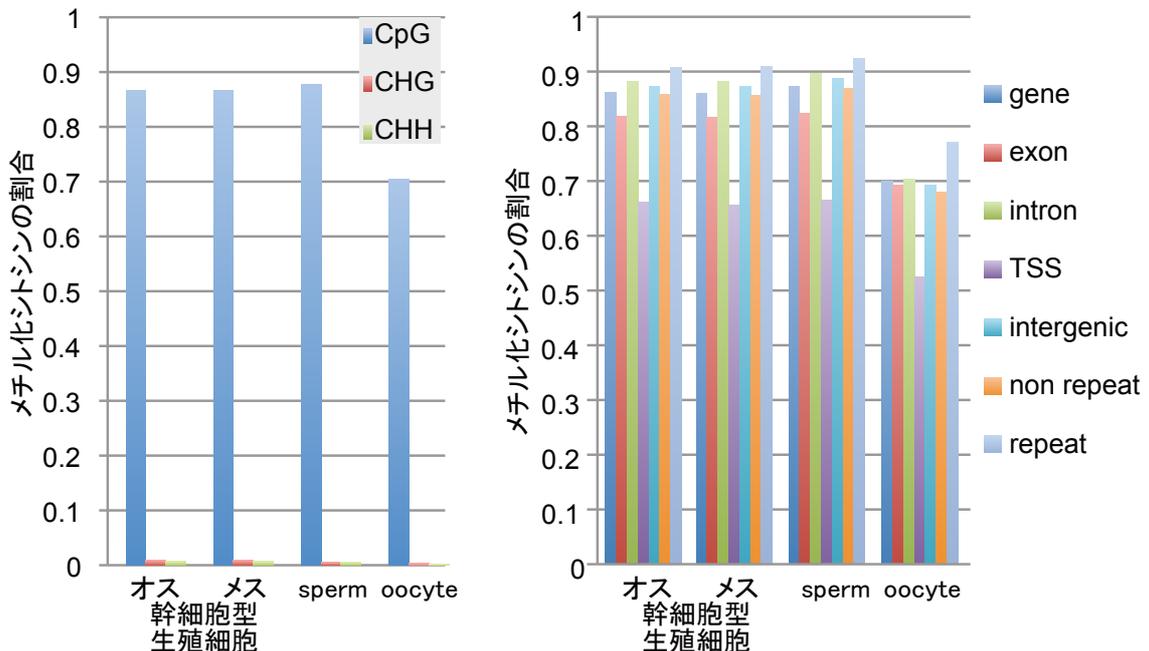


図4 メダカ生殖細胞のDNAメチル化修飾状態

(TSS) 領域では DNA メチル化状態が低いことが明らかになった (図 4 : 右)。興味深いことに、免疫染色から得られた結果と同様に、他のサンプルと比較して卵母細胞では DNA メチル化状態が低いことがわかった (図 4)。これらの結果からメダカ配偶子では、卵母細胞期に DNA メチル化状態が減少することが明らかになり、母方より導入遺伝子が次世代に伝わる際に遺伝子サイレンシングが起こると示唆できる結果を得た。

### (3) Dnmt ノックアウトメダカの作製

Crispr-cas9 を用いて *dnmt1*, *dnmt3a*, *dnmt3b-1,2* についてノックアウトメダカを作製した。すべての遺伝子において機能不全となり得る変異個体を得た。*Dnmt1* 以外の変異体は繁殖可能であったため、後輩を通じてダブル、トリプルノックアウト個体の作製を試みた。*Dnmt1b-1,2* のダブルノックアウトメダカを作製したところ、成魚における色素に明瞭な違いが認められた。これら変異体を用いて DNA メチル化状態を調べることで、配偶子形成および世代を超えるに従った DNA メチル化の役割が明らかになると予想された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yasuhiro Yamamoto, Daisuke Hishikawa and Fumihito Ono	4. 巻 7
2. 論文標題 Trpv4-mediated apoptosis of Leydig cells induced by high temperature regulates sperm development and motility in zebrafish	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Communications biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-05740-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Y. Ogino, S. Ansai, E. Watanabe, M. Yasugi, Y. Katayama, H. Sakamoto, K. Okamoto, K. Okubo, Y. Yamamoto, I. Hara, T. Yamazaki, A. Kato, Y. Kamei, K. Naruse, K. Ohta, H. Ogino, T. Sakamoto, S. Miyagawa, T. Sato, G. Yamada, M. Baker & T. Iguchi	4. 巻 14
2. 論文標題 Evolutionary differentiation of androgen receptor is responsible for sexual characteristic development in a teleost fish	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-37026-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fujii Kensuke, Nakajo Koichi, Egashira Yoshihiro, Yamamoto Yasuhiro, Kitada Kazuya, Taniguchi Kohei, Kawai Masaru, Tomiyama Hideki, Kawakami Koichi, Uchiyama Kazuhisa, Ono Fumihito	4. 巻 30
2. 論文標題 Gastrointestinal Neurons Expressing HCN4 Regulate Retrograde Peristalsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2879 ~ 2888 .e3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.02.024	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zempo B, Yamamoto, Y., Williams, T., Ono	4. 巻 6
2. 論文標題 Synaptic silencing of fast muscle is compensated by rewired innervation of slow muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aax8382	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本耕裕、菱川大介、小野富三人
2. 発表標題 ゼブラフィッシュでは高温下においてTrpv4を介して アポトーシスと精子運動性を制御する
3. 学会等名 日本動物学会 第94回大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------