

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780201
 研究課題名 (和文)
 父性ゲノム刷り込み領域の決定
 研究課題名 (英文)
 Determination of paternally methylated imprinted regions in mouse genome
 研究代表者
 川原 学 (KAWAHARA MANABU)
 佐賀大学・農学部・准教授
 研究者番号：70468700

研究成果の概要 (和文)：哺乳類の雌雄ゲノムには決定的な機能差があり，刷り込み遺伝子と呼ばれる片親性に発現する特殊な発現様式の遺伝子群のうち精子側で制御されているものを父性メチル化刷り込み遺伝子という．これまで3箇所の父性メチル化刷り込みを受ける領域がわかっているが，いずれの領域が個体発生に重要なのか未だ決定されていない．これらについて卵子ゲノムのみで個体発生系として他に例のない研究アプローチである二母性マウス胚作出系を利用して研究を展開し，7番染色体上の *H19* メチル化調節部位 (DMR) と 12番染色体上の IG-DMR の2領域に含まれる刷り込み遺伝子の機能を明らかにするとともに，これら遺伝子の適切な発現レベルの維持が正常なマウス個体発生に必須であることを証明した．

研究成果の概要 (英文)：Parental genome functions in ontogeny are determined by interactions among transcripts from the maternal and paternal genomes, which contain many genes whose expression is strictly dependent on their parental origin as a result of genomic imprinting. Comprehensive recognition of the interactions between parental genomes is important for understanding genomic imprinting in mammalian development. The bi-maternal embryos were produced by the construction of oocytes from fully grown oocytes and nongrowing oocytes that contain double deletions in the *H19* differentially methylated region (DMR) and the *Dlk1-Dio3* intergenic germline-derived DMR. Through a sequence of studies, we demonstrated that analyses of ng/fg bi-maternal conceptuses helped in elucidating the roles of paternally methylated imprinted genes in mouse ontogeny.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,400,000	420,000	1,820,000
21年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：ゲノムインプリンティング，核移植，バイオインフォマティクス，胎盤形成

1. 研究開始当初の背景

近年の応用動物生殖科学分野の進展により、胚性幹細胞や体細胞を未分化状態に転換した iPS 細胞などからの生殖細胞形成が現実のものとなりつつある。この‘人工生殖細胞作出技術’を真に実現させるためには、得られた生殖細胞の正常性評価は不可避である。生殖細胞の正常性にとって、通常体内でなされるゲノム刷り込み現象による適切な DNA メチル化修飾の獲得は最重要な問題といえる。なぜなら正常なゲノム刷り込み(インプリンティング)の獲得は生殖細胞が次世代を成すために哺乳類では必須の現象だからである。しかし、現段階ではマウスゲノム上の被ゲノムインプリント領域の情報が完全に揃っているとはいえない。一方、雄の遺伝的な関与が全く無い状態でマウスの生殖を実現させる二母性マウス作出系が開発された(Kawahara et al., Nat Biotech, 25, 2007)。二母性胚作出には、新生子由来卵子核と通常の成体由来卵子核を融合する核移植の手法に加え、以下に示す2箇所(2箇所)の父性メチル化インプリント領域に注目しなくてはならない。すなわち、7番染色体にある *Igf2-H19* 領域と、12番染色体上にある *Dlk1-Gt12* 領域の2つの領域である。また、父母アレル間で異なるメチル化インプリント状態を示すメチル化発現調節領域(differentially methylated region, DMR)は、インプリント遺伝子の発現を制御している。そこで、*Igf2-H19* 領域の遺伝子発現を雄性化することに着手した。これらの遺伝子は、*H19* 遺伝子上流にある DMR のメチル化によって発現が制御されている。*H19* 遺伝子の転写領域と転写調節領域を欠損した K0 マウス (*Dch7* マウス) 新生仔の ng 卵子 (ng^{Dch7}) と成熟野生型マウスの fg 卵子からなる ng^{Dch7}/fg 二母性胚を構築し、その発生能を検討したところ、そのほとんどが胎生期間中に致死となり胎子および胎盤の形態にも特徴的な異常がみられた。次に、12番染色体上の *Dlk1-Gt12* 領域に注目し、*Gt12* 遺伝子上流の IG-DMR のメチル化状態によって発現が制御されていることから、7番染色体同様に IG-DMR を欠損させた K0 マウス (*Dch12*) を利用して *Dlk1-Gt12* 領域のインプリント遺伝子発現を雄性化した。しかし、この ng^{Dch12}/fg 二母性胚もまた妊娠満期にまでは発生延長を示すものの、その後の自発呼吸はみられず、やはり雌ゲノムの雄ゲノムへの変換は不十分であることが判明した。そこで、*Dch12*-K0 マウスと前述の *Dch7*-K0 マウスを交配させることによって、7および12番染色体上の DMR を共に欠いた *Ddouble*-K0 マウス (*Ddouble*) を作製した。この ng 卵子 (ng^{Ddouble}) を利用して ng^{Ddouble}/fg 二母性胚を作製し個体までの発生率を調べた。期待通り、体外受精胚同様の発生率で正常な成熟雌マウスにまで発育した。

この精子ゲノムが一切関与しないマウス個体発生系を用いれば、個体発生に重要な父性メチル化刷り込み領域を決定できるかもしれないと考えた。また、父性メチル化インプリント遺伝子の機能解析にも応用できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、とくに雄側での被ゲノム刷り込み領域情報とその生物学的な機能を明らかにすべく、雄ゲノムを必要としない二母性マウス胚作出系を最大限活用し、マウス個体発生に重要な父性メチル化刷り込み領域の決定を第一の目的とした。具体的には、(1) 胎生期間中の胎子生存に必須な胎盤形成を正常に行わせるために重要な領域の決定、(2) 胎子発生中の血管新生関連遺伝子発現に影響を及ぼす父方メチル化刷り込み遺伝子 *Igf2* の役割、(3) 雌雄ゲノム構成が個体の寿命に及ぼす影響、以上の3点に焦点を絞って研究を展開した。

3. 研究の方法

二母性胚の作出は連続する2回の核移植からなる。すなわち、(1) 減数分裂能を持たない、小型の卵子の核を、成長を完了し減数分裂可能な卵母細胞に核移植し、減数分裂を誘導する。(2) (1) で形成された半数体の MII 分裂装置を、第二減数分裂中期の排卵卵子へ再核移植する。この連続核移植手法の開発により、卵母細胞ゲノムにおけるインプリント遺伝子発現パターンを父性(精子ゲノム)パターンへ改変することが可能となる。

(1) 減数分裂の誘導

具体的には、① *Dch12*-K0 マウスと前述の *Dch7*-K0 マウスを交配7および12番染色体上の DMR を共に欠いた *Ddouble*-K0 (二重遺伝子欠損) マウス新生子を作成する。実験により、*Dch7*-K0 または *Dch12*-K0 マウスの新生子も使用する。② 卵巣を採取して30分間 EDTA-M2 培地で培養した後、卵巣を切開して ng^{Ddouble} 卵子を分散させ回収する。また、卵核胞 (GV) 期卵(約75μm) は性腺刺激ホルモン投与42-46時間後に成熟雌マウスから回収して使用する。③ マイクロマニピュレーションにより、GV 期卵の透明帯の切断および除核を行い、レシピエント卵とする。④ 次いで、ng 卵子をセンダイウイルス (HVJ) とともにレシピエント卵の卵胞腔内に注入し融合させる。⑤ 核移植操作を完了後、14時間の体外成熟培養を行い、第一極体の放出および第二減数分裂中期分裂装置を形成させる。

(2) 2倍体二母性胚の構築

① (1) で作出された第二減数分裂中 (MII) 期卵を選別・回収する。② 排卵卵子を準備し、MII 期卵の分裂装置 (MII 期染色体) の位置を顕微鏡下で確認し、その対角線上に位置す

る透明帯をマイクロマニピュレーションにより切断する。③再び構築卵子に形成された MII 期染色体を、HVJ と共に排卵卵子に移核移植する。④移植後直ちにインキュベートしたのち、さらに1時間体外培養し完全に細胞融合させる。⑤融合卵子を 10mM SrCl₂ を含む M2 培地で 4~6 時間培養して卵子を活性化させる。この活性化処置により、2つの第二極体および2つの雌性前核が形成され、ng 卵子と fg 卵子の半数体ゲノムを持つ二母性胚 (ng/fg 胚) が完成する。⑥作出された2倍体二母性胚を3日間体外培養し、胚盤胞に発生させ、偽妊娠雌の子宮に移植して胎子あるいは産子へ発生させる。

(3)胎盤のマイクロアレイ法による In silico 解析

①RNA 抽出と品質検定

RNA 抽出は RNeasy Micro Kit (QIAGEN) を用いて行った。Buffer RLT に β -メルカプトエタノールを 10 μ l/ml となるように添加し、50 μ l ずつ 1.5ml チューブに分注した。E12.5 の胎盤サンプルを、チューブ中の Buffer RLT に出し、胎盤を溶解させた。サンプルは RNA 抽出を行うまで -80°C の冷凍庫で保存した。total RNA の溶出には最も高濃度で RNA が溶出できるように 10 μ l の RNase Free Water で溶解し、フィルター後に 9 μ l の total RNA 溶出液を得た。抽出した total RNA のクオリティをチェックするために、Experion RNA High-Sens Kit (Bio-Rad) を用いてキャピラリー電気泳動を行った。total RNA のサイズ分布を見ることにより、RNA の分解度合いを推測し、クオリティのチェックを試みた。

②RNA ラベリング

One-Cycle Labeling Kit (Affymetrix) に続いて、MEGAscript® T7 Kit (Ambion) を用いて RNA の増幅を行った。cDNA 合成した後、IVT ラベリングキットを用いてビオチンラベルを行った。ビオチンラベルした cRNA のハイブリダイゼーション効率を高めるためにマグネシウムイオンを添加して加水分解し、cRNA を断片化した。cRNA 合成、cRNA の断片化が正しくなされたかを確かめるために、Experion StdSens Kit を用いて、cRNA のサイズ分布を確認した。断片化した cRNA を用いてハイブリダイゼーションカクテルを作成した。GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 array (Affymetrix) にハイブリダイゼーションカクテルをアプライし、GeneChip® Hybridization oven 640 (Affymetrix) 内で 45 度 60rpm の条件で 16 時間ハイブリダイズした。続いて GeneChip® Scanner 3000 (Affymetrix) で各プローブセットの発光強度を測定し、Genechip Operations Software 1.2 を用いて各プローブセットの発光強度からバックグラウンドの値を引き、Raw 値と

Present, Marginal, Absent の Flag 値を得た。

③遺伝子発現解析

遺伝子発現解析は遺伝子発現解析ソフトウェア GeneSpring 7.3 を用いて行った。GeneChip Operating software で得られるデータは Raw 値、Flag 値である。Raw 値は1転写産物を基に設計されたプローブセットの発光量からバックグラウンドの値を引いた値であり、その値はターゲットとなる mRNA のハイブリダイズ量に依存する。Flag 値は、ターゲットとなる配列と同様である陽性プローブ (PM: Perfect Match) と、意図的にプローブ内中心の1塩基を異なるもので設計した陰性プローブ (MM: Miss Match) との発光量の差を用いてソフトウェアが判断して得られる値で、プローブセットが排出したデータの信頼性を評価する指標である。これらの二つ値を GeneSpring 7.3 (Agilent) にインポートし解析した。Raw 値が低い遺伝子は信頼性が低い。このような遺伝子をすべて解析の対象から外すことで、信頼性の高いデータを得ることが出来る。しかし、仮に Raw 値が低かった遺伝子が、あるサンプルでは発現しているが、あるサンプルでは発現していないという場合、この遺伝子は解析の対象に残したほうがよい。したがって、研究で解析の対象にするのは、信頼性の高い Raw 値 100 を少なくとも1サンプル以上で示した遺伝子とした。

④Condition tree の作成

野生型 (wt) マウス胎盤の遺伝子発現パターンと比較するために、二母性マウス胎盤の遺伝子発現パターンの相関でサンプルを並び替え、Condition tree を作成した。

Similarity Measure は Pearson Correlation で、Clustering Algorithm は Average Linkage で行った。

⑤PCA 解析 (Principal Component Analysis)

発現パターンを可視化するためにすべてのサンプルについて PCA 解析を行った。設定はデフォルトのまま行った。

⑥1 WAY ANOVA with post hoc test

遺伝子型の異なる二母性マウスにより、有意に発現変動した遺伝子群を抽出するために、1 WAY ANOVA with post hoc test に供した。

⑦遺伝子パスウェイ解析

二母性マウス胎盤の特性を表す遺伝子群の機能解析を行うために、得られた遺伝子リストを Ingenuity Pathway Analysis (IPA) で解析した。すべての遺伝子を解析の対象とし、供試する遺伝子のカットオフは行わなかった。ドナー細胞特異的に発現変化を示した遺伝子の数は非常に大きく、機能推定結果の特異性が下がることが予想されたので差次的発現を示した遺伝子群のうちさらに 2 fold change を示した遺伝子群を解析に供した。

(4) Real-time PCRによる遺伝子発現解析
Real-time PCRにより、マイクロアレイから二母性マウス特異的な発現パターンを示す遺伝子の発現レベルを決定した。また、*Igf2*の発現レベルを人為的に調節した二母性マウスの胎子についてE12.5の発生ステージにおける血管新生関連遺伝子の発現レベルについても同様の方法で調べた。

(5) 二母性マウスの寿命解析

二母性マウスの寿命について、*Igf2-H19*領域と *Dlk1-Dio3*領域の双方を父性化した $ng^{Ddouble}/fg$ 二母性マウスを使って調べた。対象区としては、二母性マウスと同日に出生した wt マウス (B6D2F1×C57BL6N) を用いた。給餌方法は自由摂食とし、対象区 wt マウスと二母性マウスの飼育ケージは同じ飼育棚を使って、死亡日を調べ双方の寿命を決定した。さらに、両方のマウスが8週齢まで発育した段階で白血球の成分値を比較した。

4. 研究成果

(1) 胎生期間中の胎子生存に必須な胎盤形成を正常に行わせるために重要な領域の決定

初めに7および12番染色体上の父性メチル化インプリント遺伝子発現を調節した場合の二母性マウス胎盤がどれほど wt のものに近づくのか、組織学的に比較検討を行った。その結果、 $ng^{Ddouble}/fg$ 胎盤は、迷路層および基底層、巨細胞の形態(図1abc)や迷路層の血管領域面積(図1d)など wt 胎盤と遜色ない形態を保持していることが明らかとなった。

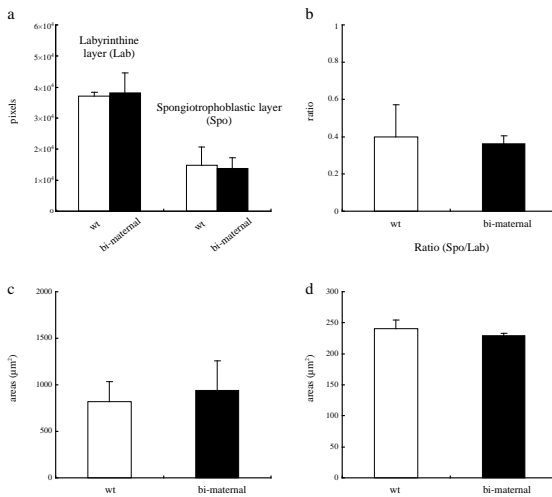


図1

野生型および $ng^{Ddouble}/fg$ 二母性マウス胎盤の比較

a: 迷路部(Lab)と基底部(Spo)の面積値, b: Lab および Spo の割合, c: 巨細胞のサイズ, d: 血管領域面積の比較.

さらに、マイクロアレイ法による遺伝子発現解析の結果、*Igf2-H19* 領域もしくはは

Dlk1-Gt12 領域のインプリント遺伝子の発現パターンの正常化によって変動する遺伝子群を決定した。クラスタリング解析の結果、それぞれのサンプルから特異的な遺伝子発現パターンを示すことがわかり(図2)、主成分(PCA)解析により裏付けられた(図3)。

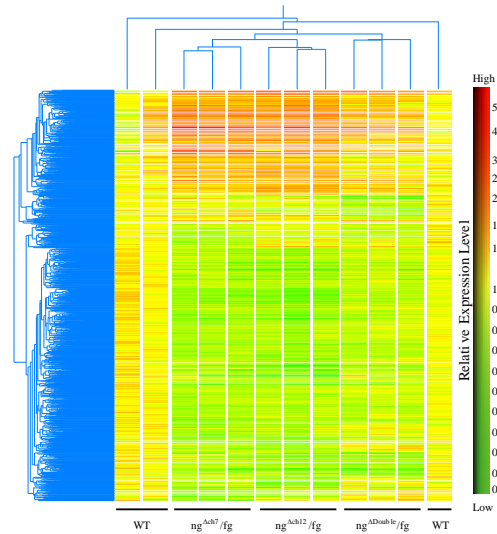


図2

それぞれのサンプルに特徴的な発現パターンを示す遺伝子を決定するために $ng^{Ddouble}/fg$ 胎盤と ng^{Ach7}/fg 胎盤、あるいは、 $ng^{Ddouble}/fg$ 胎盤と ng^{D12}/fg 胎盤を比較した。その結果、12番染色体上のインプリント遺伝子が関与する胎盤形成に必要な遺伝子群として、*Serpina6* および *Syne2* が同定された。さらに、7番染色体上のインプリント遺伝子が関与して発現が変化している遺伝子として *Tacc2*, *Aldh1a3*, *Cxcl10* がみつきり、Real-time PCRによってもその結果の正当性

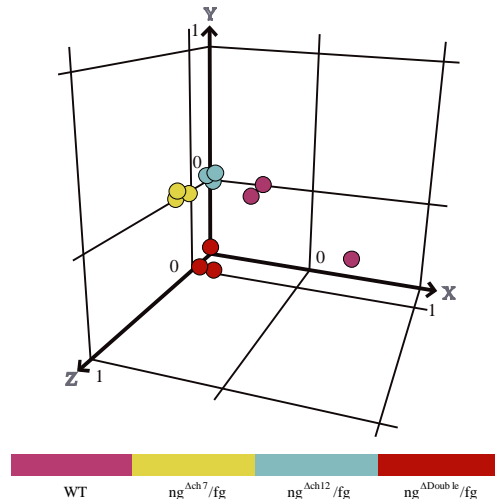


図3

が検証された。これらの遺伝子はいずれもマウス胎盤形成に関与していることは過去の研究でも示唆されておらず、本研究によって

初めてその可能性が示された。

以上の結果から *Igf2-H19* 領域と *Dlk1-Gt12* 領域において「双方の」領域におけるインプリント遺伝子の適切な発現レベル獲得が、正常なマウス胎盤形成に必要なかつ十分な条件となることが証明された。

(2) 胎子発生中の血管新生関連遺伝子発現に影響を及ぼす父方メチル化刷り込み遺伝子 *Igf2* の役割

次に細胞増殖や個体成長に重要な *Igf2* 発現レベルの回復を人為的にコントロールした場合、すなわち、完全回復を図った場合 (ng^{D13}/fg) と若干の発現回復をさせた場合 (ng^{B3}/fg)、発現レベルが抑制されている場合 (ng^{M1}/fg) の二母性マウス胎子において、血管新生に関わる遺伝子発現レベルがどのように変化するかを突き止めた。調べた血管新生関連遺伝子としては *Vegf*, *Flt4*, *Flk1* などの代表的なものである。これらを Real-time PCR 法により胎子・胎盤両方で詳細に調べた結果、血管新生に極めて重要な役割を果たし酸欠状態で発現レベルが上昇することが知られている *Vegf* について、 ng^{B3}/fg 胎子では正常値にもどらず、胎盤では *Vegf* 発現は wt 同様の発現レベルになった (図 4)。

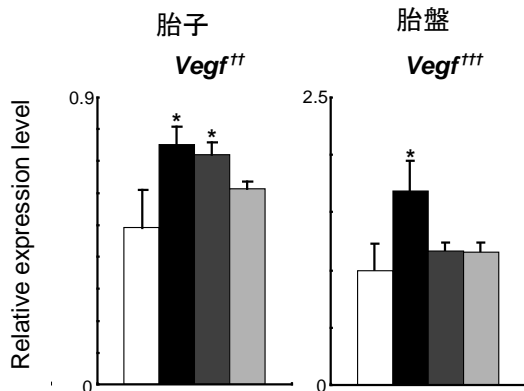


図 4

このほか、遺伝子ごとに胎子と胎盤では *Igf2* 遺伝子発現レベルに対する反応が異なっていた。したがって、胎子/胎盤固有の *Igf2* 発現に対する血管新生遺伝子の発現制御が行われていることが初めて示唆された。

(3) 雌雄ゲノム構成が個体の寿命に及ぼす影響

正常に妊娠満期まで発生する ng^{Double}/fg 二母性マウスの寿命を調べた結果、対象区とした野生型マウスと比べて約 30%以上も寿命が延長することが明らかとなった (図 5)。このことから雌雄ゲノムの構成によって寿命に影響を受けるということを哺乳類で実験的に証明することができた。さらに、二母性マウスと野生型マウスの血液を調べ、白血球のうちの好酸球の割合に有意差がみられた。こ

のことから二母性マウスでみられた寿命延長の表現型は二母性マウスにおける免疫系の変化による可能性が示唆された。

また、8 週齢時に体重を比較した結果、二母性マウスの体重は野生型マウスと比べて有意に軽いということがわかった (図 6ab)。これは、遺伝子操作を施していない 9 番染色体上の父性発現インプリント遺伝子である *Rasgrf1* の発現が二母性マウスでは抑制されていることに起因していると推察された。

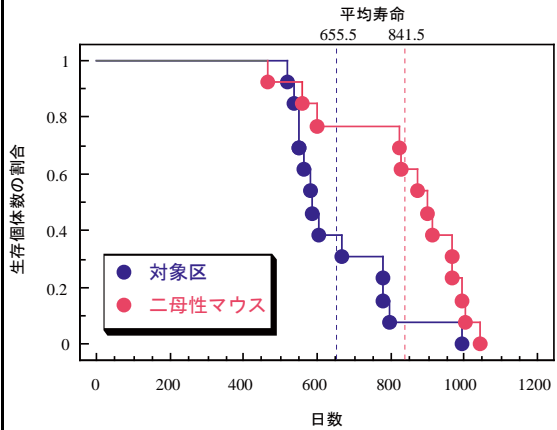


図 5

a

b

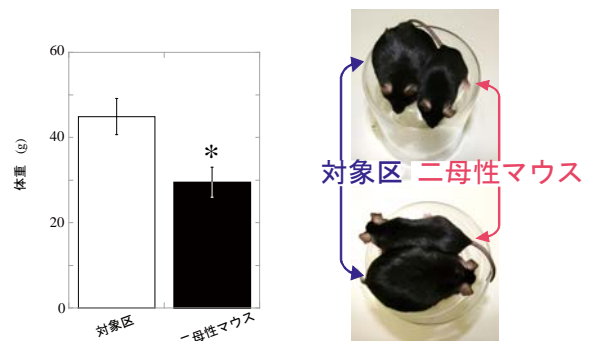


図 6

生後 20 ヶ月での体重比較 (a) と個体の写真 (b)。

以上の結果から、卵子ゲノムのみからの個体発生というユニークな実験系を用いて、通常は精子ゲノム上に付加される父性メチル化インプリント領域のうち、個体発生に重要な領域は 7 番および 12 番染色体上の *H19*-DMR と *IG*-DMR の 2 箇所であることを証明することができた。さらに、これら 2 領域にある父性メチル化インプリント遺伝子群は胎盤形成において相補的な役割を果たし、7 番染色体上の遺伝子群は個体の成長、細胞の増殖を制御し、一方の 12 番染色体上の遺伝子群は細胞の分化調節を統御していることを初めて示すことができた。本研究によりこれまで証明が困難であった、個体発生に重要な父性メチル化インプリント領域はどこか

という問題に対して、明快かつ確固たる証明に成功したといえる。

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 6 件)

①杉村智志, 横尾正樹, 山中謙一, 川原学, 森安悟, 若井拓哉, 永井卓, 阿部宏之, 佐藤英明, Anomalous oxygen consumption in porcine somatic cell nuclear transfer embryos, Cellular Reprogramming, 査読有, 2010, 印刷中

②川原学, 河野友宏, Longevity in mice without a father, Human Reproduction, 査読有, 25 卷, 2010, 457-461

③川原学, Qiong Wu, 河野友宏, Involvement of insulin-like growth Factor 2 in angiogenic factor transcription in bi-maternal mouse conceptuses, Journal of Reproduction and Development, 査読有, 56 卷, 2010, 79-85

④杉村智志, 山中謙一, 川原学, 若井拓哉, 横尾正樹, 佐藤英明, Early metaphase II oocytes treated with dibutyl cyclic adenosine monophosphate provide suitable recipient cytoplasm for the production of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos, Animal Science Journal, 査読有, 81 卷, 2010, 48-57

⑤山中謙一, 杉村智志, 若井拓哉, 川原学, 佐藤英明, Acetylation level of histone H3 in early embryonic stages affects subsequent development of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos, Journal of Reproduction and Development, 査読有, 55 卷, 2009, 638-644

⑥川原学, 森田慎之介, 高橋望, 河野友宏, Defining contributions of paternally methylated imprinted genes at the Igf2-H19 and Dlk1-Gtl2 domains to mouse placentation by transcriptomic analysis, Journal of Biological Chemistry, 査読有, 284 卷, 2009, 17751-17765

[学会発表] (計 4 件)

①川原学, 森田 慎之助, 高橋 望, 河野友宏. 二母性マウス胚由来胎盤における網羅的遺伝子発現解析. 第 102 回日本繁殖生物学会, 奈良, 2009. 9. 10~11

②河野 友宏, 塚平 俊貴, 川原学. 二母性マウスの長命性について. 第 102 回日本繁殖生物学会, 奈良, 2009. 9. 12

③塚平 俊貴, 川原学, 河野友宏. マウス二母性胚の発生に対する父性メチル化制御インプリント遺伝子の発現アレルの影響. 第 50 回日本哺乳動物卵子学会, 東京, 2009. 5. 8~9

④川原学. “精子無し”マウスの作り方. 日本動物学会九州支部, 日本植物学会九州支部および日本生態学会九州地区三部合同例会, 佐賀, 2008. 11. 8

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川原 学 (KAWAHARA MANABU)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号: 70468700