

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570009

研究課題名（和文）体細分化と生殖細胞分化におけるゲノム刷り込みの成立と消去

研究課題名（英文）Establishment and erasure of genomic imprinting during somatic and germline differentiation

研究代表者

三瀬 名丹 (MISE NATHAN)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：00360644

研究成果の概要（和文）：

ゲノム刷り込みは、遺伝子はその由来する親によって異なる現象で、片親由来の遺伝子のみが機能することをいう。ゲノム知り込みは、DNA のメチル化による制御を受けているが、どのようにして得意な発現様式が確立するかについての詳細は明らかではない。本研究では、ES 細胞の試験管内分化誘導系を用い、刷り込み型遺伝子発現が細胞分化にともなって成立してくることを明らかにし、その分子基盤を解析する解析系の確立を行った。

研究成果の概要（英文）：

Genomic imprinting is a gene regulatory mechanism in which genes only derived from one parent to work. Genomic imprinting is known to be regulated by DNA methylation, but detail molecular mechanisms establishing parent-of-origin dependent gene expression pattern is still unclear. In this study, we showed that the expression pattern of imprinted gene is established accompanying cell differentiation using with an ES cell in vitro differentiation system. We further established a in vitro cell culture system to analyze detailed molecular mechanisms of establishment of imprinted expression pattern of imprinted genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、遺伝・ゲノム動態

キーワード：ゲノム刷り込み、DNA メチル化、ES 細胞、試験管内分化系、遺伝子発現、エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

近年、DNA のメチル化やヒストンの修飾といったエピジェネティックな修飾が遺伝子発現に大きな役割を持つことが明らかとなり、国内外で盛んに研究されている。ゲノム刷り込みは、エピジェネティックな制御を行う遺伝子発現制御の代表的な例であり、生殖細胞形成過程においては、刷り込み遺伝子のエピジェネティック修飾を取り除くゲノム再プログラム化が起き、配偶子形成過程で新たな修飾が行われ、体細胞へと伝えられる。

マウスの ES 細胞は、生殖細胞を含むすべての細胞系譜に分化できる細胞であり、哺乳類の胚発生のモデル系や発生工学のツールとしての重要性が高いだけでなく、再生医療分野での期待も非常に高い。始原生殖細胞(PGC)は、将来、精子あるいは卵子となる細胞で、生殖細胞を形成する細胞である。PGC は ES 細胞と共通する遺伝子群(たとえば Oct3/4 や Nanog) を発現しており、遺伝子発現レベルでの類似性が指摘されてきた。また、ES 細胞を分化誘導することで、生殖細胞マーカーである Vasa を発現する *in vitro* PGC (iPGC) を作ることが出来る。逆に、PGC からは ES 細胞に非常によく似た性質を持つ胚性生殖(EG)細胞を樹立することが出来る。このように ES 細胞と PGC とは非常に強い関連を持っている。これまでに、完全に正常な精子や卵子を試験管内で作ることは出来ていないが(Toyooka et al. 2003, Nayernia et al. 2006)、iPGC 形成過程でも一部の刷り込み遺伝子のメチル化が減少しているという報告もあり、ゲノム再プログラム化が起きている可能性があるが、詳細な解析はまだ無い。

## 2. 研究の目的

ゲノム刷り込みは、片方の親から受け継いだ遺伝子のみが発現する現象で、DNA のメチル化やヒストン修飾などのゲノムへのエピジェネティックな修飾によって制御される。刷り込み遺伝子のエピジェネティック修飾は、生殖細胞形成過程に一旦消去され(ゲノム再プログラム化)、その後新たに配偶子それぞれで特異的な刷り込みが与えられる。また、刷り込み遺伝子は着床前には両アレルから発現しているが、着床後胚の体細胞において刷り込み型の発現が成立する(Szabo and Mann, 1995)。本研究計画は、ES 細胞の試験管内分化系を利用し、刷り込み型発現がどのように確立されるの

か、また生殖細胞分化過程でゲノム刷り込みが消去される時にどのように起きるかという両側面を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究計画においては、よく解析されている刷り込み領域である *Igf2/H19*、*Igf2r/Air* の両遺伝子領域をモデルとして、ゲノム刷り込みの成立とその消去におけるゲノム修飾(DNA メチル化、ヒストン修飾)の変化を ES 細胞の試験管内分化系を用いて解析を行う。また、この他に多数存在する刷り込み遺伝子に対しても一般化できるかどうかについて同様の解析を行う。

申請者がこれまでに樹立した ES 細胞及び、EG 細胞を用いて、ゲノム刷り込み遺伝子の発現と、そのエピジェネティック制御の解析を行う。これまでに解析を行ってきた *Igf2r* と *H19* に加えて、これらと関連が深い *Air* と *Igf2* の発現解析を行う(図 3)。予備的な解析から、これらの遺伝子も分化後の ES 細胞においては刷り込み型の発現を示すことが示唆されている。これら遺伝子についてはその刷り込み型発現の制御領域(ICR あるいは DMR)が明らかとなっているので、この領域についてのヒストン修飾の状態を修飾されたヒストンに対する抗体を用いてクロマチン免疫沈降法(ChIP)によって解析を行う。得られた発現データとクロマチン修飾の解析結果、及びすでに得ている DNA メチル化の解析結果とを合わせて、ES 細胞と EG 細胞における刷り込み遺伝子の制御機構を明らかにする。また、生殖細胞特異的に蛍光タンパク質 Venus を発現する Tg マウスから樹立された ES 細胞を分化させることによって得られる iPGC の形成過程での刷り込み遺伝子のメチル化の変化の詳細を解析することによって、ゲノム再プログラム化の進行過程を試験管内で解析する。

## 4. 研究成果

これまでに樹立した C57BL/6J (B6) と MSM/Ms (MSM) の亜種間ハイブリッド ES 細胞株を利用した試験管内分化誘導系を用い、解析してきた刷り込み遺伝子 *Igf2*、*H19*、*Igf2r*、*Air* に関して、その発現様式を PCR-RFLP 法によって解析を行い、その発現されるアレルの変化と ICR(刷り込み遺伝子制御領域)の DNA メチル化を経時的に解析した。未分化 ES 細胞においては、一次インプリントマークである

ICR では体細胞と同様のメチル化パターンが検出され、培養条件化においても DNA メチル化に変化は生じていなかった。Igf2r 遺伝子は未分化状態において両アレルから発現しており、分化に伴い母性発現へと移行していた。一方、Igf2 遺伝子は、未分化細胞では、母方由来、父方由来に関係なく未分化細胞では B6 アレルからの発現に偏っていたが、分化に伴い本来の刷り込みパターンである父性発現へと変化した。このように、未分化細胞における発現パターンは DNA メチル化に関係なく、分化に伴いメチル化による発現支配を受けるようになっており、分化前後におけるメチル化による遺伝子発現制御には違いがあることが示唆された。

始原生殖細胞 (PGC) を特定の条件下で培養することによって得られる EG 細胞は、形態的には ES 細胞と区別できないほどよく似ているが、その由来が違うことから、ゲノム再プログラム化が起きる PGC の性質を引き継いでいることが予想されていた。そこで、上記亜種間ハイブリッド胚 (胚性 12 日目) から多数の EG 細胞を樹立し、ES 細胞と同様に刷り込み遺伝子の DNA メチル化とその発現を調べた。Line1 や IAP などのゲノム中に散在する繰り返し配列のメチル化の程度に大きな違いは見られなかったが、刷り込み遺伝子の ICR については、雌雄の EG 細胞において全くメチル化されておらず、PGC のメチル化パターンを引き継いでいることがわかった。これらの EG 細胞を分化させてみたところ、分化後は両アレルから発現しており、ICR のメチル化が失われることで、刷り込み型遺伝子発現様式が確立できなくなっていることがわかった。

さらに、分化前後における Igf2、Igf2r の ICR 部分のメチル化について解析したところ、DNA のメチル化について変化は見られなかった。また、刷り込み型発現にともなってメチル化が起きる 2 次的刷り込みとして知られる、Igf2r 遺伝子プロモーター領域においては、ES 細胞では、細胞分化後に発現抑制される父型アレルでメチル化が起きるのに対して、EG 細胞ではランダムにメチル化が起り、結果的に約 50% のメチル化状態となることがわかった。

さらに詳細な解析を進めるためにヒストン修飾の変化の解析を行うためにクロマチン免疫沈降法 (ChIP) を開始したが、現状では、ES 細胞がフィーダー細胞に依存しているために、解析系へのフィーダー細胞の混入がバックグラウンドとして検出されてしまい、詳細な解析が困難であることが明らかとなった。そこで、あらためてフィーダー非依存型の ES 細胞の樹立を行った。これまでに、B6 由来の ES 細胞株 9 ライン、B6 x JF1 由来の ES 細胞株 13 ライン、JF1 x B6 由来の ES 細胞

株 7 ラインを樹立し、その性状解析を行なっている。また、試験管内分化系についても改めて検討を行ったところ、96 ウェルプレートを利用した胚様体系性が最も自然に近い形で分化マーカーを発現することが分かってきたので、その条件の最適化を行なっている。条件によっては、ほぼすべての胚様体が終末分化の表現型マーカーである心筋の拍動を示し、より自然に近い状態で他の細胞の混入がない形での解析を行うことができる実験系を確立しつつある。

## 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 5 件)

① Yuko Hoki, Rieko Ikeda, Nathan Mise, Yuka Sakata, Tatsuya Ohhata, Hiroyuki Sasaki, Kuniya Abe, and Takashi Sado. Incomplete X-inactivation initiated by a hypomorphic Xist allele in the mouse. *Development* 2011 dev.061226; published ahead of print May 25, 2011, (査読有) doi:10.1242/dev.061226

② Chow J. C., Ciaudo C., Fazzari M. J., Mise N., Servant N., Glass J. L., Attreed M., Avner P., Wutz A., Barillot E., Grealley J. M., Voinnet O., Heard E. "LINE-1 Activity in Facultative Heterochromatin Formation during X Chromosome Inactivation." *Cell*, 141, 956-969, 2010 (査読有)

③ Imamura M. Aoi T., Tokumasu A., Mise N., Abe K., Yamanaka S., and Noce T. "Induction of primordial germ cells from mouse induced pluripotent stem cells derived from adult hepatocytes." *Mol. Reprod. Dev.* 77, 802-811, 2010 (査読有)

④ Kobayashi S., Fujihara Y., Mise N., Kaseda K., Abe K., Ishino F., and Okabe M. "The X-linked imprinted gene family Fthl17 shows predominantly female expression following the two-cell stage in mouse embryos" *Nucleic Acids Research*, 38, 3672-3681, 2010. (査読有)

⑤ Ogonuki N, Inoue K, Hirose M, Miura I, Mochida K, Sato T, Mise N., Mekada K, Yoshiki A, Abe K, Kurihara H, Wakana S, Ogura A. A high-speed congenic strategy using first-wave male germ cells. *PLoS ONE* 4, e4943, 2009 (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

①三瀬名丹、近藤昌代、阿部訓也: "ES/EG 細胞試験管内分化系を用いたゲノム刷り込み型遺伝子発現の解析" 日本遺伝学会第 81 回大会. (20090917). 長野県・松本市

②三瀬名丹、近藤昌代、池田理恵子、阿部訓也: "Analysis of germline differentiation in vitro using mouse ES cell lines that express germline specific fluorescent reporter" 日本分子生物学会第 32 回年会. (20091209). 神奈川県・横浜市

③三瀬名丹、近藤昌代、阿部訓也: "New in vitro model for analyzing impact of DNA methylation and demethylation to imprint genes" Keystone Symposia (Developmental Origins and Epigenesis in Human Health and Disease) (20100427). Singapore

④三瀬名丹: "刷り込み型遺伝子発現における DNA メチル化の影響:ES 細胞を用いた解析" 第 19 回日本臨床環境医学会学術集会シンポジウム. (20100702). 東京都・港区

⑤三瀬名丹、近藤昌代、阿部訓也: "マウス Igf2r 遺伝子の刷り込み型遺伝子発現の成立に関わる DNA メチル化の ES 細胞を用いた解析" 日本遺伝学会第 82 回大会. (20100921). 北海道・札幌

⑥三瀬名丹、香山不二雄: "環境汚染物質の胎児期暴露評価・解析系としての ES 細胞" 環境ホルモン学会第 14 回研究発表会 (20111201). 東京都・文京区

⑦三瀬名丹、香山不二雄: "Embryonic stem cell test (EST): toward epigenetic analyses for fetal exposure to environmental pollutants" 日本分子生物学会第 34 回年会 (20111213). 東京都・文京区

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三瀬 名丹 (MISE NATHAN)  
自治医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 00360644

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :