

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4月18日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780248

研究課題名（和文）体外操作胚特異的に発現する新規DNAメチル基転移酵素の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of the *de novo* DNA methyltransferase specific for *in vitro*-manipulated embryos

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（和文）：

体外受精や、体外培養などの体外操作胚はしばしばインプリント遺伝子やセントロメア近傍のリピート配列にメチル化異常を示す。我々は体外操作胚特異的に発現する新規 DNA メチル基転移酵素の選択的スプライシングバリエント、*Dnmt3b*Δ5 を発見した。体外でのメチル化活性測定実験では、この *Dnmt3b*Δ5 が正常なバリエントに比べて、ほとんどメチル化活性がないことが分かった。我々の発見は、*Dnmt3b*Δ5 が体外操作胚での低メチル化に関与していることを示している。

研究成果の概要（英文）：

In vitro-manipulated embryos, such as *in vitro* fertilization (IVF), *in vitro* culture (IVC) embryos often exhibit abnormal DNA methylation patterns in imprinted genes and centromeric and pericentromeric satellite repeats. In this study, we found an alternatively spliced variant of *Dnmt3b* lacking exon 5 (*Dnmt3b*·5) that is specific to mouse IVC embryos. *In vitro* methylation activity assays showed that *Dnmt3b*·5 had lower activity than normal *Dnmt3b*. Our findings suggest that *Dnmt3b*·5 could induce a hypomethylation status especially in *in vitro* manipulated embryos.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：応用動物科学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

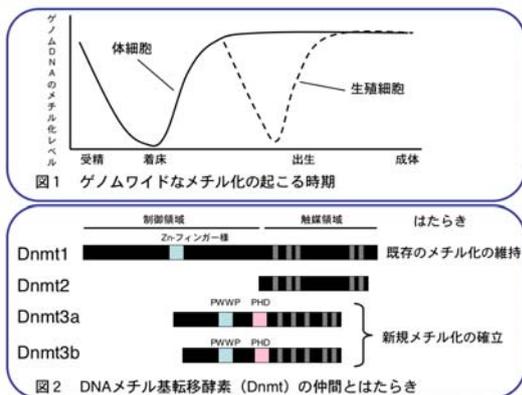
キーワード：エピジェネティクス、メチル化、受精卵、体外操作

1. 研究開始当初の背景

真核生物では一部の例外を除いてゲノム DNA のシトシン塩基 (C) の 5 位がしばしばメチル化修飾を受ける。ゲノム全体を見渡してみ

ると、グアニン (G) +C 含量が相対的に高い領域が島状に散在し、これを CpG アイランドと呼ぶ。一般に転写されている遺伝子のプロモーター領域の CpG は低メチル化状態になっ

ており、逆に不活性な遺伝子の CpG は高度にメチル化されており、メチル化状態により遺伝子の転写が調整されている。脊椎動物では細胞が分化する過程で遺伝子領域のメチル化状態がゲノムワイドに変化する。特に哺乳類では、生殖細胞が成熟する過程と、受精して胚が発生する初期にメチル化模様が大きく書き換えられる(図1)。この DNA をメチル化する DNA メチル基転移酵素(Dnmt)はいくつか知られているが、新たなメチル化模様を書き込む酵素は Dnmt3a と Dnmt3b である(図2)。それぞれにいくつかのバリエーションが存在するが、その役割分担についてはよくわかっていない。Dnmt3b^{-/-}マウスは妊娠中期に発生を停止し、セントロメアのリピード配列の脱メチル化を示すことから、Dnmt3b は発生において重要な役割を担っていると考えられる。また、ヒトでも Dnmt3b の変異はセントロメアのリピード配列の脱メチル化を生じさせ、染色体異常を引き起こし、最終的に ICF 症候群などの疾患となることが知られている。



ところで、体外受精や体外培養、顕微授精、体細胞核移植などの技術は、不妊治療や発生工学にとって今日では欠かすことのできない技術である。しかし、体外操作した受精卵から生まれてきた子供は、Beckwith-Wiedemann 症候群(BWS)や Angelman 症候群(AS)などの発生率が高いことが知られている。これらの疾患は、ゲノムのメチル化異常によって引き起こされることが分かってきた(図3)。体外における胚操作によって生まれた家畜でも、同様にメチル化異常が原因と考えられる疾患がしばしば見受けられる。しかし、なぜ体外操作を行うとメチル化異常が誘導されやすいのか、その原因はよくわかっていない。申請者はこれまでに体外培養によってインプリント遺伝子のメチル化状態が変化し、その発生能にも影響を及ぼすことを明らかにしてきた(Horii et al., *Stem Cells*, 2008)。そして最近になって、体外操作胚で特異的に発現する Dnmt3b の新しいバリエーション(Dnmt3b Δ5)を発見した。さ

らに Dnmt3b Δ5 の中でもいくつかのバリエーションがあることが分かってきた。Dnmt3b は前述の通り、ゲノムに新たなメチル化模様を書き込むので、Dnmt3b Δ5 は体外操作胚で何らかのメチル化変化を生じさせている可能性がある。興味深いことに、Dnmt3b Δ5 は体外操作胚以外にも、癌細胞などのメチル化異常細胞でも高発現していることが分かってきた。これらのことから、Dnmt3b Δ5 は何らかのメチル化異常を体外操作胚で引き起こしている可能性が高いことが示唆される(図3)。

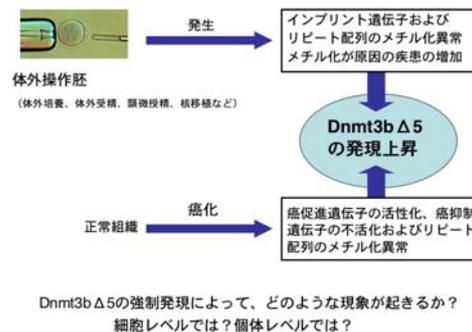


図3 これまで得られている研究結果と展望

2. 研究の目的

本研究では、Dnmt3b Δ5 が体外操作胚の DNA のメチル化状態にどのような影響を及ぼすのか明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

Dnmt3b Δ5 の役割について明らかにするために、以下に示す実験を行う。体外操作胚で発現している Dnmt3b Δ5 が他にどの発生段階で発現しているのかマウス胚を使って詳しく調べる。また、Dnmt3b Δ5 タンパクを精製し、生化学的なメチル化活性を調べる(大阪大学・田嶋正二博士らとの共同研究)。さらに、初期胚とよく似た性質を持つ ES 細胞に Dnmt3b Δ5 を強制発現させて、メチル化状態にどのような変化がもたらされるのか調べる(群馬大学・畑田出穂博士との共同研究)。

4. 研究成果

1) Dnmt3b Δ5 の発現場所:

Dnmt3b は着床前頃から発現がいったん上昇し、9.5 日胚を過ぎる頃には減少している。Dnmt3b Δ5 は体外培養した胚盤胞期胚で高発現していたが、体内から取り出した胚盤胞期胚ではあまり発現していなかった。一方、それらを仮親に移植し、7 日後(E9.5)に回収したところ、どちらの胚においても Dnmt3b Δ5 はほとんど発現していなかった(Fig. 1)。一方、体外操作胚(体外培養胚、単為発生胚、体細胞核移植胚など)から樹立した ES 細胞株においても、Dnmt3b Δ5 の高発現が確認さ

れた (Fig. 2)。EC 細胞 (embryonic carcinoma; P19) においても高発現が見られたが、分化誘導を行うと発現比率が減少した。以上より、このバリエントは着床前の胚盤胞の内部細胞塊由来細胞で特に多く発現しており、分化とともに発現量が減少すると推測される。

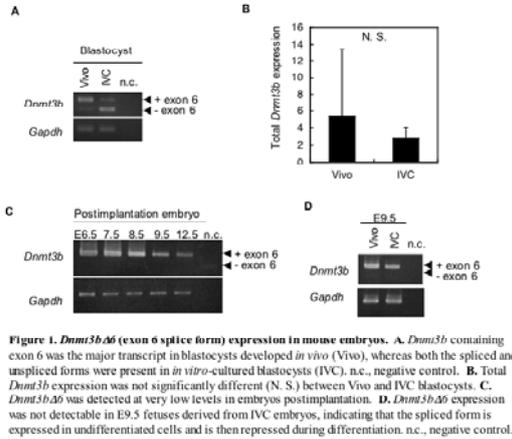


Figure 1. *Dnmt3bΔ6* (exon 6 splice form) expression in mouse blastocysts. A. *Dnmt3b* containing exon 6 was the major transcript in blastocysts developed *in vivo* (Vivo), whereas both the spliced and unspliced forms were present in *in vitro*-cultured Blastocysts (IVC). n.c., negative control. B. Total *Dnmt3b* expression was not significantly different (N.S.) between Vivo and IVC blastocysts. C. *Dnmt3bΔ6* was detected at very low levels in embryos postimplantation. D. *Dnmt3bΔ6* expression was not detectable in E9.5 fetuses derived from IVC embryos, indicating that the spliced form is expressed in undifferentiated cells and is then repressed during differentiation. n.c., negative control.

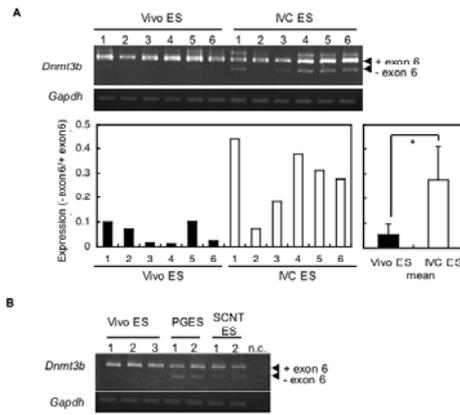


Figure 2. *Dnmt3bΔ6* (exon 6 splice form) expression in mouse ES cells. A. *Dnmt3bΔ6* was more highly expressed in IVC embryo-derived ES cells (IVC ES) than in ES cells generated from *in vivo*-developed blastocysts (Vivo ES). * $P < 0.05$. B. *Dnmt3bΔ6* was more highly expressed in ES cells that had been generated from *in vitro*-manipulated embryos, such as those generated by parthenogenesis (PG) and somatic cell nuclear transfer (SCNT). n.c., negative control.

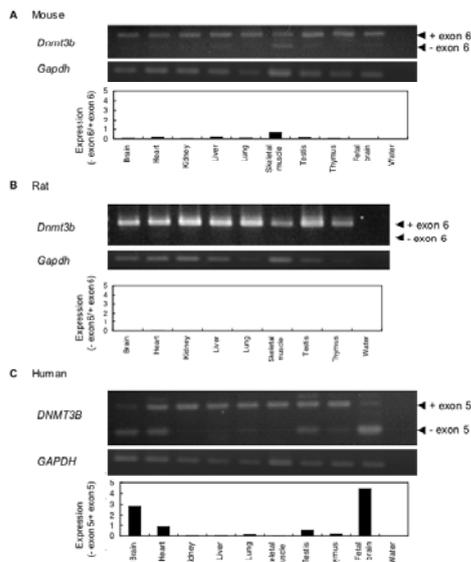


Figure 3. *Dnmt3bΔ6* (DNMT3BΔ5) expression in various tissues. *Dnmt3b* containing exon 6 was the abundantly expressed variant in mouse tissues (A) and in rat tissues (B). C. In humans, DNMT3B lacking exon 5 was the predominant form in adult and fetal brains.

一方、マウス、ラット、ヒトの体組織での *Dnmt3bΔ5* の発現を調べたところ、マウスとラットではほとんど発現が見られなかった。しかし、ヒトでは成体および胎児の脳で *Dnmt3bΔ5* の顕著な発現が確認された (Fig. 3)。

2) 生化学的メチル化活性:

共同研究者である阪大・田嶋正二博士、末武勲博士らとバキュロウイルスを用いたタンパク発現系により、昆虫細胞 (sf9) に *Dnmt3bΔ5* タンパクを生成させ、DEAE セファロースカラムにて精製した。 *Dnmt3bΔ5* タンパクを基質である AdoMet および標的 DNA 配列である poly(dGdC)-poly(dGdC) と混合し、1 時間培養後、メチル化変化を測定した。その結果、 *Dnmt3bΔ5* は *Dnmt3b1* に比べてメチル化活性が低く、生体内と同じ NaCl 濃度ではほとんどメチル化活性を持たなかった (Fig. 4)。以上より、 *Dnmt3bΔ5* を主に発現している細胞は低メチル化に移行する可能性が示唆された。

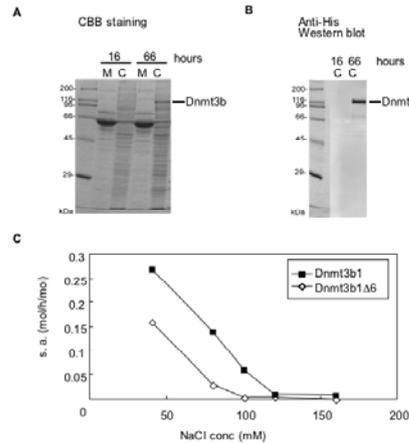


Figure 4. *De novo* methylation activity of purified *Dnmt3bΔ6*. A. Recombinant baculoviruses encoding *Dnmt3bΔ6* were generated and used to infect sf9 cells. Samples obtained 16 and 66 hours after infection were subjected to SDS-PAGE and then stained with CBB. M, medium fraction; C, cell fraction. B. Purified protein was blotted with an anti-His antibody. C. The DNA methylation activity [specific activity (s.a.) in mol/h/mol] of *Dnmt3b1Δ6* and *Dnmt3b1* was titrated with NaCl.

3) 強制発現 (培養細胞):

Dnmt3bΔ5 を pCAG-IRES-EGFP ベクターに組み込み、 *Dnmt3bΔ5* 強制発現ベクターを設計した。これらを初期胚とほぼ同じ性質を持つ ES 細胞などに導入して強制発現させた。ES 細胞から抽出した DNA はパイサルファイト処理により非メチル化シトシンをウラシルに置換後、インプリント遺伝子 (*Peg1/Mest*, *Snrpn*, *Igf2r*, *H19*, major & minor satellite など) についてメチル解析 (COBRA 法およびパイサルファイトシーケンシング) を行ったが、DNA のメチル化状態に大きな変化はなかった。

次に、P19 細胞株 (EC 細胞) に、① pCAG-Dnmt3b1 Δ 5-IRES-EGFP、② pCAG-Dnmt3b1-IRES-EGFP、③ pCAG-Dnmt3b6 Δ 5-IRES-EGFP もしくは④ pCAG-EGFP (as control)と一緒に予め *HpaII* メチラーゼ処理した *H19* 遺伝子由来 b-fragment (pEdBsl-b) をコトランスフェクションした。72時間後に細胞を回収し、GFP 陽性細胞をセルソーター (FACSCalibur HG, BD 社) で取り出した。トランスフェクション効率は①~③が約6割、④が8割であった。DNA を抽出し、バイサルファイト処理後、b-fragment 特異的プライマーを用いて PCR を行い、増幅産物を *Hpy188I* で消化した後、電気泳動によりバンドのパターンを確認した。その結果、いずれの実験区においても、メチル化された配列はそのままであった。

しかしながら、最近アメリカの研究チームからヒト大腸がん由来培養細胞に *Dnmt3b1* Δ5 を強制発現させるとセントロメア近傍のリピート配列が脱メチル化することが報告された (Gopalakrishnan ら)。このことから、使用する細胞の種類によっては、*Dnmt3b1* Δ5 に脱メチル化活性があることが考えられる。

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2件)

①Horii T, Suetake I, Yanagisawa E, Kimura M, Morita S, Nagao Y, Imai H, Tajima S, Hatada I.

The *Dnmt3b* splice variant is specifically expressed in *in vitro*-manipulated blastocysts and their derivative ES cells *J Reprod Dev.* 57: 579-585, 2011. (査読有)

②Horii T, Yanagisawa E, Kimura M, Morita S, Hatada I.

Epigenetic differences between embryonic stem cells generated from blastocysts developed *in vitro* and *in vivo* *Cell Rerogram.* 12: 551-563, 2010. (査読有)

[学会発表] (計7件)

①堀居拓郎, 柳澤永吉, 森田純代, 木村美香, 畑田出穂「低酸素培養は初期胚にエピジェネティック異常を引き起こす」第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月16日

②堀居拓郎, 末武勳, 森田純代, 木村美香, 長尾恭光, 今井裕, 田嶋正二, 畑田出穂「体外操作胚特異的に発現する新規DNAメチル基転移酵素Dnmt3bのスプライシングバリエント」第104回日本繁殖生物学会年会、盛岡、2011年9月16日

③堀居拓郎, 森田純代, 木村美香, 川又理樹, 日高京子, 長尾恭光, 落谷孝広, 畑田出穂「単為発生胚由来ES細胞の腫瘍形成とインプリント遺伝子」第5回日本エピジェネティクス研究会年会、熊本、2011年5月20日

④堀居拓郎, 木村美香, 森田純代, 日高京子, 長尾恭光, 落谷孝広, 畑田出穂「単為発生胚由来ES細胞を用いた再生医療」第33回日本分子生物学会年会、神戸、2010年12月9日

⑤Horii T, Yanagisawa E, Kimura M, Morita S, and Hatada I.

Epigenetic differences between embryonic stem cells generated from blastocysts developed *in vivo* and *in vitro*.

BIT Life Sciences' 3rd Annual Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell, Shanghai (China), 7 Dec 2010. (口頭発表)

⑥堀居拓郎, 柳澤永吉, 木村美香, 森田純代, 畑田出穂「体外受精胚および体内由来胚から樹立したES細胞のエピジェネティックな違い」第103回日本繁殖生物学会年会、十和田、2010年9月2日

⑦堀居拓郎, 末武勳, 森田純代, 木村美香, 長尾恭光, 今井裕, 田嶋正二, 畑田出穂「体外操作胚や癌で特異的に発現する新規Dnmt3bスプライシングバリエント」第4回日本エピジェネティクス研究会年会、米子、2010年5月28日

[図書] (計1件)

① Horii T & Hatada I. Reprogrammed parthenogenetic ES cells - new choice for regenerative medicine. In Methodological Advances in the Culture, Manipulation and Utilization of Embryonic Stem Cells for Basic and Practical Applications (ISBN 978-953-307-197-8, INTECH), 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕
ホームページ等

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし