

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780265

研究課題名(和文) 二母性マウス胚を用いた新規刷り込み遺伝子探索方法の開発

研究課題名(英文) Exploring novel paternally methylated imprinted genes using bi-maternal mouse fetuses

研究代表者

川原 学 (kawahara, manabu)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70468700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：インプリント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インプリント遺伝子、卵子側で制御されているものを母性メチル化インプリント遺伝子という。父性ゲノムの役割を理解するために卵子ゲノムのみで個体発生させる二母性マウス胚を用い、野生型と比較した。この結果、Mbnl1に発現差がみられた。以上の結果、二母性胚と野生型胚の比較からMbnl1の発現差が検出されたが、これはインプリント遺伝子ではなく、インプリント遺伝子の発現によって発現量が制御されている可能性が示された。

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. Comprehensive recognition of the interactions between parental genomes is important for understanding genomic imprinting in mammalian development. The bi-maternal (BM) embryos were constructed by only oocyte genomes, and therefore, analyses using those embryos enable us to investigate unknown paternally methylated imprinted genes in mouse genome. Comparing transcriptome between wild type (WT) and BM fetuses revealed that Mbnl1 expression in BM those was significantly reduced. We further examined Mbnl1 expression in uniparental fetuses, in which we found that Mbnl1 gene was downregulated in both parthenogenetic and androgenetic fetuses comparing that in WT fetus. These results suggested that Mbnl1 was non-imprinted gene but regulated by imprinted genes during development.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：個体発生 インプリント遺伝子 核移植 多型解析 卵子ゲノム

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類では、精子と卵子が受精して雌雄ゲノムからなる二倍体胚となることが次世代を残すために必須の条件となる。これは、ゲノムに刷り込まれた後天的遺伝子修飾(ゲノミックインプリンティング)により説明され、雄ゲノム(精子由来の染色体)でのみ発現する遺伝子、逆に雌ゲノム(卵子由来の染色体)でのみ発現する遺伝子が存在することによる。これらの遺伝子はインプリント遺伝子と呼ばれ、現在までに 80 個以上の遺伝子が報告されている。その発現制御において、生殖細胞の形成過程における DNA シトシンのメチル化修飾が重要な役割を果たすことが広く知られている。このとき、雌ゲノム側のメチル化修飾により発現の ON/OFF が調節されるものを“母性メチル化インプリント遺伝子”、逆に、雄ゲノム側で発現制御を受けるものを“父性メチル化インプリント遺伝子”と分けられる。すなわち、正常な個体発生が起るためには、このような雌雄両ゲノムの“非対称性”が鍵となるため、哺乳類においては、単為発生(卵子からのみの個体発生)が起らず、受精を介して両者が協調的に貢献することが個体発生に不可欠となっている。

一方、マウスでは、体細胞に由来する人工多能性幹細胞(iPS 細胞)から正常な個体発生が起る精子の作製が報告され世界に衝撃を与えた(Hayashi K. et al., Cell, 146, 2011)。これは、体外培養系のみで iPS 細胞から精子そのものを作ったわけではないが、精原細胞から精子を培養する技術も開発されていることから、近い将来に“完全試験管内”での体細胞ゲノム由来精子の作製が報告されることは間違いない。しかしここで、卵巣培養や体外受精胚などの体外培養を介した生殖細胞や胚では、安定であるはずの DNA メチル化修飾が不安定になり、高頻度にゲノム刷り込み領域の DNA メチル化状態の異常が引き起こされるという事実に注目しなければならない(Katari S, Hum Mol Genet, 18, 2005)。このことは、個体までの発生能さえ確認されれば培養系の信頼性が 100%保証されるわけではなく、DNA メチル化状態において多くの異常を抱えた細胞が産生されていることを示唆している。作製された生殖細胞や体外産生胚が、正常な父性メチル化刷り込み状態を保持しているか否かを判定する評価系の開発が急務の課題となる。

精子などの生殖細胞や体外産生胚のゲノムとしての正常性を評価する場合、父性メチル化刷り込み遺伝子の発現調節領域を完全に把握する必要がある。これまで証明され、かつ、認知されている精子形成過程で起こるメチル化修飾領域は、マウス雄ゲノムでは第 1 番、7 番、9 番、および 12 番染色体上の 4 箇所しか知られておらず、いずれも正常な個体発生に必要な不可欠である。しかし、これら以外に精子形成過程の DNA メチル化修飾により発現制御を受けるインプリント遺伝子は

無いのだろうか？ 有る場合、雄ゲノムの特性として正常性を評価する場合に必要な新規の遺伝学的情報となり、無い場合にも、既知の三領域だけに評価対象を絞り込む極めて重なる科学的な根拠となる。

### 2. 研究の目的

マウスでは完全試験管内培養系で、胚性幹細胞や人工多能性幹細胞からの生殖細胞形成が現実のものとなりつつある。この‘人工生殖細胞生産技術’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。生殖細胞の正常性評価に際し、通常体内でなされるゲノムインプリント現象による適切な DNA メチル化修飾の獲得は最重要な問題である。しかしながら、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ない。本研究では、とくに雄側での被ゲノムインプリント領域情報とその生物学的な機能を明らかにすべく、申請者が開発した雄ゲノムを必要としない生殖システム - 二母性マウス作出系 - (Kawahara et al., Nat Protoc, 3, 2008)を活用して、マウスゲノムにおける父性メチル化インプリント遺伝子に焦点を絞って解析した。

### 3. 研究の方法

本研究では 3 種のノックアウトマウス( 7、12、7&12)の新生子雌マウス由来の非成長期卵母細胞(ng 卵子)を用いて通常の排卵卵子(fg 卵子)と連続核移植法により組み合わせることで二母性胚を作出した。ここで、7 マウスは、7 番染色体の遠部位に位置する H19 遺伝子の上流にあるメチル化刷り込み領域と転写領域を欠損させており、一方、12 マウスは 12 番染色体上の Dlk1-Dio3 領域のメチル化刷り込み領域の欠損を持っている。7&12 マウスは、これら 7 マウスと 12 マウスを交配させて両者の欠損を併せ持つダブルノックアウトマウスである。したがって、出生後も生存可能な ng 7&12/fg 胚と、妊娠満期(E19.5)までは発生可能な ng 7/fg 胚および ng 12/fg 胚の 3 種類の胚が準備できる。基本的に野生型(体外受精胚由来)の受胎産物と ng 7&12/fg 胚の受胎産物のサンプルを比較することになるが、ng 7/fg 胚および ng 12/fg 胚も候補遺伝子のスクリーニングに重要となる。なぜなら、ng 7&12/fg 胚特異的な発現異常を起こす遺伝子を拾い出す際に、ng 7/fg 胚および ng 12/fg 胚でも‘同様に’発現異常を起こしているかを二重三重に確認することで、新規父性メチル化刷り込み遺伝子絞り込みの確度が飛躍的に高まるからである。

(1) 初めに、体外受精胚および二母性胚に由来するマウス胎子および胎盤の遺伝子発現比較のために、上記 3 種の二母性胚(ng 7/fg 胚・ng 12/fg 胚・ng 7&12/fg 胚)を偽

妊娠雌マウスに胚移植し、胎盤形成後の胎齢 E12.5、E15.5 において剖検後に胎子サンプルを採取した。また、採取後にトータル RNA を抽出精製して、マイクロアレイにより刷り込み遺伝子の下流で調節される遺伝子群の解析を行った (Kawahara et al., J Biol Chem, 284, 2009)。この基礎データに基づきバイオインフォマティクス的手法を駆使して正常胚と比べて ng 7&12/fg 胚特異的に発現している遺伝子リストを作成した。

(2) 次に、遺伝子発現レベルの差のみに基づいた 1 次スクリーニングのために、正常胚と比べて既知領域以外の父性メチル化刷り込み遺伝子の発現が正常化されていない ng 7&12/fg 胚で特異的に発現差がみられた遺伝子について統計学的に処理し、かつ、2 倍以上の差がある遺伝子群のリストを作成した。その上で、同様の解析を ng 7/fg 胚・ng 12/fg 胚でも行った。さらに、正常胚 ng 7&12/fg 胚でみられた遺伝子リストと正常胚 ng 7/fg 胚および正常胚 ng 12/fg 胚リストの重複遺伝子を検索した。父性メチル化インプリント遺伝子である場合、3 種のリスト全てで正常胚との発現差がみられると考えた。

(3) 最後に、近交系間多型情報に基づく片親性発現の確認するために、インプリント遺伝子が否かを判定すべく、“発現アリル”の特異性について調べた。そのために、近交系間の雑種を雌雄の組み合わせを変えて作製する必要があるが、近交系間雑種由来の胎子サンプルにおいて RT-PCR により候補遺伝子を増幅して、シーケンスシステム間の一塩基多型 (SNIP) 情報により発現アリルを特定した。C57BL/6J 系統と JF1/Ms 系統を用いた。さらに、単為発生胚と雄核発生胚を作製し、発現アリルに特徴のみられた遺伝子について発現レベルを定量 PCR によって調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) マイクロアレイ解析

胎齢 E12.5 における二母性マウス (ng Double/fg) と野生型 (WT) ng 7ch/fg と WT、ng 12ch/fg と WT のマウス胎子における遺伝子発現差を比較し、すべてにおいて 2 倍以上差があり、かつ、発現の増加および低下の傾向が同じ遺伝子をピックアップした結果、Matr3、Mbn11、Mki67、Top1、Dek、Eif3a、Cdt1、Prkcsch、Zfp1、Mast2、Tufm、Grk6、Mcm2、Slc29a1、Srm、Polr2i、Hpx、Dnmt1、Coro1a、Mcm5、H2afx、Pycr2、Dguok、Mcm6、Hcaph2、Aurka、Ube216、Mybph、Rbm14、Pex19、Prtn3、Cyb5r3、Elane、Cox6a2、Mpo の 35 遺伝子において、野生型胎子のほうが二母性胚よりも 2 倍以上高い遺伝子発現が確認された。

これらの遺伝子の機能は NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) の

Gene-centered information を中心に調べた。KO マウスを用いた表現型解析がなされているものは、Mbn11、Top1、Dek、Zfp1、Grk6、Mcm2、Slc29a1、Hpx、Dnmt1、Coro1a、H2afx、Mcm6、Ncaph2、Aurka、Elane、Cox6a2、Mpo であった。

##### (2) 染色体上での位置

マイクロアレイ解析で見つかったインプリント候補遺伝子と既知のインプリント遺伝子の染色体上の位置を Ensemble genome browser で調べた (図 1)。インプリント候補遺伝子は、5 番、12 番、14 番、16 番以外のすべての常染色体上に存在していた。2 番染色体上の母性メチル化インプリント遺伝子のクラスター近傍に Top1 と Aurka の 2 つのインプリント候補遺伝子が位置していた。また、父性インプリント領域である H19-Igf2 領域がある 7 番染色体上に、Hpx、Tufm、Coro1a、Cox6a2、Mki67 の 5 つのインプリント候補遺伝子が存在していた。

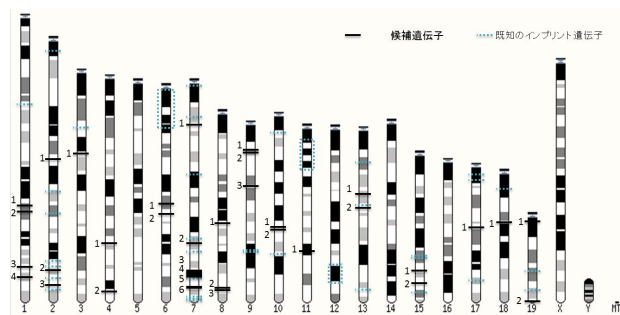


図 1 検出遺伝子の染色体上での位置

染色体番号	遺伝子名 (染色体上の位置)
Chr1	1, <i>Mcm6</i> (55.80 cM) 2, <i>Mybph</i> (58.15 cM) 3, <i>Pex19</i> (79.54 cM)
Chr2	1, <i>Ube216</i> (49.45 cM) 2, <i>Top1</i> (80.96 cM) 3, <i>Aurka</i> (94.84 cM)
Chr3	1, <i>Mbn11</i> (29.17 cM)
Chr4	1, <i>Mast2</i> (53.10 cM) 2, <i>Srm</i> (78.76 cM)
Chr6	1, <i>Dguok</i> (35.94 cM) 2, <i>Mcm2</i> (39.64 cM)
Chr7	1, <i>Polr2i</i> (17.34 cM) 2, <i>Hpx</i> (55.91 cM) 3, <i>Tufm</i> (69.08 cM) 4, <i>Coro1a</i> (69.25 cM) 5, <i>Cox6a2</i> (70.04 cM) 6, <i>Mki67</i> (81.32 cM)
Chr8	1, <i>Mcm5</i> (35.59 cM) 2, <i>Zfp1</i> (70.86 cM) 3, <i>Cdt1</i> (71.91 cM)
Chr9	1, <i>Dnmt1</i> (7.66 cM) 2, <i>Prkcsch</i> (8.04 cM) 3, <i>H2afx</i> (24.84 cM)
Chr10	1, <i>Prm3</i> (39.72 cM) 2, <i>Elane</i> (39.72 cM)
Chr11	1, <i>Mpo</i> (52.22 cM)
Chr13	1, <i>Dek</i> (24.50 cM) 2, <i>Grk6</i> (30.06 cM)
Chr15	1, <i>Cyb5r3</i> (39.40 cM) 2, <i>Ncaph2</i> (44.84 cM)
Chr17	1, <i>Slc29a1</i> (22.59 cM)
Chr18	1, <i>Matr3</i> (19.14 cM)
Chr19	1, <i>Rbm14</i> (4.11 cM) 2, <i>Eif3a</i> (56.52 cM)

番号は上図染色体横の番号に対応

##### (3) 多型解析と発現アリルの確認

多型解析によって、B6-JF1 間多型が見つかった遺伝子に関して、B6 × JF1、JF1 × B6 の F1 マウス total RNA サンプルを用いて、アリル発現解析を行った。多型解析により見つかった多型が検出できるプライマーを用いて、ダイレクトシーケンスを行った。インプリント候補遺伝子のアリル発現解析は、多型の見つかった領域をシーケンスすることができる。Forward および Reverse プライマーのどちらかで行った。Mbn11 以外の遺伝子では、B6 × JF1、JF1 × B6 において、B6-JF1 間に多型のある塩基の波形がどちらも重なって検出された。ところが、Mbn11 では、670 番地が B6 では C、JF1 では T の多型であったが、

B6×JF1、JF1×B6ともJF1と同じであるTの波形が検出された(図2)。

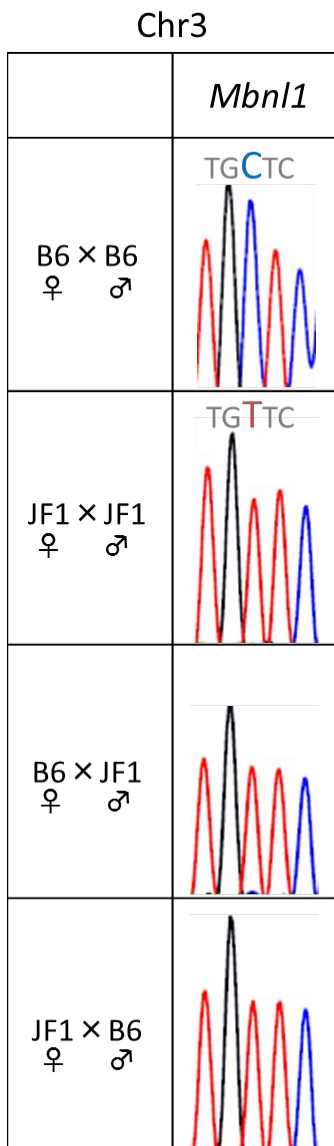


図2 Mbn11 遺伝子のアリル発現解析 (Chr3)

#### (4)片親性胚における Mbn11 の発現解析

Mbn11 について Real-time-PCR を実施した結果、雄核発生胚および雌核発生胚間では Mbn11 の発現量に有意な差はみられなかった。しかしながら、野生型胚と比較するとおよそ片親性胚由来胎子で約 45%程度の発現低下が確認された( $P < 0.05$ )(図3)。

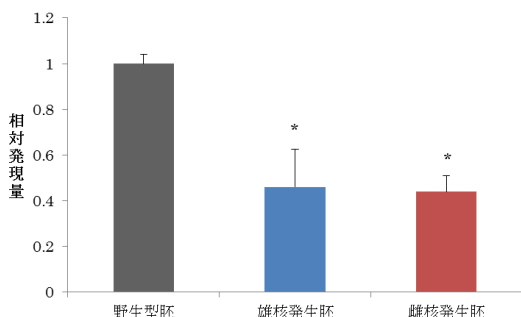


図3 片親性胚における Mbn11 の発現量

#### 考察

雄核発生胚および雌核発生胚間では Mbn11 の発現量に有意な差はみられなかった。これらのことより、Mbn11 はインプリント遺伝子ではないことが明らかになった。しかしながら、野生型胚と比較するとおよそ片親性胚由来胎子で約 45%程度の発現低下が確認された。片親性胚における発現低下の理由として、Mbn11 がインプリント遺伝子により発現に影響を受けていることが考えられる。インプリント遺伝子には、他の遺伝子の発現を調節するノンコーディング RNA(ncRNA)として働く遺伝子が存在する。そのため、片親性胚におけるインプリント遺伝子の発現異常により、通常遺伝子である Mbn11 の発現異常が引き起こされたと考えられる。また、インプリント遺伝子には転写因子や細胞周期調節因子などの、分化に関与する遺伝子も存在する。そのため、片親性胚において分化異常の起こった結果として Mbn11 の発現低下が引き起こされたと考えられる。また、上記2つの異常が複合的に生じたことにより、Mbn11 の発現異常が生じた可能性も考えられる。これら3つの可能性を検証するために、ncRNA および分化に関与する既知インプリント遺伝子をノックアウトしたマウスにおける Mbn11 の発現解析を行い、また、分化異常の起こった組織や細胞における Mbn11 の発現解析を今後行う必要がある。当研究室の先行研究において、二母性胚と野生型胚間の Mbn11 の発現に2倍以上発現差がみられたことも、Mbn11 がインプリント遺伝子によって発現に影響を受けた結果と予測される。次に、雄核発生胚および雌核発生胚が等しく発現低下していた理由について考える。どちらの胚でも発現が低下していたことから、父性発現インプリント遺伝子および、母性発現インプリント遺伝子の両方が Mbn11 の発現に影響を及ぼしている可能性が考えられる。また、雄核発生胚および雌核発生胚の発現量が共に、野生型胚の約半分になっていることより、片親性胚では両アリルの発現が低下する、または片アリルのみしか発現していないと考えられる。このことより、Mbn11 の正常な発現には雌雄両アリルの存在が不可欠であり、アリル間の相互作用により発現が調節されている可能性も考えられる。

#### 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 7 件)

1. Aboelenain M., Kawahara M., Balboula A.Z., Montasser A.E., Zaabel S.M., Okuda K., and Takahashi M. 【査読有】 Status of autophagy, lysosome activity and apoptosis during corpus luteum regression in cattle. Journal

- of Reproduction and Development, 2015. PMID: 25819401
2. Yamazaki W., Takahashi M., and Kawahara M. 【査読有】 Restricted development of mouse triploid fetuses with disorganized expression of imprinted genes. *Zygote*, 2014. PMID: 25318586
  3. Sasaki K., Tungtrakoolsub P., Morozumi T., Uenishi H., Kawahara M. 【査読有】 and Watanabe T. A single nucleotide polymorphism of porcine MX2 gene provides antiviral activity against vesicular stomatitis virus. *Immunogenetics*, 66, 25-32, 2014.
  4. Balboula A.Z., Yamanaka K., Sakatani M., Kawahara M., Hegab A.O., Zaabel S.M. and Takahashi M. 【査読有】 Cathepsin B activity has a crucial role in the developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes exposed to heat shock during in vitro maturation. *Reproduction*, 146: 407-417, 2013.
  5. Nagatomo H., Kagawa S., Kishi Y., Takuma T., Sada A., Yamanaka K.I., Abe Y., Wada Y., Takahashi M., Kono T. and Kawahara M. 【査読有】 Transcriptional wiring for establishing cell lineage specification at the blastocyst stage in cattle. *Biology of Reproduction*, 88: 1-10, 2013.
  6. Aono A., Nagatomo H., Takuma T., Nonaka R., Ono Y., Wada Y., Abe Y., Takahashi M., Watanabe T. and Kawahara M. 【査読有】 Dynamics of intracellular phospholipid membrane organization during oocyte maturation and successful vitrification of immature oocytes retrieved by ovum pick-up in cattle. *Theriogenology*, 79: 1146-1152, 2013.
  7. Sasaki K., Yoneda A., Ninomiya A., Kawahara M. and Watanabe T. 【査読有】 Both antiviral activity and intracellular localization of chicken Mx protein depend on a polymorphism at amino acid position 631. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430: 161-166, 2013.
- 〔学会発表〕(計 11 件)
1. 田中愛子, 佐々木恵亮, 高橋昌志, 川原学. マウス初期胚発生過程におけるパターン認識受容体 TLR9 の発現動態. 日本繁殖生物学会, 2014年8月21日~24日, 帯広畜産大学, (北海道・帯広).
  2. 山崎渉, 河野友宏, 高橋昌志, 川原学. マウス胎子成長に及ぼす倍数性およびインプリント遺伝子発現の影響. 日本繁殖生物学会, 2014年8月21日~24日, 帯広畜産大学, (北海道・帯広)
  3. Mansour Aboelenain, 川原学, Abdel-Monem Montasser, Samy Moawad Zaabel, 奥田潔, 高橋昌志. The role of autophagy in regression of bovine corpus luteum in relation to lysosomal function. 日本繁殖生物学会, 2014年8月21日~24日, 帯広畜産大学, (北海道・帯広)
  4. 白水貴大, 川原学, 木村康二, 高橋ひとみ, 柳川洋二郎, 永野昌志, 白汝嵐, 今川和彦, 高橋昌志. ウシ子宮内膜組織における MX1 と MX1B 発現に及ぼす I 型インターフェロンの応答性およびその受容体の発情周期別比較. 日本繁殖生物学会, 2014年8月21日~24日, 帯広畜産大学, (北海道・帯広)
  5. 菊地康太, 香西圭輔, 法上拓生, 徳山翔太, 阪谷美樹, 川原学, 南保泰雄, 奥田潔, 高橋昌志. 発情周期に伴うウマ子宮組織内の粘液分泌・血管新生因子およびホルモン受容体遺伝子発現の変動. 日本畜産学会, 2014年3月27日~29日, つくば国際会議場および筑波大学(茨城・つくば).
  6. 山崎渉, 馬狩柚子, 河野友宏, 高橋昌志, 川原学. 二母性マウス胚を用いた新規父性メチル化インプリント遺伝子の検証. 日本繁殖生物学会 2013年9月12日~14日, 東京農工大学(東京・府中).
  7. 定郁里, 長友啓明, 高橋昌志, 川原学. ウシ初期胚発生の進行に伴う CTGF および TEAD4 遺伝子の発現動態. 日本繁殖生物学会 2013年9月12日~14日, 東京農工大学(東京・府中).
  8. 佐々木恵亮, 高橋昌志, 川原学. マウス初期胚における RNA ウィルスレセプター RIG-I を介した抗ウィルス応答. 日本繁殖生物学会 2013年9月12日~14日, 東京農工大学(東京・府中).
  9. 小山詩織, 飯村さとみ, 高橋昌志, 川原学. 異種間ミトコンドリアヘテロプラスミーが初期胚発生に及ぼす影響. 北海道畜産草地学会, 2013年8月31日~9月1日, 紋別市文化会館(北海道・紋別).

10. 白水貴大, 川原学, 高橋昌志. ウシ妊娠子宮における MX1 遺伝子のスプライシング変異体の発現解析. 北海道畜産草地学会, 2013 年 8 月 31 日~9 月 1 日, 紋別市文化会館(北海道・紋別).
11. 長友啓明, 加川真二郎, 定郁里, 岸靖典, 高橋昌志, 河野友宏, 川原学. ウシ胚盤胞期胚における部位特異的発現を示す遺伝子の探索. 日本卵子学, 2013 年 5 月 25 日~5 月 26 日, 学術総合センター(東京・千代田区).

〔図書〕(計 1 件)

1. Sasaki K., Kawahara M. and Watanabe T. Characteristics of mx gene that shows resistance to vesicular stomatitis virus from avians to mammals. Advances in Genetics Research, NOVA Science publishers, New York, USA, Chapter 6, 11:p117-130, 2013.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/anim/breed/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川原 学 (KAWAHARA, Manabu)

北海道大学大学院・農学研究院・准教授

研究者番号：7 0 4 6 8 7 0 0