

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870036

研究課題名(和文)核の初期化における胎盤特異的インプリント遺伝子の役割に関する研究

研究課題名(英文) Study on role of the placenta-specific gene to imprint in the nuclear initialization

研究代表者

千葉 初音 (Chiba, Hatune)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80642719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：GIは、胎盤を有する哺乳類に特有な現象で、胎盤形成にその生物学的必要性が指摘されている。これまでに網羅的な胎盤特異的GI遺伝子の検索を行い、10種類の遺伝子を同定することに成功した。また、胎盤肥大を特徴とする体細胞クローンマウスの胎盤は、2種類のGI遺伝子がインプリント異常を示すことを発見した。本研究では、エピジェネティックな分子機構とシグナル伝達経路について解析した。その結果、これらの領域を制御するdifferentially methylated regionを見出した。またクローン胚の胎盤では、このDMRが失われ、それに伴う遺伝子の過剰発現が胎盤過形成の一因となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Both Gab1 and Sfmbt2 are novel placenta-specific imprinted genes and we analyzed the function and regulatory mechanism of Gab1 and Sfmbt2 using Gab1 KO mice, trophoblast stem cells and cloned mice. We found that the paternal expression of Gab1 and Sfmbt2 were regulated by a novel differentially methylated region (DMR) and the imprinted expression was important for normal placental development. We also found that in cloned mouse placentas, the Gab1 and Sfmbt2 DMR were lost and Gab1 and Sfmbt2 were highly expressed, which may contribute to placentomegaly of cloned mice.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノムインプリンティング メチル化インプリント クローンマウス 胎盤

1. 研究開始当初の背景

ゲノムインプリンティングとは、一部の遺伝子が母親もしくは父親由来アリル特異的に発現する現象である。ゲノムインプリンティングは、胎盤を有する哺乳類に特有な現象であり、胎盤形成にその生物学的重要性が指摘されている。

申請者らは、次世代シーケンサーを用い、胎盤特異的インプリント遺伝子の網羅的検索を行い、新規インプリント遺伝子 Gab1、Sfmbt2 等を同定した (Okae et al. Hum. Mol. Genet. 2011)。さらに、体細胞がクローンマウスの胎盤において Gab1、Sfmbt2 等がインプリンティング異常を示し、過剰に発現していることを発見した。体細胞クローンマウスは全例で胎盤過形成を示すことが知られていることから、Gab1、Sfmbt2 等のインプリンティング制御が、胎盤形成に重要な役割を担う可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規胎盤特異的インプリント遺伝子 Gab1、Sfmbt2 等の胎盤発生における機能と、その発現制御機構を解明することである。具体的には、以下の3点を明らかにする。

- (1) 胎盤の正常発生における Gab1 の機能
- (2) 胎盤特異的 GI 遺伝子の片親性発現を制御するエピジェネティックな分子機構
- (3) 胎盤特異的 GI 遺伝子のインプリンティング制御の破綻が胎盤発生に与える影響 (モデルとして、クローンマウスを使用する)

3. 研究の方法

- (1) 胎盤の正常発生における胎盤特異的 GI 遺伝子の機能解析

野生型マウス (WT)、母親由来アリルを KO したヘテロマウス (Gab1 (m/+))、父親由来アリルを KO したヘテロマウス (Gab1 (+/p)) を作製し、胎盤の組織学的解析および、遺伝子発現解析を行った。

- (2) 胎盤特異的 GI 遺伝子のインプリンティング制御機構の解析

卵子、精子、着床前胚、正常胎盤、胎盤幹

(TS) 細胞等を用い、Gab1、Sfmbt2 等のプロモーター領域の DNA メチル化とヒストン修飾状態を解析した。いずれの解析も、SNPs を用いることでアリルを区別して行う。

- (3) クローンマウスの胎盤における Gab1、Sfmbt2 等のインプリンティング異常の解析

(2) で同定した Gab1 のエピジェネティック制御が、クローンマウス胎盤で正常に保たれているかどうかを解析した。さらに、Gab1 (+/-) 細胞を用いてクローンマウスの作製を行い、胎盤過形成がレスキューされるかどうかを検討した。

4. 研究成果

- (1) 胎盤の正常発生における Gab1 の機能解析

WT、Gab1 (m/+)、Gab1 (+/p) マウスを作製し、胎生 17.5 日目に胎仔および胎盤を摘出した。胎仔および胎盤の重量を比較したところ、Gab1 (+/p) マウスにおいてのみ、胎盤重量の減少が見られた。一方、胎仔重量には大きな違いは見られなかった。よって、父親由来の Gab1 が、正常な胎盤発生に重要であると考えられる。さらに、胎盤切片の HE 染色および免疫染色を行ったところ、Gab1 (+/p) マウスの胎盤ではラビリンス層の異常が見られ、重量減少の主要な原因であることが示唆された (図 1)。

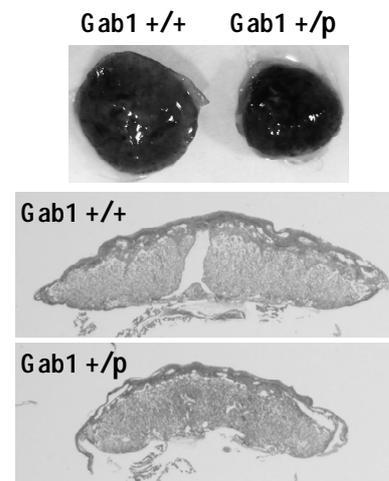


図 1. 父由来アレル Gab1 KO マウスの胎盤の低形成

(2) Gab1 のインプリンティング制御機構の解析

B6 と JF1 マウスを交配することで、DNA 多型を有する正常胎盤および TS 細胞を作製し、Gab1 の DNA メチル化およびヒストン修飾の解析を行った。その結果、母親由来アリル特異的メチル化を受ける新規 DMR (Differentially methylated region) を発見するとともに、H3K4me3 や H3K9me2 などのヒストン修飾がアリル特異的に見られることを明らかにした。さらに、卵子、精子、着床前胚における DNA メチル化解析を行い、Gab1 DMR は着床後に獲得される 2 次的な DMR であることを示した。

興味深いことに、Gab1 には 2 つのアイソフォームが存在し、一方は父親由来アリルより、もう一方はごく弱いながらも、母親由来アリルより発現していた。父親由来アリルより発現するアイソフォームは胎盤以外の組織では発現しておらず、N 末の pleckstrin homology (PH) ドメインを欠いたタンパク質をコードしていた。よって、全長の Gab1 ではなく、PH ドメインを欠くアイソフォームが胎盤の成長を正に制御していると考えられる(図 2)。

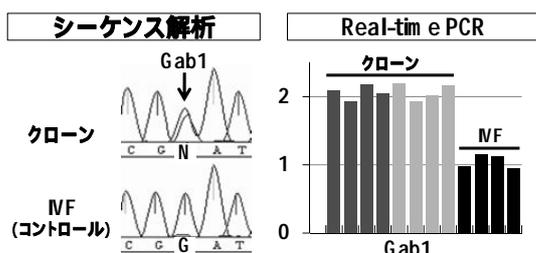


図 2. クローンマウスにおける Gab1 遺伝子の異常

(3) クローンマウスの胎盤における Gab1 のインプリンティング異常の解析

DNA 多型を有するクローンマウスを作製し、胎盤における Gab1 のアリル特異的 DNA メチル化およびヒストン修飾状態を解析した。その結果、クローンマウスではアリル特異的なエピジェネティック修飾が見られないことを明らかにした。さらに、クローン作製に使用した体細胞、着床前のクローン胚を用いてアリル特異的 DNA メチル化解析を行

ったところ、Gab1 の DMR は体細胞で既に失われており、核移植によって Gab1 DMR の再確立は起こらないことを見出した。

クローンマウスにおける Gab1 の発現異常をレスキューするため、Gab1 ヘテロ KO マウスから得られた体細胞を用いて核移植を行った。得られた胎盤の重量を測定したところ、Gab1 ヘテロ KO マウス由来の胎盤は、通常のクローンマウスの胎盤と比べて小さいものの、正常胎盤と比べると大きかった。すなわち、Gab1 の発現量を正常化しただけでは、クローンマウスの胎盤過形成を完全にはレスキューできないことが明らかとなった。

申請者らは最近、次世代シーケンサーを用いたアリル特異的遺伝子発現解析により、Gab1 以外にもクローンマウスの胎盤で発現異常を示すインプリント遺伝子を発見した(図 3)。そのため、クローンマウスにおける胎盤過形成には、Gab1 以外のインプリント遺伝子の発現異常も関与している可能性があり、今後さらなる検討が必要と考えられる。

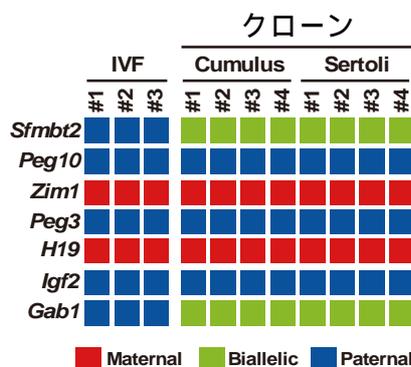


図 3. クローン胎盤におけるインプリンティング異常

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. Kobayashi N, Okae H, Hiura H, Chiba H, Shirakata Y, Hara K, Tanemura K, Arima T. Genome-Scale Assessment of Age-Related DNA Methylation Changes in Mouse Spermatozoa. **PLoS One**. 23, 11, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0167127. 査読有

2. Hamada H, Okae H, Toh H, Chiba H, Hiura H, Shirane K, Sato T, Suyama M, Yaegashi N, Sasaki H & Arima T. Allele-specific methylome and transcriptome analysis reveals widespread imprinting in the human placenta. **The American Journal of Human Genetics.** 99; 1-11, 2016. doi:10.1016/j.ajhg.2016.08.021. 査読有
3. Kitamura A, Miyauchi N, Hamada H, Hiura H, Chiba H, Okae H, Sato A, John RM, Arima T. Epigenetic alterations in sperm associated with male infertility. **Congenit Anom (Kyoto).** 55(3), 133-144, 2015. doi:10.1111/cga.12113. 査読有
4. Okae H, Chiba H, Hiura H, Hamada H, Sato A, Utsunomiya T, Kikuchi H, Yoshida H, Tanaka A, Suyama M, Arima T. Genome-wide analysis of DNA methylation dynamics during early human development. **PLoS Genetics.** 10(12): e1004868, 2014. doi:10.1371/journal.pgen.1004868. 査読有
5. Hiura H, Okae H, Chiba H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Arima T. Imprinting methylation errors in ART. **Reproductive Medicine and Biology.** 13(4), 193-202, 2014. doi:10.1007/s12522-014-0183-3. 査読有
6. Okae H, Matoba S, Nagashima T, Mizutani E, Inoue K, Ogonuki N, Chiba H, Funayama R, Tanaka S, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, Ogura A, Arima T. RNA sequencing-based identification of aberrant imprinting in cloned mice. **Hum Mol Genet.** 23(4), 992-1001, 2014. doi:10.1093/hmg/ddt495. 査読有

[学会発表](計 2件)

1. 第39回日本分子生物学会年会「ヒト凍結融解胚移植胎盤における microRNA の網羅的解析」樋浦仁、服部裕充、岡江寛明、千葉初音、宮内尚子、北村茜、菊地裕幸、吉田秋仁、有馬隆博、パシフィコ横浜、横浜 (11/30/2016)
2. 第39回日本分子生物学会年会「繁殖期におけるマウス精子DNAメチル化様式の高齢性変化」小林記緒、岡江寛明、樋浦仁、

千葉初音、白形芳樹、原健士郎、種村健太郎、有馬隆博、パシフィコ横浜、横浜 (11/30/2016)

[図書](計 2件)

1. 有馬隆博、宮内尚子、北村茜、樋浦仁、岡江寛明、千葉初音、生殖補助医療とインブリンティング異常の予防、Pharma Medica、メディカルレビュー社 34(4) 2016.
2. 千葉初音、有馬隆博、生殖補助医療とエピジェネティクス異常、医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社 249(1), 49-54. 2014.

6. 研究組織

(1)研究代表者

千葉 初音 (HATSUNE, CHIBA)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80642719