

## 自己評価報告書

平成23年5月2日現在

機関番号：12601

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20062003

研究課題名（和文）

マウス初期胚発生におけるエピゲノム形成と細胞分化

研究課題名（英文）

Epigenome formation and cellular differentiation in mouse embryogenesis

研究代表者：田中 智

（東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授）

研究者番号：90242164

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：DNA メチル化、クローン、マウス、初期胚、栄養外胚葉、胚性幹細胞、栄養膜幹細胞

## 1. 研究計画の概要

ほ乳類ゲノム DNA には、細胞種によってメチル化状態の異なる領域 (T-DMR) があり、そのメチル化/非メチル化の組合せが細胞種に固有のゲノム DNA メチル化プロファイルを形成する。DNA メチル化プロファイルは細胞種固有のトランスクリプトームを規定し、細胞分化の基盤になっている。マウス胚の細胞は、最初の細胞分化により内部細胞塊と栄養外胚葉とに分かれ、胚盤胞を形成する。DNA メチル化を含めたエピゲノム情報が割球運命の決定や維持の基盤になっていることがうかがわれる。マウス胚盤胞から得られる培養幹細胞の分化能の制御にも、ゲノム DNA メチル化プロファイルを含むエピジェネティック情報（エピゲノム情報）の関与が予測される。我々は、ES 細胞や TS 細胞を含む幹細胞の DNA メチル化解析を行ってきた。本研究計画では、これら幹細胞のゲノム DNA メチル化解析をさらに発展させることに加え、このような細胞系譜特異的な DNA メチル化プロファイルが、発生や細胞分化の過程でいつどのように形成されるのかを明らかにすることを目的とする。

## 2. 研究の進捗状況

新規に確立したゲノムワイド DNA メチル化解析法 D-REAM (Yagi et al., 2008) によりマウス各種幹細胞 (ES 細胞、EG 細胞、iPS 細胞、TS 細胞) の DNA メチル化プロファイルを明らかにした。それより iPS 細胞の DNA メチル化プロファイルが確かに ES 細胞に非常に似たものになっているものの、適切なゲノム領域に注目することで、DNA メチル化を指標に iPS 細胞をその元となった細胞の種

類によって区別できることを明らかにした (Sato et al., 2010)。これは、iPS 細胞エピゲノムの「書き換え」が必ずしも十分ではないことを示す。ES 細胞で低メチル化である T-DMR 周辺の精査により、SINE がその周辺に豊富で逆に LINE が少ないといった特徴も明らかにした (Muramoto et al., 2010)。

ES 細胞、TS 細胞間でメチル化状態の異なる領域 (TS-ES T-DMR) のメチル化を解析したところ、胚盤胞ではどれもほぼ非メチル化状態にあり、着床 2 日後の胚ではメチル化の差が生じていた (学会発表：Nakanishi et al., 2010)。マウス胚で最初に起こる細胞分化では、形態的な分化の後に、それぞれの細胞系譜に固有の DNA メチル化プロファイルが確立されるのである。細胞の分化方向を決定する転写因子群により細胞の運命が制御され、DNA メチル化プロファイルの確立によりその運命が安定化されるという機序が示唆される。

多くの体細胞核移植 (SCNT) 胚ではエピゲノムの書き換えが不十分であるために異常が生じると考えられる。SCNT 胚盤胞由来 TS 細胞 (ntTS 細胞) を樹立したところ、ntTS 細胞はコントロールと同等の割合で樹立され、DNA メチル化プロファイルに ntTS 細胞特有の異常は見つからなかった (Oda et al., 2009)。ntTS 細胞樹立の過程で、異常な DNA メチル化が修復された可能性がある。

## 3. 現在までの達成度

【おおむね順調に進展している】

各種幹細胞の DNA メチル化プロファイル解析が順調に進んだ。本研究計画の 1 つの大きな目的であった TE と ICM における

TS-ES T-DMR のメチル化解析も、TE/ICM の分取と微量サンプルのメチル化解析といった技術的な困難を着実に乗り越えて達成することができた。これらの T-DMR が、胚盤胞の TE、ICM のどちらにおいてもほぼ非メチル化状態にあることは意外な発見であった。

#### 4. 今後の研究の推進方策

着床前のマウス胚盤胞では、TS-ES T-DMR はほとんどメチル化されておらず、2 つの異なる細胞系譜間の差は生じていなかった。細胞系譜特異的な DNA メチル化プロファイルの確立時期を、特に着床との関連に注目しながらさらに明らかにするため、着床直後の胚に加え、着床遅延胚盤胞、培養ディッシュに接着した胚盤胞 outgrowth、またその解離・継代後に出現する TS 細胞様コロニーなどにおける DNA メチル化解析を行う。最近、ほ乳類がもつ 3 種類のメチル基転移酵素を全て欠損する TS 細胞が樹立できること、その TS 細胞がキメラ胚の胎盤形成に寄与できることから、TS 細胞および分化栄養膜細胞ではゲノム DNA のメチル化が必要ではないことが報告された。一方我々は、Dnmt1 変異 TS 細胞が樹立されないという結果を得ている（未発表）。これらの相反する結果から、「Dnmt1 のみを欠いた場合、de novo 型 DNA メチル化酵素による異常なゲノム DNA メチル化が起こり、TS 細胞の維持に悪影響を及ぼす」との仮説を立て、その検証を目的とした研究を加えることとした。これらに加え、非インプリント遺伝子領域にある精子特異的 T-DMR のメチル化動態を解析し、精子形成過程における精子特異的 DNA メチル化プロファイル形成機序を明らかにする。

#### 5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 8 件)

- 1) 中西もも、田中智。栄養膜幹細胞。臨床婦人科産科 **65**:260-265 (2011)。《総説、査読なし》
- 2) Oda, M., Shiota, K., and Tanaka, S. Trophoblast cell lineage in cloned mouse embryos. *Dev. Growth Differ.* **52**, 285-291 (2010)。《invited review, 査読あり》
- 3) Sato, S., Yagi, S., 他 10 名 (9 番目) Genome-wide DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions (T-DMRs) residing in mouse pluripotent stem cells. *Genes Cells* **15**, 607-618 (2010)。《査読あり》
- 4) Oda, M., Tanaka, S., (equal contribution) 他 9 名 Establishment of trophoblast stem cell lines from somatic cell nuclear-transferred embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 16293-16297

(2009)。《査読あり》

- 5) Yagi, S., Hirabayashi, K., 他 11 名 (1 1 番目) DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions (T-DMRs) in mouse promoter regions demonstrating tissue-specific gene expression. *Genome Res.* **18**, 1969-1978 (2008)。《査読あり》

[学会発表] (計 6 件)

- 1) Nakanishi, M. et al. Establishment of cell lineage-specific DNA methylation profile follows the morphological differentiation of trophoblast and embryonic cell lineages. *43rd Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction.* (2010. 7. 30-8. 3, Milwaukee) 《一般口頭》
- 2) Tanaka, S. Normalcy of trophoblast stem cells derived from cloned mouse embryos. *The First SKLRB Symposia on Frontiers in Periimplantation Biology.* (2010. 5. 8-12, Beijing) 《招待講演》
- 3) 田中智. Is trophoblast cell lineage abnormal in cloned mouse embryos? 第 4 2 回日本発生生物学会大会. (2009. 5. 31, 新潟) 《招待講演》
- 4) 早川晃司ら. マウスプロラクチン遺伝子ファミリーの DNA メチル化解析. 第 101 回日本繁殖生物学会大会. (2008. 9. 18-20, 福岡) 《一般口頭》
- 5) 吉岡徹也ら. 栄養膜幹細胞の分化に伴う DNA メチル化プロファイル形成. 第 101 回日本繁殖生物学会大会. (2008. 9. 18-20, 福岡) 《一般口頭》

[図書] (計 1 件)

- 1) Himeno, E., Tanaka, S., and Kunath, T. Isolation and manipulation of mouse trophoblast stem cells. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* **7**, 1E. 4.1-27 (2008)。《book chapter, 査読なし》

[その他]

雑誌論文 7 に関するプレスリリース  
[http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/tanak\\_a090826.html](http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/tanak_a090826.html)