

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25年5月10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（TANAKA SATOSHI）

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

研究成果の概要（和文）：

マウス初期胚由来胚性幹細胞（ES細胞）および栄養膜幹細胞（TS細胞）と体細胞組織の比較により、それぞれの幹細胞に特徴的なDNAメチル化状態を示すゲノム領域を同定した。得られたDNAメチル化情報などに基づき、核移植クローン胚由来TS細胞は正常胚由来TS細胞と同等であることを示した。また、初期胚発生において、DNAメチル化プロファイルは形態的な細胞分化のあとで形成されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed DNA methylation profiles of mouse embryonic stem cells (ESCs) and trophoblast stem cells (TSCs), and compared those with DNA methylation profiles of some somatic tissues. Consequently, we identified genomic regions that show methylation statuses specific to each stem cell line. By using DNA methylation profile as one of the indexes, we revealed that the TSCs derived from blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer are indistinguishable from normal TSCs. We also showed that trophoblast-specific DNA methylation occurs after the segregation of the trophoctoderm and inner cell mass in the mouse periimplantation embryo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	12,600,000	0	12,600,000
2009年度	12,600,000	0	12,600,000
2010年度	12,600,000	0	12,600,000
2011年度	12,600,000	0	12,600,000
2012年度	12,600,000	0	12,600,000
総計	63,000,000	0	63,000,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：動物生命科学・統合動物科学

キーワード：DNAメチル化、マウス、胚盤胞、内部細胞塊、栄養外胚葉、栄養膜細胞、胎盤

1. 研究開始当初の背景

DNAのメチル化は、遺伝子発現を制御するエピジェネティック機構の1つであり、特に転写開始点近傍のDNAメチル化は転写活性を抑制する。我々は、マウスゲノムDNAに、細胞種によってDNAメチル化状態の異

なる領域（T-DMRと称する）が多数存在し、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ことを見だし報告してきた。これはすなわち、細胞の分化はDNAメチル化プロファイルの書き換えを伴い、それ

による新たなトランスクリプトームの規定が細胞分化の基盤となっていることを示唆する。

マウス胚の細胞は、胚盤胞形成時に起こる最初の細胞分化により、内部細胞塊 (ICM) と栄養芽層 (TE) とに二分される。マウス胚盤胞から樹立された2種類の幹細胞株である胚性幹細胞 (ES 細胞) および栄養膜幹細胞 (TS 細胞) は、それぞれ ICM と TE の性質をよく反映し、キメラ胚において ES 細胞が TE 由来の胎盤に寄与することはほとんど無く、逆に、TS 細胞が ICM に由来する胚体に寄与することもない。こうした分化能の制限には、転写因子による制御に加え、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) の関与も十分予測されたが、本研究開始当初は、ES 細胞および TS 細胞の DNA メチル化プロファイルに関する情報はまだ乏しく、また、それらが由来する ICM と TE それぞれの DNA メチル化プロファイルもまた未解明であった。

2. 研究の目的

我々は、ES 細胞、TS 細胞間のゲノム DNA メチル化状態の比較、および、これら幹細胞と各種体細胞組織との DNA メチル化の比較解析を行ってきた。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で、それぞれの幹細胞に特徴的な DNA メチル化状態を呈するゲノム領域の同定とその領域に共通する特徴を探ることを第一の目的とした。

さらに、数種のマーカー遺伝子・マーカータンパク質の発現を中心に論じられているマウス初期胚における細胞分化をエピゲノム情報の観点から見直し、初期胚における細胞の可塑性とエピゲノム情報との関係を知るために、栄養膜細胞系譜特異的な DNA メチル化プロファイルが発生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第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) D-REAM (T-DMR profiling with restriction tag-mediated amplification)

ゲノム DNA をメチル化感受性酵素 HpyCH4IV で一晩切断し、精製後、両端にアダプター (R-adaptor) を連結した。この DNA をさらに TaqI で切断し、切断端に異なるアダプター (N-adaptor) を連結した。それぞれのアダプターに相補的なプライマーを用い、R-adaptor と N-adaptor をもつ断片のみを増幅する条件で PCR を行った。得られた PCR 産物は GeneChip WT Double-Stranded DNA Terminal Labeling Kit (Affymetrix 社) をもちいて標識し、

Affymetrix GeneChip mouse promoter 1.0R array にハイブリダイズさせた。シグナルの検出には GeneChip 3000 7G Scanner を用いた。

(2) バイサルファイト・シークエンス

特定のゲノム領域の DNA メチル化状態は、EZ DNA Methylation-Direct kit (Zymo Research 社) を用いたバイサルファイト・シークエンス法により決定した。得られた配列情報の解析および有意差検定は QUMA (quma.cdb.riken.jp) を利用した。

(3) 体細胞核移植胚由来 TS 細胞の樹立

BDF1 マウスあるいは GFP を全身性に発現する形質転換マウス (GFP-CD-1) の卵丘細胞核を、脱核した BDF1 マウス卵子に注入した。作製した再構築胚を 72 時間培養し、胚盤胞まで発生が進んだものを TS 細胞の樹立に供した。胚盤胞は 4-well plate で個々に培養し、既報 (Tanaka, S. et al., Science 282, 2072-2075, 1998) に従い TS 細胞を樹立した。

(4) 胚盤胞からの TE・ICM 細胞の単離

常法に従い、胎生 3.5 日胚 (胚盤胞) を C57BL6/J メスマウス子宮から採取した。採取した胚を酸性タイロドを用いて裸化し、Vybrant CM-DiI 溶液 (1:200 希釈) 中に 15-20 分間置くことで、TE のみを染色した。これを 1.25% パンクレアチン (和光純薬) / 0.25% トリプシン (Invitrogen) / 1 mM EDTA/PBS(-) で 5 分間処理した後、ピペッティングにより細胞を解離させた。蛍光顕微鏡にセットしたマニピュレーターを用い、DiI で染色された細胞を TE 細胞として、染色されていない細胞を ICM 細胞として回収した。

4. 研究成果

(1) ゲノムワイド DNA メチル化解析法 D-REAM の確立とその利用

新規のゲノムワイド DNA メチル化解析法である D-REAM 法を確立した (図 1, Yagi et al., 2008)。D-REAM 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、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、適切なゲノム領域の DNA メチル化状態に注目することで、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 (図 2, 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明らかに示した成果である。また、体細胞と比較して ES 細胞で低メチル化である T-DMR 周辺の配列上の特徴を精査し、これらの T-DMR の周辺では反復配列の SINE が有意に豊富で、

逆に LINE が少ないといった新たな特徴を見いだした。こうした特徴を持つ T-DMR は ES 細胞特異的転写産物 (ECAT) の遺伝子座にも見られ、また、ゲノム全体における頻度よりも CpG 配列が豊富であることもわかった (Muramoto et al., 2010)。これらは、多能性幹細胞のエピゲノムを特徴付ける、新たな知見である。

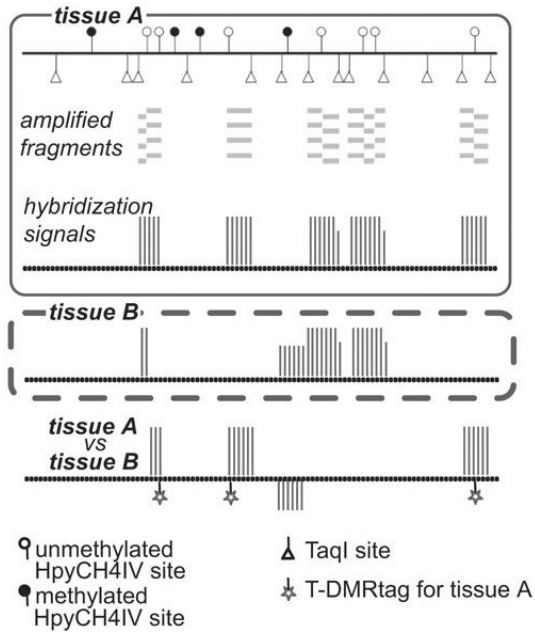


図1 D-REAMの概要。メチル化感受性制限酵素を用いてある一定の長さ以下に切断されたゲノム DNA 断片を、ligation-mediated PCR により増幅し、ゲノムタイリングアレイにハイブリダイズさせることで、非メチル化領域を検出することができる。任意の細胞・組織間のシグナルの比較から、T-DMR が同定される。

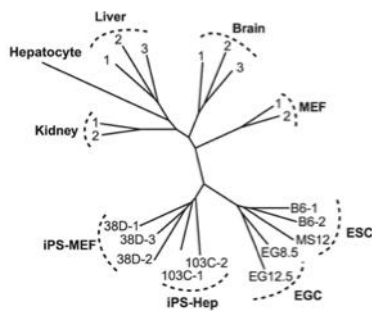


図2 T-DMR メチル化情報に基づいた細胞・組織のクラスタリング解析。DNA メチル化情報を用いると、iPS 細胞と ES 細胞も区別することができる。

(2) 体細胞核移植胚由来 TS 細胞の樹立

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ている。SCNT 胚では特に胎盤の形成異常が頻発し、栄養膜細胞に何らかのエピジェネティック異常のあることが期待された。そこで SCNT 胚盤胞由来 TS 細胞 (ntTS 細胞) を樹立したところ、意外なことに ntTS 細胞はコントロールと同等の割合で樹立され、DNA メチル化プロフィールに ntTS 細胞特有の異常は見つからなかった (図3、Oda et al., 2009)。仮に体細胞核のエピゲノムの「書き換え」が不十分であったとしても、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。

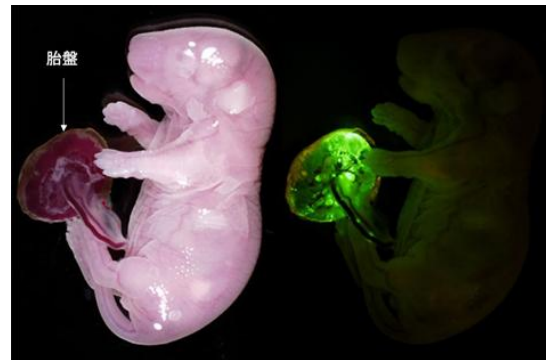


図3 ntTS 細胞を用いて作製されたキメラ胎盤。ntTS 細胞も胎盤の形成に寄与する一方、胚体組織への分布は見られない。

(3) 胚盤胞における栄養膜細胞特異的 DNA メチル化プロフィールの解析

ES 細胞と TS 細胞との比較から両者で DNA メチル化状態の異なる領域を選択し、さらに着床後の胚や胎盤組織を用いた解析から、ヒトとマウスに共通して栄養膜細胞系列・胚体細胞系列間で DNA メチル化状態の異なるゲノム領域 (T-E T-DMR) を同定した。胚盤胞の TE と ICM の分手法を新たに確立し (図4) それぞれのゲノム DNA を解析したところ、着床前の胚盤胞 (3.5 日、および、4.5 日胚) ではほぼメチル化されておらず、形態的な TE/ICM の分化が起こった後にそれぞれに固有の DNA メチル化プロフィールが確立されることが明瞭に示された。さらに、着床遅延胚、接着培養胚盤胞、および、非接着培養胚盤胞について DNA メチル化解析を行った結果、ほとんどメチル化されていない 3.5 日胚盤胞に対し、接着培養胚盤胞、非接着培養胚盤胞ではメチル化の上昇がみられ、T-E T-DMR における細胞系譜特異的な DNA メチル化は、体外培養胚盤胞では起こっていることが推測された。一方、着床遅延胚ではほとんどメチル化の上昇がみられなかった。着床遅延胚では形態的にも 3.5 日胚盤胞の状

態がほぼ保たれているのに対し、培養胚盤胞では栄養膜細胞の分化が進行していると考えられることから、T-E T-DMR における栄養膜細胞系譜特異的な DNA メチル化は時間の経過に伴って自動的に生じるのではなく、栄養膜細胞の分化の進行に伴っているものと結論した (Nakanishi et al., 2012)。マウス胚で最初にかかる細胞分化では、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。

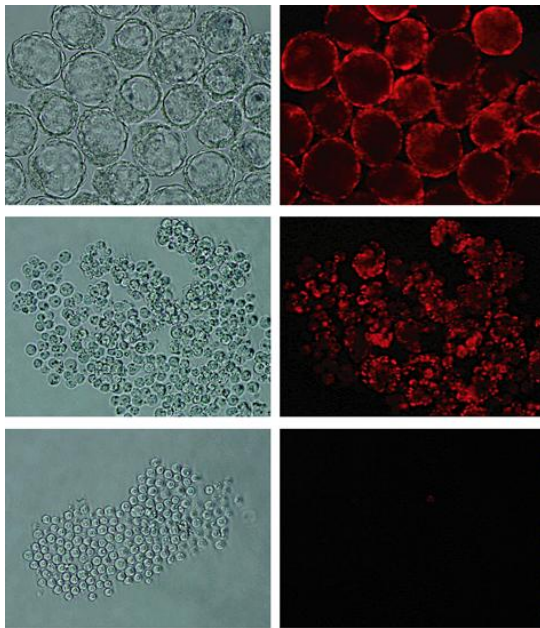


図4 胚盤胞からの TE および ICM の単離。DiI で染色された外側の細胞 (TE) と染色されない内側の細胞 (ICM) を区別して回収した。

T-E T-DMR のメチル化を担う DNA メチル基転移酵素 (Dnmt) の同定を目指し、さらに以下の 2 つの実験を行った。まず、新規型 Dnmt である Dnmt3a、Dnmt3b それぞれを欠損するマウス胚について T-E T-DMR のメチル化解析を行い、いずれの Dnmt も T-E T-DMR メチル化に寄与すること、そして、T-E T-DMR の中でも領域によってそれぞれの Dnmt の寄与の程度が異なることを明らかにした。次に、Dnmt 活性を欠く栄養膜幹細胞 (TKO TS 細胞) で各 Dnmt を強制発現させたところ、外因性の Dnmt は TKO TS 細胞のゲノムを「再メチル化」し、Dnmt3a と Dnmt3b は異なる標的嗜好性を示した。注目すべきことに、再メチル化は野生型 TS 細胞でメチル化される T-E T-DMR 特異的に起きていた。このことは、TS 細胞特異的な DNA

メチル化に必要な何らかのエピジェネティックマークが、TS 細胞のゲノム上に存在することを示唆した。そこで次に、その候補因子としてヒストン修飾に着目し、14 種類のヒストン修飾について TS 細胞、ES 細胞における T-E T-DMR の修飾状態を解析した。ここで明らかになったヒストン修飾状態と TKO TS 細胞に Dnmt を強制発現させた際に生じた再メチル化率との相関を調べたところ、H3K9me1、H3K9me2、H3K36me2、H3K36me3 の TS 細胞における修飾レベルと、Dnmt3a による再メチル化率との間に正の相関が見出された。さらに、この相関は TKO TS 細胞のヒストン修飾レベルでも保存されていた。この結果より、これらのヒストン修飾を手掛かりとして TS 細胞特異的な DNA メチル化プロファイルが確立されるというモデルが推測された。

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 12 件)

- ① Nakanishi, M., Hayakawa, K., Nakabayashi, K., Hata, K., Shiota, K., and Tanaka, S. Trophoblast-specific DNA methylation occurs after the segregation of the trophoblast and inner cell mass in the mouse periimplantation embryo. *Epigenetics* **71**, 173-182 (2012). 【査読あり】
- ② Okae, H., Hiura, H., Nishida, Y., Funayama, R., Tanaka, S., Chiba, H., Yaegashi, N., Nakayama, K., Sasaki, H., and Arima, T. Re-investigation and RNA sequencing-based identification of genes with placenta-specific imprinted expression. *Hum Mol Genet.* **21**, 548-558 (2012). 【査読あり】
- ③ 中西もも, 田中智, 栄養膜幹細胞. *臨床婦人科産科* **65**, 260-265 (2011). 【査読なし】
- ④ Nishino, K., Hattori, N. Sato, S., Arai, Y., Tanaka, S., Nagy, A., and Shiota, K. Non-CpG methylation occurs in the regulatory region of *Sry* gene. *J. Reprod. Dev.* **57**, 586-593 (2011). 【査読あり】
- ⑤ Sato, S., Maeda, C., Hattori, N., Yagi, S., Tanaka, S., and Shiota, K. DNA Methylation-dependent modulator of *Gsg2/Haspin* gene expression. *J. Reprod. Dev.* **57**, 526-533 (2011). 【査読あり】
- ⑥ Muramoto, H., Yagi, S., Hirabayashi,

- K., Sato, S., Ohgane, J., Tanaka, S., and Shiota, K. Enrichment of short interspersed transposable elements to embryonic stem cell-specific hypomethylated gene regions. *Genes Cells* **15**, 855-865 (2010). 【査読あり】
- ⑦ Sato, S., Yagi, S., Arai, Y., Hirabayashi, K., Hattori, N., Iwatani, M., Okita, K., Ohgane, J., Tanaka, S., Wakayama, T., Yamanaka, S., and Shiota, K. 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】
- ⑧ 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】
- ⑨ Ikegami, K., Ohgane, J., Tanaka, S., Yagi, S., and Shiota, K. Interplay between DNA methylation, histone modification and chromatin remodeling in stem cells and during development. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 203-214 (2010). 【invited review、査読あり】
- ⑩ Lim, H.W., Iwatani, M., Hattori, N., Tanaka, S., Yagi, S., and Shiota, K. Resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine in genic regions compared to non-genic repetitive sequences. *J. Reprod. Dev.* **56**, 86-93 (2010). 【査読あり】
- ⑪ Oda, M., Tanaka, S., Yamazaki, Y., Ohta, H., Iwatani, M., Suzuki, M., Ohgane, J., Hattori, N., Yanagimachi, R., Wakayama, T., and Shiota, K. (OM and TS contributed equally) 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】
- ⑫ Yagi, S., Hirabayashi, K., Sato, S., Li, W., Takahashi, Y., Hirakawa, T., Wu, G., Hattori, N., Hattori, N., Ohgane, J., Tanaka, S., Liu, X.S., and Shiota, K. 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 9 件）
- ① Nakanishi, M.O., et al., Trophoblast-specific DNA methylation occurs after the segregation of trophoblast and inner cell mass in mouse preimplantation embryo. The 2nd World Congress on Reproductive Biology, 2011.10.10, Cairns, Australia. 【ポスター】
- ② Tanaka, S. Difference in the DNA methylation status arises after segregation of trophoblast and embryonic cell lineages.国際生殖シンポジウム「生殖生物学の革命と展望：体外受精、胚性幹細胞、エピジェネティクスの展望」、2011.9.14、岩手。【招待講演】
- ③ Nakanishi, M.O., et al., Trophoblast-specific DNA methylation occurs after the segregation of trophoblast and inner cell mass in mouse periimplantation embryo.国際生殖シンポジウム「生殖生物学の革命と展望：体外受精、胚性幹細胞、エピジェネティクスの展望」、2011.9.13-15、岩手。【ポスター】
- ④ Nakanishi, M.O., 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, 2010.7.31、Milwaukee, USA. 【一般口頭】
- ⑤ Tanaka, S. Normalcy of trophoblast stem cells derived from cloned mouse embryos. The First SKLRB Symposia on Frontiers in Periimplantation Biology, 2010.5.12、北京。【招待講演】
- ⑥ 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】
- ⑦ 姫野 絵美, 他、マウス ES 細胞での Lin28 の機能解析、第 146 回日本獣医学会学術集会、2008.9.24-26、宮崎。【一般口頭】
- ⑧ 吉岡 徹哉, 他、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】
- ⑨ 早川 晃司, 他、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】

〔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.4.1-1E.4.27 (2008).

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

雑誌論文①に関する研究科プレスリリース

<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/tanaka090826.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 智 (TANAKA SATOSHI)
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

(2) 研究分担者

大鐘 潤 (OHGANE JUN)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教（～H23.3）
明治大学・農学部・講師（H23.4～）
研究者番号：50313078

(3) 連携研究者

塩田 邦郎 (SHIOTA KUNIO)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：80196352