

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07764

研究課題名(和文) 同ドナー細胞由来の体細胞クローン牛を用いたゲノムワイドなエピジェネティクス解析

研究課題名(英文) Genome-wide epigenetic analysis of cloned cattle from the same donor cells

研究代表者

金田 正弘 (Kaneda, Masahiro)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80469840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：同ドナー細胞由来の体細胞クローン牛の組織を用いて、DNAメチル化をターゲットとしたゲノムワイドなエピジェネティクス解析を行った。同ドナー細胞由来の体細胞クローン牛5頭およびコントロールとして非クローン牛5頭の肝臓からゲノムDNAを抽出し、MeDIP-chip法によるDNAメチル化解析を行った。その結果、クローン牛に比べて非クローン牛の方が個体間のばらつきが大きかった。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide epigenetic analysis focusing on DNA methylation levels were conducted using tissues from cloned cattle derived from the same donor cells. Five cloned cattle from the same donor cells and five non-cloned cattle were used for the analysis. Genomic DNA was extracted from liver and MeDIP (Methylated DNA Immunoprecipitation)-chip method was used for DNA methylation analysis. The correlation clustering showed that the difference among individual cattle was larger in non-cloned group compared to cloned group.

研究分野：繁殖生物学

キーワード：体細胞クローン牛 エピジェネティクス DNAメチル化 MeDIP-chip

1. 研究開始当初の背景

(1) 全く同一のゲノムを持つ一卵性双生児でも、見た目は良く似ているが、指紋や性格は同一ではない。体細胞クローン動物においても同様で、ドナーとなる個体と全く同一のゲノムを持つにもかかわらず、毛皮の模様や鼻紋、性格などが異なっていることが知られている。その違いは、ゲノムを修飾し遺伝子発現を制御するエピジェネティクスの状態が、加齢や栄養などの環境的要因によって変化するために生じると考えられている。生物の表現型は遺伝的要因(ゲノム)と環境的要因(エピゲノム=ゲノムワイドなエピジェネティクスの状態)の両方に支配されているため、遺伝的要因が同一である一卵性双生児や体細胞クローン動物同士を比較することで、環境的要因が表現型に与える影響を直接的に解析することができる。

(2) 一方で、家畜におけるゲノムワイドなエピジェネティクス研究はまだ緒についたばかりであり、ヒトやマウスのようなモデル動物を使った研究に比べると、大幅に遅滞している。特に、家畜ではマウスのような近交系モデルが存在しないため、遺伝的な要因と環境的要因を区別することが困難である。

2. 研究の目的

(1) 同一ゲノムを持つ同一ドナー細胞由来の体細胞クローン牛を材料に、個体間のエピジェネティクスの違いについて、DNA のメチル化を指標として非クローン牛と比較する。

(2) 研究の遅れている家畜のエピジェネティクス研究の進展に資する新たなデータを取得する。

3. 研究の方法

(1) 同一ドナー細胞由来の体細胞クローン牛(黒毛和種、メス、月齢 68~82 ヶ月)および非クローン牛(黒毛和種、メス、月齢 52~129 ヶ月)から種々臓器(心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、小腸、骨格筋)の一部を採取し、ゲノム DNA を抽出後、MeDIP(Methylated DNA Immunoprecipitation)-chip 法によるゲノムワイドな DNA メチル化解析を行った(肝臓のみ)。

(2) その他の臓器については、バイサルファイトシーケンス法にてインプリント遺伝子(*H19*, *PEG3*, *XIST*)およびセントロメアに存在する反復配列 Satellite I and II 領域について解析を行った。

(3) (1) でクローン牛・非クローン牛間で有意な差のあった領域については、パイロシーケンス法によって詳細な解析を行った。

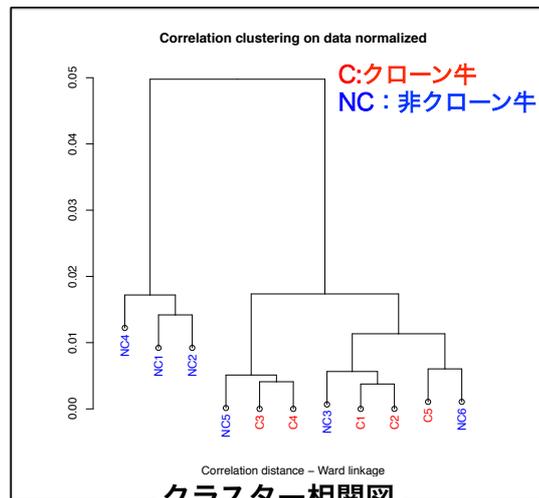
(4) 解析する領域を増やすため、ウシの単為発生胚由来線維芽細胞を用いて、マイクロアレイ法による新規ウシ父性インプリント遺伝子の同定を行った。

(5) クローン牛の生殖細胞における DNA メチル化状態を解析するため、末梢血(体細胞)・精子・卵子から DNA を抽出し、インプ

リント遺伝子(*H19*, *PEG3*, *XIST*)、多能性関連遺伝子(*OCT3/4*, *NANOG*)、反復配列(Satellite I and II, alpha-satellite, art2)の DNA メチル化レベルをバイサルファイトシーケンス法により解析した。

4. 研究成果

(1) MeDIP-chip の結果から、クローン牛に比べて非クローン牛の方が個体間のばらつきが大きいことが分かった。



クラスタ相関図

一方で、バイサルファイトシーケンス法にて解析した *H19*, *PEG3*, *XIST* の 3 インプリント遺伝子および Satellite I and II の 2 領域については、クローン牛間と非クローン牛間で有意な差を検出することは出来なかった。また、MeDIP-chip 法で有意な差のあった *IGF2R* 領域について、パイロシーケンス法によるメチル化解析を行ったところ、非クローン牛の方がクローン牛よりも高いメチル化レベルを示した。これらの結果は、一部の遺伝子座については、遺伝的要因がエピジェネティクスの変動に関与している可能性を示唆している。

(2) 各臓器間における DNA メチル化の違いを検出するため、バイサルファイトシーケンス法によるメチル化解析を行った。クローン牛間および非クローン牛間でのばらつきの差を検出したところ、脾臓における *H19* 遺伝子のみクローン牛間の方が非クローン牛間よりも有意にばらつきが小さかったものの、ほとんど全ての臓器において、遺伝子・領域間で DNA メチル化の個体差(ばらつき)にクローン牛・非クローン牛間で差が無かった。これらの結果は、遺伝的要因がエピジェネティクスに影響を与えていない(与えていたとしてもごくわずか)であることを示唆している。つまり、エピジェネティックな違いはジェネティックな要因というよりも、発生過程・成長過程における環境的要因の影響に大きく支配されていると考えられる。

(3) 本研究では、すでにヒト・マウスで同定・解析され、ウシにおいても既知であるインプリント遺伝子にターゲットを絞って解析したが、インプリント遺伝子には種による

違いや組織による違い、さらには発生過程における違いが存在していることが知られている。これまでのウシにおけるインプリント遺伝子の研究は、ヒト・マウスで同定されたインプリント遺伝子がウシでもインプリントされているかを解析するものであった。そのため、ウシで新規のインプリント遺伝子は同定されていない。そこで、家畜における新規インプリント遺伝子の同定を目指し、ウシの単為発生胚由来線維芽細胞を用いたマイクロアレイ法による解析を行った。胎生 40 日齢のウシ単為発生胚および正常発生胚（オス）から線維芽細胞を調製し、既知の父性発現インプリント遺伝子（*IGF2*, *PEG3*, *ZAC1*, *NDN*, *DLK1*, *SGCE*, *PEG10*, *IMAPCT*, *MAGEL2*, *SNRPN*, *PEG1/MEST*）および既知の母性発現インプリント遺伝子（*IGF2R*, *H19*, *GNAS*, *UBE3A*, *GRB10*, *GTL2*, *CDKN1C*）の発現を解析したところ、興味深いことに *IMPACT*, *MAGEL2*, *SNRPN*, *PEG1/MEST* は父性ゲノムを持たない単為発生胚由来線維芽細胞においても発現が認められた。一方で、*CDKN1C* は単為発生胚由来線維芽細胞でのみ発現が見られなかった。これらの発現パターンはヒト・マウスで見られたパターンとは異なるため、ウシ独自あるいは組織独自にインプリントされている可能性が示唆された。

また、インプリント遺伝子 DMR (Differentially Methylated Region) のメチル化を解析したところ、精子でのみメチル化される *H19* 遺伝子は単為発生胚由来線維芽細胞ではほぼ完全に脱メチル化されている一方、卵子でのみメチル化される *PEG3* および *PEG10* はほぼ完全にメチル化されていた。これらのことから、ウシ単為発生胚由来線維芽細胞は卵子のメチル化パターンを継承しており、それに従ってインプリント遺伝子の片親特異的発現が制御されているものと考えられる。興味深いことに、ウシ卵子でも完全にメチル化されることが分かっている *SNRPN* 遺伝子は単為発生胚由来線維芽細胞で体細胞と同程度の 30% 程度のメチル化に過ぎず、このことが *SNRPN* 遺伝子の片親特異的発現を破綻させているものと考えられた。

(4) 体細胞クローン牛の生殖系列において適切なリプログラミングが起きているかどうかを明らかにするために、体細胞クローン牛の末梢白血球（体細胞）・精子あるいは卵子を採取し、DNA を抽出しバイサルファイトシーケンス法による DNA メチル化解析を行った。体細胞クローン雄牛 9 頭（うち同一ドナー細胞由来のクローン牛 3 頭を含む）および体細胞クローン牛雌牛 4 頭を解析に用いた。

精子でメチル化されるインプリント遺伝子 *H19* はクローン牛・非クローン牛ともに精子でほぼ完全にメチル化しており、一方、卵子でメチル化されるインプリント遺伝子 *PEG3* はクローン牛・非クローン牛ともに精子でほぼ完全に脱メチル化されていた。*XIST* 遺伝子および *OCT3/4* 遺伝子のメチル化も同様

であった。*NANOG* 遺伝子は精子で 20%-30% 程度のメチル化であった。これらのメチル化の状態に、クローン牛・非クローン牛間で有意な差は無かった。卵子では細胞数の少なさから、単一遺伝子の解析はできなかったものの、セントロメアに存在する反復配列である Satellite I and II および alpha-satellite 領域、さらに染色体全体に存在する反復配列 *art2* の DNA メチル化状態を解析した。その結果、クローン牛・非クローン牛ともに有意な差は検出できなかった。

体細胞である末梢白血球のメチル化は個体による違いがかなりあったものの、同一ドナー細胞由来の体細胞クローン牛とその他のクローン牛・非クローン牛間でメチル化レベルに違いは無かった。

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 2 件）

- ① Kaneda M, Takahashi M, Yamanaka KI, Saito K, Taniguchi M, Akagi S, Watanabe S, Nagai T, Proper reprogramming of imprinted and non-imprinted genes in cloned cattle gametogenesis, *Journal of Reproduction and Development* 63(4): 365-375, 2017、査読有り
doi:10.1262/jrd.2017-040.
- ② Kaneda M, Watanabe S, Akagi S, Inaba Y, Geshi M, Nagai T, Proper reprogramming of imprinted and non-imprinted genes in cloned cattle gametogenesis, *Animal Science Journal* 88(11): 1678-1685, 2017、査読有り
doi:10.1111/asj.12846.

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 金田正弘、体細胞クローン研究の最前線、第 4 回テニユアトラックシンポジウム、2016 年
- ② 武田久美子・小林栄治・金田正弘・田上貴寛・渡邊伸也、牛凍結精液の精子核 DNA メチル化可変部位の COBRA 法による検出、日本畜産学会第 121 回大会、2016 年
- ③ 金田正弘、Epigenetic analysis of bovine parthenogenetic embryonic fibroblasts、新学術領域研究“生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御”国際シンポジウム、2016 年

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 正弘 (KANEDA, Masahiro)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：80469840

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし

(4)研究協力者
Helene Kiefer (KIEFER, Helene)
Luc Jouneau (JOUNEAU, Luc)
Hélène Jammes (JAMMES, Hélène)
Sandrine Balzergue (BALZERGUE, Sandrine)