

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 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658086

研究課題名（和文） 雌マウス体細胞からの *in vitro* 精子細胞樹立研究課題名（英文） Establishment of sperm cells *in vitro* from female mouse somatic cells

研究代表者

金田 正弘 (KANEDA MASAHIRO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・家畜育種繁殖研究領域・主任研究員

研究者番号：80469840

研究成果の概要（和文）：

哺乳類の正常発生に必須なプロセスである生殖細胞形成過程におけるゲノムの印付け（インプリンティング）に着目し、*in vitro* で機能的な配偶子を形成するために、インプリンティングの分子の実体である DNA メチル化を人為的に操作することによって、雌マウス体細胞型のインプリンティングパターンを精子型に変化させることを目的に実験を行った。3 種類の DNA メチル化阻害剤をマウス線維芽細胞に作用させたが、一部のインプリント遺伝子のメチル化が低下したものの、全ての遺伝子のメチル化レベルを低下させることはできなかった。

研究成果の概要（英文）：

Genomic imprinting is indispensable for the proper mammalian development and is established during gametogenesis. I focused on DNA methylation, which plays an essential role for the establishment of imprinting, to create sperm-like cells from female mouse somatic cells *in vitro*. Three different types of DNA methylation inhibitors were added to mouse embryonic fibroblast and DNA methylation status was analyzed. There was a decrease of DNA methylation levels in some imprinted genes, however, no inhibitors could induce hypo-methylation in all imprinted genes analyzed.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,300,000 | 0 | 1,300,000 |
| 2011 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 510,000 | 3,510,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：発生工学、生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでに、マウス ES 細胞などの多能性幹細胞から *in vitro* で生殖細胞を形成しようとする試みは、国内外の多くの研究グループが挑戦し、実際に ES 細胞から卵子 (*Science*, 2003) や精子 (*PNAS*, 2003 and *Dev.*

Cell, 2006) 様の細胞を樹立したという報告はされている。しかしながら、これらの卵子・精子様細胞から健康な仔が生まれたという報告はまだ無い (2006 年の論文では ICSI (卵細胞質内精子注入法) によって仔は生まれたが、インプリント遺伝子の発現に異常が

あり生後死亡した)。最近、齋藤らがマウスのES細胞・iPS細胞から始原生殖細胞を高効率に誘導し、精巣へ移植することによって健康なマウスを作出することに成功した (Cell, 2011)。しかし、この研究は完全に体外において生殖細胞形成を完成させたわけではない。

(2) 一方で、2004年に河野らにより作製された二母性マウス Kaguya (Nature, 2004) の存在は「機能的な」配偶子形成に関して、非常に重要な示唆を与えてくれた。つまり、精子がなくとも、インプリント遺伝子の発現を補正さえすれば、発生は正常に進み、健康な個体を得ることができるということが示された。すなわち、父性インプリントが確立された半数体のゲノムさえ用意できれば (それが精子のように運動能を持つ必要は無い)、卵子に注入することにより正常な個体を得ることができる可能性が充分にある、ということである。

(3) これまでに、インプリンティングに関与する遺伝子はDNAメチル化酵素などいくつか見つかっているが、逆に、インプリンティングを確立するために何が必要なのか、という観点からの研究は行われてこなかった。河野らは、マウスの未成熟卵子にDNAメチル化酵素 Dnmt3a および Dnmt3L を強制発現させることでインプリントの確立を起こそうと試みたが、一部の遺伝子でメチル化が高くなったものの、全てのインプリント遺伝子のメチル化レベルを上げるまでには至らなかった (第104回日本繁殖生物学会大会)。

2. 研究の目的

(1) 哺乳類の正常な発生に必須なゲノムインプリンティングおよびその分子の実体であるDNAのメチル化に着目し、メチル化を人為的に操作することによって、「機能的な半数体精子細胞」の *in vitro* における確立を目指す。

(2) そのために、まずマウス体細胞を脱メチル化剤処理することで、インプリントを人為的に消去させる。

(3) その後、すでに同定されている父性インプリントの確立に必要な遺伝子群を強制発現させ、精子型インプリントの確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) PWK マウスの胎生 14.5 日目の胎子 (雌 2 匹) より樹立した線維芽細胞を用いて、3 種類の DNA メチル化阻害剤 (Zebularine, DNA methylation inhibitor RG108 および

5-Aza-2'-deoxycytidine) を添加し、インプリント遺伝子および反復配列領域におけるDNAメチル化状態を解析した。解析した領域は、精子でメチル化されるインプリント遺伝子である *H19*, IG-DMR, *Rasgrf1*、卵子でメチル化されるインプリント遺伝子 *Igf2r*, *Peg1*, *Peg3*, *Lit1*, *Snrpn*、さらにゲノム全体のメチル化レベルを解析するために、反復配列である *Line1* の 5' および 3' 領域、*IAP*, Major satellite, Minor satellite 領域を選んだ。

(2) 薬剤処理した線維芽細胞からDNAを回収し、バイサルファイト処理を行った後、上記プライマーによるPCRを行った。PCR産物が確認できたものについては、制限酵素処理によりメチル化レベルを電気泳動で確認した (COBRA法)。

(3) より詳細なDNAメチル化の定量を行うために、QIAGEN社のQIAxcelフラグメント解析装置を用いた (Bio-COBR法)。

(4) 脱メチル化による遺伝子発現の変化を解析するために、薬剤処理した線維芽細胞からRNAを抽出し、DNAメチル化酵素 *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*、インプリント遺伝子 *Igf2*, *H19*, *Igf2r*, *Cdkn1c*, *Dlk1*, *Gtl2*、レトロトランスポゾン *MT*, *MuERV* の発現量をリアルタイムPCR装置を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) まず、DNAメチル化阻害剤の至適濃度を探るために、それぞれの薬剤を 1, 10, 50, 100 μ M (5-Aza-2'-deoxycytidine は 0.1, 1, 10 μ M) 添加し、培養を行い、約2週間後の細胞 (♀1 および ♀2) からDNAを回収した。なお、Zebularine 添加群は 50 および 100 μ M でほとんどの細胞が死に絶えたため、DNAを回収することはできなかった。

その後、DNAをバイサルファイト処理し、遺伝子特異的なプライマーを用いたPCRを行い、PCR産物を制限酵素処理してメチル化の状態をアガロースゲル電気泳動により解析した。

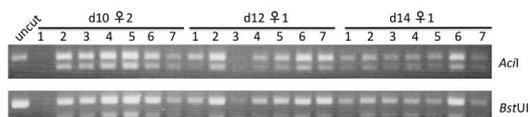


図1: *Igf2r* 遺伝子のメチル化解析 (右は用いた制限酵素。メチル化されるほど良く切れる)

#1: control

#2: 1 μ M RG108, #3: 10 μ M RG108, #4: 50 μ M RG108, #5: 100 μ M RG108

#6: 1 μ M Zebularine, #7: 10 μ M Zebularine

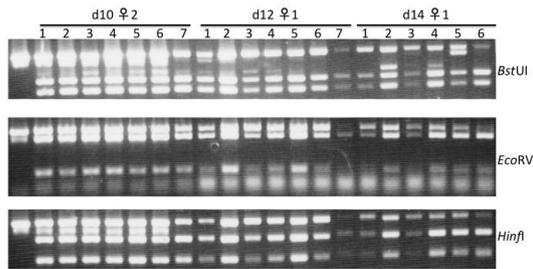
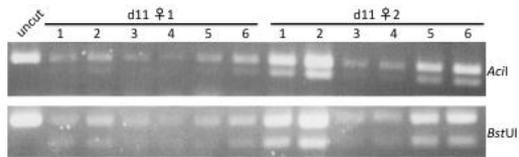
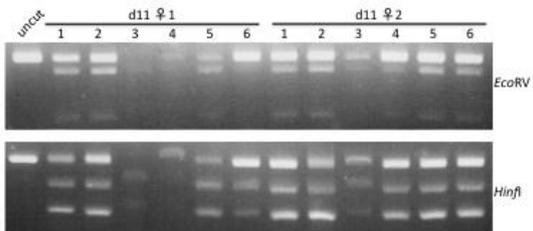


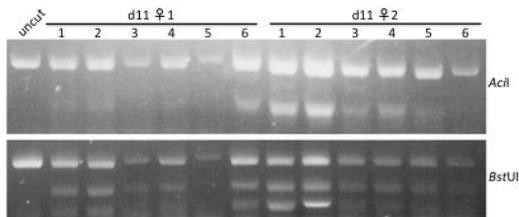
図2: *Peg3* 遺伝子のメチル化解析
 #1:control, #2:1 μ M RG108, #3:10 μ M RG108,
 #4:50 μ M RG108, #5:100 μ M RG108, #6:1 μ M
 Zebularine, #7:10 μ M Zebularine



Igf2r 遺伝子のメチル化解析



Peg3 遺伝子のメチル化解析



Snrpn 遺伝子のメチル化解析

図3: *Igf2r*, *Peg3*, *Snrpn* 各遺伝子のメチル化解析

#1:control, #2:0.1 μ M 5-aza, #3:1 μ M 5-aza,
 #4:10 μ M 5-aza, #5:100 μ M RG108, #6:10 μ M
 Zebularine

これらの結果から、全ての遺伝子について明らかにメチル化を低下させる薬剤・至適濃度は見つけられなかった。

(2) COBRA 法では十分なメチル化レベルの定量ができないため、QIAGEN 社のフラグメント解析装置 QIAxcel を用いたバンドの定量法を試みた。それぞれの遺伝子について、PCR 後のフラグメントを制限酵素処理し、塩濃度の影響を除くため磁気ビーズを用いて精製した。

d8-d11 は薬剤添加後の培養日数を示す。

| d8 ♀2 | 0 | RG108 1 μ M | RG108 10 μ M | RG108 50 μ M | RG108 100 μ M | Zebularine 1 μ M | Zebularine 10 μ M |
|--------------|-----|-------------------|------------------|------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Igf2r</i> | 49% | 60% | 50% | 48% | 48% | 51% | 62% |
| <i>H19</i> | 86% | 63% | 92% | 61% | 62% | 61% | 78% |
| <i>Peg3</i> | 51% | 32% | 28% | 30% | 54% | 49% | 60% |
| d10 ♀2 | 0 | RG108 1 μ M | RG108 10 μ M | RG108 50 μ M | RG108 100 μ M | Zebularine 1 μ M | Zebularine 10 μ M |
| <i>Igf2r</i> | 50% | 43% | 64% | 49% | 56% | 57% | 49% |
| <i>H19</i> | 75% | 73% | 86% | 61% | 56% | 85% | 94% |
| <i>Peg3</i> | 44% | 41% | 49% | 43% | 33% | 52% | 48% |
| d11 ♀1 | 0 | 5-Aza 0.1 μ M | 5-Aza 1 μ M | 5-Aza 10 μ M | RG108 100 μ M | Zebularine 10 μ M | |
| <i>Igf2r</i> | 53% | 64% | 54% | 51% | 47% | 49% | |
| <i>H19</i> | 66% | 63% | 92% | n.d. | 85% | 65% | |
| <i>Peg3</i> | 57% | 43% | 61% | 75% | 47% | 44% | |
| d11 ♀2 | 0 | 5-Aza 0.1 μ M | 5-Aza 1 μ M | 5-Aza 10 μ M | RG108 100 μ M | Zebularine 10 μ M | |
| <i>Igf2r</i> | 49% | 48% | 65% | 55% | 42% | 50% | |
| <i>H19</i> | 55% | 64% | 52% | 64% | 65% | 56% | |
| <i>Peg3</i> | 43% | 45% | 29% | 62% | 52% | 46% | |

表: 各薬剤添加群におけるメチル化の程度

一部の遺伝子・薬剤濃度で低メチル化が認められたが、全ての遺伝子について明らかに脱メチル化される薬剤・至適濃度を見つけることはできなかった。

Bio-COBRA 法についてはサンプル処理法などに更なる最適化が必要であると考えられる。

(3) 遺伝子発現については、各濃度の DNA メチル化阻害剤を培養細胞に 2 週間添加後、RNA を回収してリアルタイム PCR を行った。

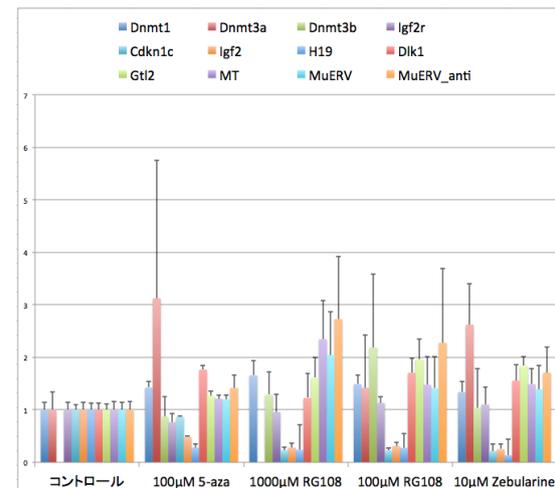


図4: 各薬剤添加群における遺伝子発現量 (各3レプリカ)

コントロール (非添加区) に比べ、インプリント遺伝子 *Igf2*, *H19* は全ての添加区で発現が有意に減少した。*Cdkn1c* は 5-aza 添加区以外で発現が有意に減少した。*Dnmt3a* は 1000 μ M RG108 添加区で発現が消失した。一方、*Dnmt3b* はコントロールでは発現していなかったが、薬剤添加群ではいずれも発現していた。また、レトロポゾン遺伝子である *MT* および *MuERV* はいずれの添加区においても発現が上昇する傾向にあった。

これらの結果から、一部の遺伝子についてはメチル化阻害剤の添加が発現に影響を与えたことが明らかになった。

以上の結果から、今回用いたマウス胎子線維芽細胞に DNA メチル化阻害剤を添加しただけでは十分な脱メチル化を引き起こすことができない、ということが明らかになった。

その原因として、これらの DNA メチル化阻害剤は主に維持メチル化酵素である DNMT1 を阻害するため、積極的な脱メチル化ではなく、細胞増殖に伴うメチル化の希釈を引き起こすために、結果として十分な脱メチル化が起こらなかったと考えられる。そのため、より増殖速度の速い ES 細胞を用いる、積極的に脱メチル化を引き起こすための遺伝子導入を行う、といったアプローチが必要になると考えられる。

また、インプリント確立に必須な Dnmt3a および Dnmt3b のみを強制発現させただけではインプリント確立が起こらなかったことから、今後はどのような因子が必要であるかをスクリーニングするための系をまず確立する必要がある。

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 2 件)

① Masahiro Kaneda

Genomic imprinting in mammals-Epigenetic parental memories.

Differentiation

査読有り

Vol. 82, 2011, 51-56.

② Masahiro Kaneda, Satoshi Akagi, Shinya Watanabe and Takashi Nagai

Comparison of DNA methylation levels of repetitive loci during bovine development.

BMC Proceedings

査読有り

Vol. 5, 2011, S3.

doi:10.1186/1753-6561-5-S4-S3

[学会発表] (計 3 件)

① 金田正弘、渡辺伸也、赤木悟史、原口清輝、Somfai Tamas、稲葉泰志、下司雅也、永井卓

体細胞クローン雌牛の卵子 DNA メチル化解析
第 104 回日本繁殖生物学会大会

2011. 9. 15 盛岡市

② 金田正弘、赤木悟史、渡辺伸也、Tamas Somfai、下司雅也、橋谷田豊、高橋昌志、山中賢一、齋藤公治、永井卓

単為発生胚由来線維芽細胞を用いたマイクロアレイによる新規インプリント遺伝子の探索

第 5 回日本エピジェネティクス研究会年会

2011. 5. 19 熊本市

③ 金田正弘、赤木悟史、渡辺伸也、Somfai Tamas、原口清輝、下司雅也、橋谷田豊、高橋昌志、山中賢一、齋藤公治、森正臣、永井卓

Analysis of bovine parthenogenetic embryonic fibroblasts and search for novel imprinted genes in cattle

International Symposium on "Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells"

2010. 11. 23 福岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 正弘 (KANEDA MASAHIRO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・家畜育種繁殖研究領域・主任研究員

研究者番号：80469840