

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：15101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700456

研究課題名（和文） マウス受精卵の前核で決まる雌雄ゲノム特性の解析

研究課題名（英文） Analysis of difference between female and male genome determined in pronuclear stage embryo.

研究代表者

中西 友子（NAKANISHI TOMOKO）

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：10344863

研究成果の概要（和文）：哺乳類では雌雄に由来するゲノムの機能が異なる。我々は、外来性DNAを受精卵の雌雄前核に注入すると、雌雄どちらのゲノムに導入されたかによって異なるメチル化状態を示すことを見つけた。この系を利用してH19インプリント制御領域の解析を行ったところ、雄性ゲノムで雌性ゲノムより高いメチル化状態を示した。このことは受精後に雌雄ゲノム特異的なエピジェネティック修飾を認識することで、インプリント遺伝子のメチル化状態を制御する機構があることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：In mammals, a fundamental function differs between maternal and paternal genomes. We found that exogenous DNA was controlled differently in its methylation status after injection into the female or male pronucleus. When H19 imprinting control region was used for exogenous DNA, its methylation level was higher in male pronucleus injection than that by female pronucleus injection. This result suggests that maternal and paternal specific epigenetic marks in embryos may contribute in the establishment and maintenance of parental origin specific methylation of imprinting genes after fertilization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,550,000	465,000	2,015,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	4,650,000	1,395,000	6,045,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：雌雄前核、DNA脱メチル化、受精卵、Bisulfite sequencing、ゲノムインプリンティング、マイクロインジェクション、GFP

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳動物は有性生殖を行い、両親から一対のゲノムを受け継ぐことで、初めて発生可能となる。しかし2倍体であっても、

単為生殖胚のように片親ゲノムしか持たない胚は、発生を完了できない。これは、配偶子が作られる過程で精子・卵子のゲノムが異なるエピジェネティックな修飾を受け、その結果、一方の対立遺伝子からだけ発現する遺

伝子（インプリント遺伝子）が存在するためである。このように、雌雄のゲノムで異なる機能を確立し維持する現象を、ゲノムインプリンティングという。

配偶子形成過程で確立されたインプリントメチル化がインプリントとして働くためには、受精した後の胚発生を通して、精子と卵子でのメチル化が維持される必要がある。特に受精後の胚では、核の再プログラム化に伴うゲノム全体の脱メチル化が起こるため、雌雄ゲノムにおける差異を維持することは重要なステップとなる。しかし、そのような中で、どのようにしてインプリント遺伝子のメチル化だけを雌雄ゲノムで選択的に維持するのかについては不明な点が多い。またこの時期の解析は、生殖細胞や初期胚を使った解析となるため、大部分が遺伝子欠損マウスを利用して行われており、更なる研究の発展には容易で効率的な解析システムの開発が求められている。

我々は、メチル化した外来性の DNA を、グローバルな脱メチル化が起こる雄の前核や、脱メチル化がおこらない雌の前核に入れると、同じ DNA でありながら、この時期のホストのメチル化の状態に従い、雄の前核で脱メチル化を受けることを見いだした。そこで、このシステムを利用して、受精後の雌雄ゲノムの再プログラム化やインプリント遺伝子調節機構を明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、配偶子形成後の前核期に染色体に導入された外来性 DNA で雌雄のゲノム機能の差異が確立されることに着目し、受精卵の前核期における脱メチル化機能を、前核内に注入した様々な配列を持つ外来性 DNA のメチル化状態を追跡することで解析し、前核での脱メチル化の仕組みや、雌雄ゲノムの機能制御における分子機構を明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

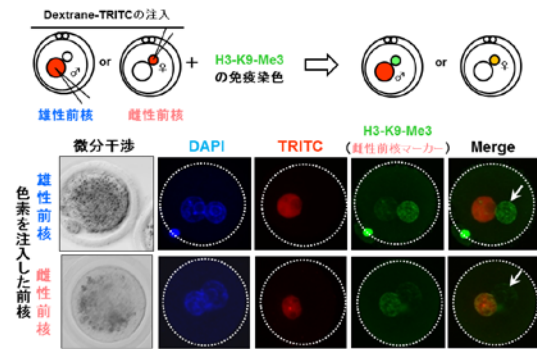
マウス受精卵は、PMS と HCG で過排卵処理した BDF1 の雌を BDF1 の雄と交配させることで得た。外来性 DNA としては CX-EGFP および H19ICR をメチル化転移酵素 SssI でメチル化したりしなかったりしたものを用いた。雌雄前核に注入した後の外来性 DNA メチル化状態は、Zymoresearch 社のキットを用いて Bisulfite sequencing 法により解析を行った。

4. 研究成果

(1) 雌雄前核打ち分けシステムの構築

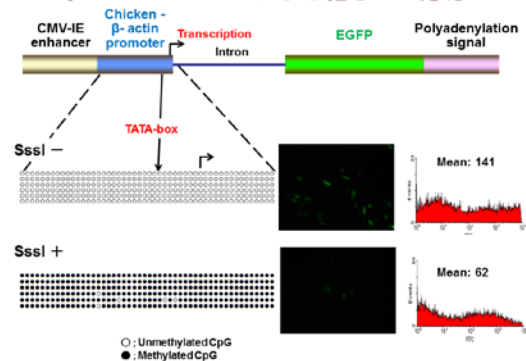
雌雄前核内に TIRTC 標識されたデキストランをそれぞれ注入し、雌性ゲノムを特異的に染色する H3K9me3 抗体で免疫組織化学染色を行った。その結果、雌雄前核を 97% の割合で判別できることが明らかになった（図 1）。

図 1 色素の前核注入と免疫染色による雌雄前核の識別



そこで、雌雄前核に外来性 DNA を注入した後そのメチル化状態の変化をモニターすることを目的とし、全身で GFP を発現するレポーター遺伝子 (CX-EGFP) をメチル基転移酵素 Sss I でメチル化したものとしていないものを用意した。それらの DNA を HEK293 および MG-63 細胞株に遺伝子導入したところ、メチル化した CX-EGFP はメチル化していないものと比較して EGFP の発現が低かった（図 2）。このことから、EGFP の発現強度で CX-EGFP のメチル化状態を追跡可能なことが示唆された。

図 2 pCAGGS-EGFP のメチル化と GFP 発現



(2) 外来性 DNA の雌雄前核への注入

① 胚盤胞での解析

メチル化した CX-EGFP を雌雄前核に注入した後、胚盤胞期まで培養し胚盤胞それぞれに

ついて Bisulfite sequencing 解析を行った。その結果、雌雄前核どちらに注入しても約 80% の CpG が脱メチル化されていた。このことは、雌雄どちらの前核に入れても、外来性 DNA が受精後のグローバルな脱メチル化を受けることを示唆している。解析前の胚盤胞が強い EGFP の蛍光を示したことから、脱メチル化が進行したことが明らかであった。

②マウスでの解析

メチル化 CX-EGFP を雌雄前核へ注入した後、生後 5 週令のトランスジェニックマウスで CX-EGFP のメチル化状態を解析すると、雄性前核に注入した場合は 88% の CpG が脱メチル化されていた。それに対し、雌性前核に注入して作製したマウスでは、脱メチル化されていたのは 65% のみであった。

③胚盤胞とマウスの比較

胚盤胞とマウスの結果から考察すると、雌雄前核に注入した CX-EGFP は、胚盤胞にかけて脱メチル化された後、雄性前核ではその状態を保つのにに対し、雌性前核ではメチル化が付加されることが明らかとなった。このことは、雌雄ゲノムのエピジェネティックな差異を認識することで雌性ゲノム特異的にメチル化が付与されたことを示唆している。また、非メチル化 DNA を注入した時には、雌雄どちらの前核に注入してもほとんどメチル化されなかったことから、注入時のメチル化状態の記憶が残っていることも示唆された。

(3)雌雄前核打ち分けシステムの応用

雄性ゲノムでメチル化されるインプリント遺伝子 H19 のインプリント制御領域 (ICR) を、SssI でメチル化したりしなかったりした後、雌雄前核に注入しメチル化状態の変化を解析した。非メチル化状態で注入した ICR は、胚盤胞期では CpG が非メチル化状態のままであったが、マウス成体においてはメチル化率が上昇し、雄性前核注入したマウスの方が雌性前核注入したマウスより高メチル化状態だった。また、メチル化状態で ICR を注入した時には、胚盤胞期で半分程度が脱メチル化されたが、マウス成体では非メチル化 ICR の場合と同様にメチル化率が上昇した。さらに雄性前核に注入したマウスの方がメチル化状態が高い傾向にあった。一方、ICR の下流に繋いだ GFP 配列のメチル化状態を同様に解析したところ、雌雄どちらの前核に注入した場合でも違いは見られず高メチル化状態だった。

以上より、受精後に雌雄ゲノムにそれぞれ取り込まれた外来性 H19ICR において、内在

性 ICR と同様に、雌雄ゲノム特異的なメチル化状態が一部再現されることが明らかとなった。このことは、生殖細胞だけでなく受精後にも、エピジェネティック修飾を介してインプリント遺伝子の雌雄ゲノム特異的なメチル化を制御する機構が存在することを示唆している。

本システムを利用することで、インプリント遺伝子の受精後におけるメチル化制御配列や因子の解明も可能になると考えている。また本研究の成果は、インプリンティングの確立や維持機構の解明につながるだけでなく、哺乳類の有性生殖の成り立ちに新たな知見を与えるものと考えられる。

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 1 件)

- ① Soma, A., Sato, K., Nakanishi, T. Visualization of inactive X chromosome in preimplantation embryos utilizing MacroH2A-EGFP transgenic mouse. *Genesis* Vol. 51, pp. 259-267 (2013)

DOI: 10.1002/dvg.22369 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

- ①中西友子、マウス初期胚における脱メチル化能の解析、特定領域研究生殖サイクル若手勉強会 2009、2009 年 8 月、静岡
- ②前田康彰、マウス受精卵における雌雄前核での脱メチル化機構の解析、特定領域生殖サイクル若手勉強会 2010、2010 年 7 月、茨城
- ③前田康彰、メチル化 DNA を注入したマウス受精卵の雌雄前核における DNA 脱メチル化活性の評価、第 57 回日本実験動物学会総会、2010 年 5 月、京都
- ④前田康彰、メチル化 DNA の注入によるマウス受精卵の雌雄前核における DNA 脱メチル化活性の解析、第 4 回日本エピジェネティクス研究会、2010 年 5 月、鳥取
- ⑤前田康彰、メチル化 DNA を利用したマウス受精卵の雌雄前核内における DNA 脱メチル化制御機構の解析、第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月、兵庫

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/molebio/5984.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 友子 (NAKANISHI TOMOKO)
鳥取大学・医学部・助教
研究者番号：10344863

(2) 協力研究者

相馬 淳美 (SOMA ATSUMI)
鳥取大学・医学系研究科・博士後期課程

(3) 協力研究者

大字 亜沙美 (OJI ASAMI)
鳥取大学・医学系研究科・博士前期課程