

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658246

研究課題名(和文)ニワトリ生殖系列幹細胞で発現する遺伝子のエピジェネティック解析

研究課題名(英文) Epigenetic analysis of the germ cell-specific genes in chicken germ-line specific cells

研究代表者

服部 真彰 (Hattori, Masa-aki)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60175536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞で特異的に発現する遺伝子(Ddx4, Dnd1, Dazl)は生殖細胞の増殖・生存に必須である。これら遺伝子の発現とプロモーター領域のメチル化との関係を精子で解析した。精子では、未分化細胞マーカー遺伝子も含めてこれらの遺伝子は発現しない。しかし、プロモーター領域のメチル化レベルは肝臓の遺伝子に比べると精子で極めて低いことが認められた。肝臓で発現するAlb遺伝子は低メチル化であるが、精子では高メチル化であった。このように、生殖細胞の増殖・生存に関係する遺伝子のメチル化は低く、関係しない遺伝子は高メチル化であるという知見から、生殖細胞の遺伝子は選択的にメチル化されていることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Germ cell-specific genes such as Ddx4, Dnd1, and Dazl play critical roles in the proliferation and survival of germ cells. The methylation levels of these genes and the pluripotency marker gene in chicken sperm were investigated in relation to gene expression. The putative promoters of these genes showed very low methylation levels in sperm, but they were highly methylated in the liver. Conversely, the Alb gene promoter was highly methylated in sperm. The results that low methylation was in germ cell-specific genes but high methylation in non-specific genes may indicate selective DNA methylation of specific genes in chicken sperm. In addition, these germ cell-specific genes and the pluripotency marker gene may be ready to express any time after fertilization.

研究分野：生殖内分泌学、時間生物学、発生生物学

キーワード：エピジェネティック ニワトリ生殖細胞 精子 生殖細胞マーカー遺伝子 未分化細胞マーカー遺伝子
メチル化遺伝子

1. 研究開始当初の背景

始原生殖細胞 (PGC) は精子や卵子の生殖系列幹細胞である。ニワトリ初期胚では、30 個程度の PGC が胚の中央部に散在する (Aramaki et al. 2007)。その後、PGC が生殖三日月環と呼ばれる胚体外域に移動、血流を介して生殖隆起 (性腺に分化) に到達し、増殖・分化と減数分裂を繰り返して卵子・精子が完成する。ショウジョウバエだけでなく鳥類を含む脊椎動物の生殖細胞には特有の因子が存在する。それが mRNA 結合ドメインを持つタンパク質をコードする遺伝子 (Ddx4, Dnd1, Dazl 他) である (Weidinger et al. 2003)。申請者は、ニワトリ Dnd1 遺伝子などの解析のために cDNA クローニングや抗体作製などを行ってきた (Aramaki et al. 2009, Kito et al. 2010)。その他、PGC からシングルセル・サブトラクションによって神経細胞でも見られる *Nenf* の発現を明らかにした (Nyu et al. 2011)。興味あることに、これらの遺伝子は時期および性によって発現低下の時期が異なる。遺伝子発現を制御する機構として、プロモーター領域に分散する CpG の DNA メチル化が重要な役割を担っている (Jaenisch & Bird 2003)。プロモーター領域に存在する転写因子結合モチーフがメチル化されると、転写因子は DNA に結合できず遺伝子発現は低下する。細胞の分化に伴ってプロモーター領域のメチル化状態はダイナミックに変化する。中でも PGC ではいったん全てのメチル化模様が消去され、新たな模様が書き込まれる (Yamazaki et al. 2003)。しかし DNA メチル化が生殖細胞特有の遺伝子の発現を制御して、配偶子形成プロセスに影響を及ぼすかについては解明すべき多くの問題を残すフロンティアである。

2. 研究の目的

PGC を含む生殖細胞での遺伝子発現とそのプロモーター領域のメチル化の関係を明らかにすることを目的に、生殖細胞の生存に必要であり、配偶子形成に重要な役割を担っている mRNA 結合ドメインを持つタンパク質をコードする遺伝子 (Ddx4, Dnd1, Dazl) および未分化マーカー分子をコードする遺伝子 (*Nanog*) のプロモーター領域の DNA メチル化模様について解析した。DNA メチル化による遺伝子発現の低下と配偶子形成の関係を明らかにすることにより、配偶子形成におけるこれら遺伝子のステージ特異的な重要性を明確にする。比較対照として、肝臓で発現するアルブミン (*Alb*) 遺伝子の発現とメチル化を調べた。

3. 研究の方法

(1) ゲノム DNA サンプルング : PGC (実際は低メチル化状態が考えられているので解析を取りやめた) および成熟ニワトリの精子から精製したゲノム DNA、および比較のために肝臓から精製したゲノム DNA を用いて、対象とする転写開始点上流域 (500bp) のメチル化状態の解析を行った。

(2) DNA の重亜硫酸ナトリウム処理 : 精製・定量した DNA (~500ng) を NaOH で変性、重亜硫酸ナトリウム-ヒドロキノン液と混和して 1 本鎖 DNA として、常法によって DNA を精製、これを MSP 法によってメチル化解析に用いた。

(3) リアルタイム (MSP) 法によるメチル化解析

①プライマー設計 : 生殖細胞特異的に発現する遺伝子 (Ddx4, Dnd1, Dazl)、未分化細胞で発現する遺伝子 (*Nanog*)、および肝臓細胞でも発現する遺伝子 (*Alb*) について、転写開始点より 5' 上流 500 塩基をカバーするプライマーを各遺伝子について数セットを設計した。
②塩基配列の決定 : メチル化 DNA の定量的結果を受けて、RT-PCR で増幅した DNA をクローニングして、キャピラリー型の DNA シークエンサーで塩基配列を決定した。
③データ解析 : 一般に公開されているソフトウェア (http://guma.cdb.riken.jp/top/guma_main_j.html) を用いて、CpG メチル化状態の判定を行った。

4. 研究成果

(1) ニワトリ遺伝子の第 1 エクソン上流域のプロモーターモチーフの検索 : 対象とするニワトリ遺伝子ではプロモーターを同定した報告はないので、上流域で TATA box, GC box, CAAT box をマウスゲノムデータベースと比較しながら検索した。第 1 エクソン上流域に絞ると、図 1 に示すように CpG が集中する領域 (CpG island) を持つ遺伝子 (Dnd1, Dazl) に対して、Ddx4, *Nanog*, *Alb* 遺伝子はこの領域は存在しなかった。しかし、いずれの遺伝子にも TATA box, GC box, CAAT box が存在していることから、第 1 エクソンの上流 500bp がプロモーターとして機能することが推察された。

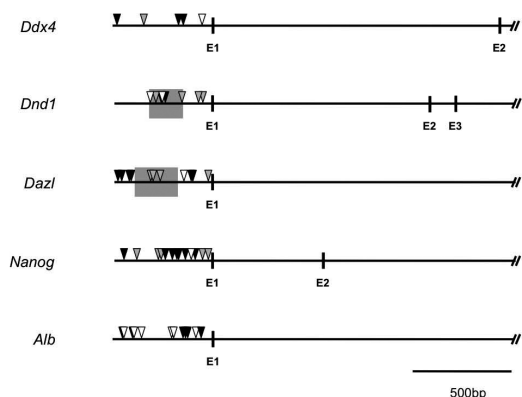


図 1. ニワトリの各遺伝子の推定されるプロモーターとその下流域の 2000bp の構造。記号は、TATA および TATA-like motif, GC および GC-like motif, CAAT および CAAT-like motif を示す。CpG island を shadow で示す。

(2) プロモーターと推定される領域のメチル化状態：解析したニワトリ遺伝子はプロモーターと推定される領域には、すべて CpG は存在するが、遺伝子によってその数は大きく異なり、Dnd1, Dazl, Nanog はたくさんの CpG 数が多く認められた。ニワトリの精子と肝臓からゲノム DNA を精製して、これらの CpG のメチル化を重亜硫酸ナトリウム法で分析した。

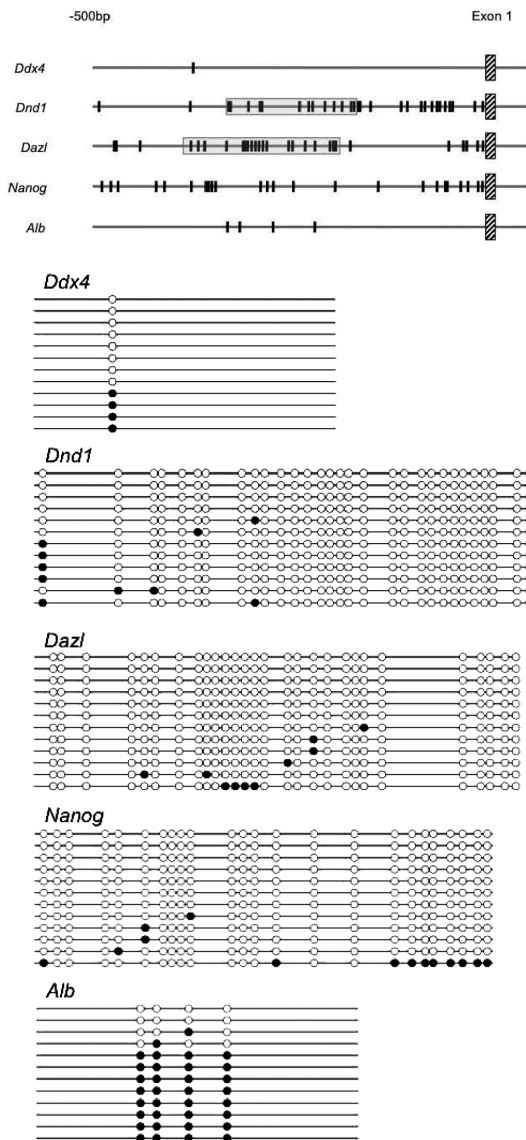


図2. ニワトリ精子の各遺伝子の第1エクソンの上流500bpを含む推定されるプロモーター領域のメチル化レベル。(上図)各遺伝子のCpGの位置(縦線)とCpG island (shadow)で示す。(下図)各遺伝子のメチル化されたCpGの位置(●)とメチル化されていないCpG(O)を示す。各遺伝子について12クローンの塩基配列を調べた。

ニワトリの精子では、図2に示すようにDnd1, Dazl, Nanogはほとんどメチル化されておらず、Ddx4遺伝子も低メチル化状態を示した。一方、精子では発現していないAlb

遺伝子は4カ所のCpGが高メチル化状態であった。比較対照に用いた肝臓ゲノムDNAでは、Albを除くすべての遺伝子は高メチル化状態を示した(図3)。肝臓で発現するAlb遺伝子は精子に比べると、低メチル化状態であった。しかし、精子で特異的に発現する遺伝子は高メチル化レベルを示した。

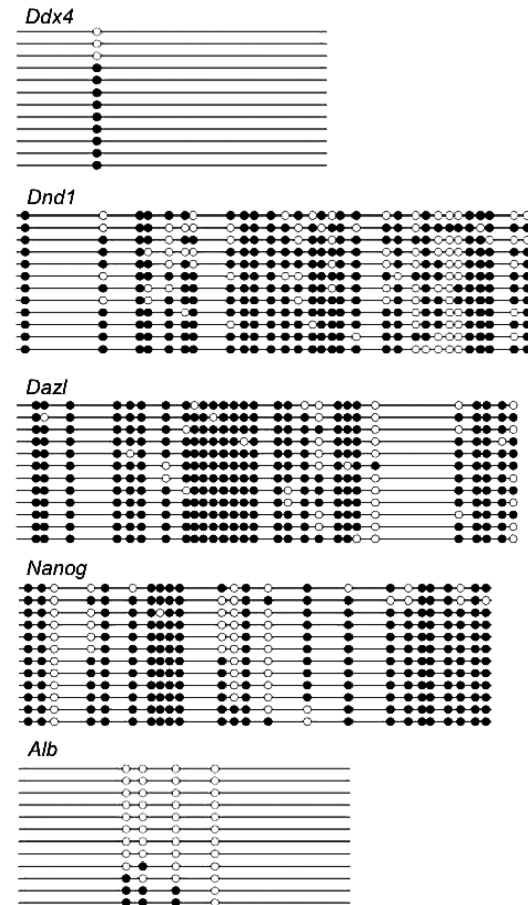


図3. ニワトリ肝臓の各遺伝子の第1エクソンの上流500bpを含む推定されるプロモーター領域のメチル化レベル。各遺伝子のメチル化されたCpGの位置(●)とメチル化されていないCpG(O)を示す。

(3) 遺伝子発現とメチル化酵素：精子と肝臓のゲノムDNAのメチル化レベルの結果を裏付けるために、対象とした遺伝子とメチル化酵素遺伝子(Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b)の発現をRT-PCRにより解析した。精子では内部標準のGapdh以外の遺伝子発現は認められず、肝臓ではAlbとGapdhの遺伝子のみが発現することが明らかになった。また、メチル化酵素遺伝子ではDnmt1とDnmt3aが肝臓でのみ発現することが認められた(図4)。

以上を総合すると、低メチル化レベルとされるPGCおよび生殖細胞が最終分化した精子では、生殖細胞の生存に必須の遺伝子(Ddx4, Dnd1, Dazl)および未分化細胞で発現する(Nanog)のプロモーター領域と推定される領域のメチル化レベルが低いことが明らかになった。一方、これらの遺伝子が発

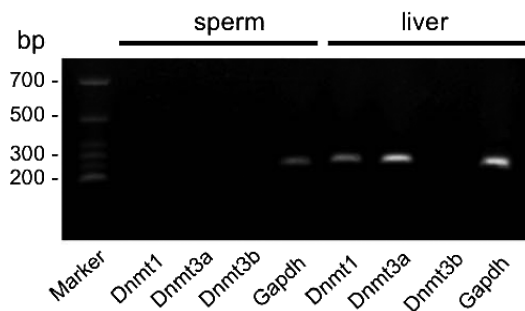


図4. 精子と肝臓におけるメチル化酵素遺伝子の発現

現していない肝臓では、逆に高メチル化レベルであった。精子では遺伝子発現が認められない *Ddx4*, *Dnd1*, *Dazl*, *Nanog* のメチル化が低レベルであるにも関わらず、遺伝子が発現しないことは少なくともエピジェネティクによるものでないことが示唆された。低メチル化環境であるにも関わらず、本来精子で発現しない遺伝子が選択的に高メチル化状態であることは想定外の結果であり、生殖細胞では本来体細胞でのみ発現する遺伝子が高度にメチル化されていることが考えられる。

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)

KITO G, TANAKA H, SOH T, YAMAUCHI N, HATTORI M-A: The putative promoters of germ cell-specific genes and *Nanog* are hypomethylated in chicken sperm. *Journal of Reproduction and Development* 60: 224-229 (2014)

[学会発表] (計 8 件)

①KITO G, TANAKA H, SOH T, YAMAUCHI N, HATTORI M-A: Differential regulation of germ cell specific gene expression between germ cells and somatic cells. The 9th International Joint Symposium between Korea and Japan. Chun Cheon, Korea (2012)

②木藤学志, 田中宏明, 宗知紀, 山内伸彦, 服部眞彰: ニワトリ生殖細胞の分化に伴う転写開始点上流域のメチル化の変化. 日本繁殖生物学会, 筑波大学 (2012)

③田中宏明, 木藤学志, 宮川愛美, 宗知紀, 山内伸彦, 服部眞彰: ニワトリ分泌性神経増殖因子 cNENF による生殖系列幹細胞の増殖. 日本繁殖生物学会, 筑波大学 (2012)

④木藤学志, 田中宏明, 宗知紀, 山内伸彦, 服部眞彰: ニワトリ生殖細胞特異的遺伝子におけるプロモーター領域のメチル化と遺伝子発現との関連性, 東京農工大学 (2013)

⑤田中宏明, 木藤学志, 宮川愛美, Thein Zaw, 宗知紀, 山内伸彦, 服部眞彰: ニワトリ分泌性神経増殖因子 Neudesin によって誘導される生殖系列幹細胞の増殖とその特質. 日本繁殖生物学会, 東京農工大学 (2013)

⑥宮川愛美, 木藤学志, 田中宏明, Thein Zaw, 宗知紀, 山内伸彦, 服部眞彰: 分泌性神経増殖因子 Neudesin がニワトリ胚性腺の生殖細胞に及ぼす増殖効果, 東京農工大学 (2013)

⑦Thein Zaw, Kito G, Tanaka H, Miyagawa M, Soh T, Yamauchi N, Hattori M-A: Effect of neuron derived neurotrophic factor (neudesin) on the proliferation of chicken PGCs and their characterization. 日本畜産学会, 筑波大学 (2014)

⑧宮川愛美, Thein Zaw, 田中宏明, 宗知紀, 山内伸彦, 服部眞彰: ニワトリ分泌性神経増殖因子 Neudesin によって誘導される生殖細胞の増殖とその特質. 日本繁殖生物学会, 帯広畜産大学 (2014)

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

服部 眞彰 (HATTORI, Masa-aki)

研究者番号 : 60175536