

平成 30 年 5 月 8 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450449

研究課題名(和文) DNAメチル基転移酵素アクセス可能領域の探査 ～インプリント機構解明に向けて～

研究課題名(英文) Exploration of DNA methyltransferase accessible region towards elucidation of the mechanisms for genomic imprinting

研究代表者

尾畑 やよい (Yayoi, Obata)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：70312907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：インプリンティングをはじめとするDNAメチル化機構の詳細は明らかにされておらず、いつ、どのようにして特定のDNA配列がメチル化修飾を受けるのかは不明である。本研究では、インプリンティング機構解明の一途として、生殖細胞でのみ共発現しインプリント確立に不可欠なDNAメチル基転移酵素DNMT3A2とその補酵素DNMT3Lを恒常的に高発現するトランスジェニックマウスを作製し、DNMT3A2およびDNMT3Lがアクセスしやすい領域を特定することを目的とした。トランスジェニックマウスを解析した結果、出生後、少なくとも5領域が有意に高メチル化され、ここにインプリント領域は含まれないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms of DNA methylation including genomic imprinting have not been clarified. It remains unknown how and when DNA methylation is catalyzed at specific DNA sequences. DNA methyltransferases DNMT3A2 and its co-factor DNMT3L are essential for genomic imprinting during gametogenesis and co-expression of them is observed only in germ cells. In this study, to obtain better understand the imprinting machinery, transgenic mice in which DNMT3A2 and DNMT3L are consistently expressed were produced. DNA methylation analysis showed that abnormal DNA methylation occurred at least in five regions but not at imprinted regions. In conclusion, DNA methyltransferase accessible regions differ between germ cell and somatic cell lineages and unmethylated alleles of imprinted regions are protected against de novo methylation activity during ontogeny.

研究分野：発生工学

キーワード：DNAメチル化 胚発生 ゲノムインプリンティング DNAメチル基転移酵素

## 1. 研究開始当初の背景

ほ乳類の生殖細胞形成過程では、精子あるいは卵子特異的に DNA メチル化修飾が生じ (ゲノミックインプリンティング) 受精後の胚発生過程で父母アレル特異的な遺伝子発現をもたらすようになる。この DNA メチル化を欠如すると胚発生が停止することから、ゲノミックインプリンティングは、ほ乳類の生殖細胞が獲得すべき必須の機構といえる。また、DNA メチル化は、胚発生過程では、インプリント領域に限らずゲノムの広範にわたって大きく変化し、遺伝子発現を制御することで細胞に多様な機能を持たせている。しかし、DNA メチル化修飾がいつどのようにして特定の DNA 配列標的とするのかは不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、ゲノムインプリンティング機構解明の一途として、生殖細胞形成過程のみ共発現しインプリント確立に不可欠な DNA メチル基転移酵素 DNMT3A2 とその補酵素 DNMT3L を胚発生過程で恒常的に高発現するトランスジェニックマウスを作製し、DNMT3A2 および DNMT3L がアクセスしやすい領域を特定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

マウス DNMT3A2、DNMT3L、および mCherry を 2A 配列で連結しこれらが CAG プロモーターで恒常的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニックマウスの表現型解析として、体重、各臓器の重量を測定した。また、心臓における遺伝子発現はマイクロアレイ (GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array; Affymetrix 社) を用いて網羅的に解析し、発現変動が生じた遺伝子のプロモーター領域を DNA メチル化解析のための候補領域として選定した。トランスジェニックマウスにおける DNA メチル化解析は、sodium bisulfite シークエンス法を用いて実施し、アレル特異的な DNA メチル化解析を実施する差異には、JF1 マウス (*Mus. musculus molossinus*; 理研 BRC より分与) とトランスジェニックマウスの交配で得られた胚を用いた。

## 4. 研究成果

### 1) トランスジェニックマウスの表現型解析

Vasa-cre 雌マウスと DNMT3A2 および DNMT3L 発現カセットが挿入された flox 雄マウスを交配すると、卵細胞質中に蓄積した母性 Cre により組換えが起こり、mCherry レポータータンパクを発現するトランスジェニックマウスが誕生した。これらのマウスでは DNMT3A2 および DNMT3L の恒常的発現も同時に誘導されていることが推察された。トランスジェニックマウスは野生型マウスと同様の比率で誕生し (1:1) これは理論値

であった。また、出生時に表現型や体重に異常は認められなかった。そこでウエスタンブロットにより DNMT3A2 および DNMT3L の発現解析を実施した結果、トランスジェニックマウスにおいては、いずれの臓器においても DNMT3A2 と DNMT3L の高発現が認められたが、野生型マウスにおいてはこれらの共発現は認められなかった。そのため、DNMT3A2 および DNMT3L の異所的発現は、胚発生に影響しないことが明らかとなった。

一方、トランスジェニックマウスは出生後に顕著な発育遅延を呈し、6 週目以降、致死となる個体が出現し 20 週目までに全ての個体が致となった。また、同腹仔の野生型マウスよりトランスジェニックマウスでは体重が小さいにもかかわらず、心臓の重量は大きくなり、体重に対する心臓重量の比率はトランスジェニックマウスで有意に大きくなった。これらの表現型は独立した 2 ラインのトランスジェニックマウスではほぼ同様であった。DNMT3A2 および DNMT3L の異所性発現は出生後の個体の生存に影響することが明らかとなった。

### 2) トランスジェニックマウスにおける網羅的遺伝子発現解析

トランスジェニックマウス (n=3) および同腹仔の野生型マウス (n=3) の心臓から RNA を抽出し、両者の遺伝子発現プロファイルを網羅的に比較した。その結果、トランスジェニックマウス 3 検体全てにおいて 5 倍以上、野生型マウスより遺伝子発現が抑制されている 15 遺伝子を抽出した。これらの中にインプリント遺伝子は含まれなかった。また恒常的に発現するハウスキーピング遺伝子も含まれなかった。

### 3) トランスジェニックマウスにおける DNA メチル化解析

発現抑制が認められた 15 遺伝子のうちの 5 遺伝子、ハウスキーピング遺伝子、および 7 つのインプリント遺伝子の CpG アイランドあるいは発現制御領域の DNA メチル化解析を行った。トランスジェニック胚 (12.5 日齢胎仔; n=3) においてはいずれの遺伝子においても DNA メチル化状態に異常は認められず、野生型胚 (12.5 日齢胎仔; n=3) と同レベルであった。また、DNA 多型解析の結果、インプリント遺伝子の父母アレル特異的な DNA メチル化は維持されていることが確かめられた。これらの結果は、DNMT3A2 および DNMT3L の異所性発現が胎仔期の表現型に影響しない結果とも矛盾しなかった。

次に、出生後の 4 週齢のトランスジェニックマウス (n=6) および同腹仔の野生型マウス (n=3) の心臓における DNA メチル化解析を行った結果、発現抑制を呈した 5 遺伝子はトランスジェニックマウスにおいて有意に高メチル化されていることが明らかとなった。一方、ハウスキーピング遺伝子やイン

プリント遺伝子の DNA メチル化レベルはトランスジェニックマウスと野生型マウスで差が認められなかった。上述した 5 遺伝子の異常な DNA メチル化がいつ生じるのか、このうち 2 遺伝子に着目し、さらに詳細に解析することとした。その結果、9.5 日齢胎仔、12.5 日齢胎仔では、野生型胚同様、トランスジェニック胚でも低メチル化状態を呈したが、出生直後の新生仔の心臓では、野生型マウスよりわずかに、しかし有意にトランスジェニックマウスでメチル化上昇が認められ、DNMT3A2 および DNMT3L の異所性発現による異常な DNA メチル化は出生前後に生じていることがわかった。同様のメチル化異常は、トランスジェニックマウスの脳の DNA でも確認された。これらの結果から、生殖細胞形成過程と個体発生過程では、DNMT3A2 および DNMT3L がアクセス可能な領域が異なっていることが明らかとなり、インプリント領域の非メチル化アレルは、体細胞においても、DNMT3A2 および DNMT3L がアクセスできない構造を保持し続けている可能性が示唆された。

最後に、トランスジェニックマウスで異常な DNA メチル化が生じた理由を考察するために、5 メチルシトシンをヒドキシ化し、いくつかの反応を経て脱メチル化に働く TET ファミリーの発現解析を実施した。その結果、TET1 および TET2 は出生間際まで高発現しているものの、出生後、その発現が 1/5 程度まで有意に抑制されることがわかった。TET3 は着床前の初期発生過程でのみ発現が認められた。

本研究では、体細胞分裂期において DNA メチル基転移酵素がアクセス可能な領域を同定するに至ったが、今後は、こうした領域のクロマチン構造の解析が必要と考えられた。また、胚発生過程で生じる DNA メチル化および DNA 脱メチル化は、これらを触媒する酵素の拮抗によっても変化しうる可能性が示唆された。

## 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 9 件)

<sup>1</sup> Morohaku K, Hirao Y, and Obata Y\*: Development of fertile mouse oocytes from mitotic germ cells in vitro. *Nat Protoc*, 12, 1817-1829 (2017) 査読有

doi: 10.1038/nprot.2017.069.

<sup>2</sup> Hayashi K, Hikabe O, Obata Y, and Hirao Y: Reconstitution of mouse oogenesis in a dish from pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 12, 1733-1744 (2017) 査読有

doi: 10.1038/nprot.2017.070.

<sup>3</sup> Morohaku K, Hirao Y, and Obata Y\*: Differentiation of Mouse Primordial Germ Cells into Functional Oocytes In Vitro. *Ann Biomed*

*Eng*, 45, 1608-1619 (2017) 査読有

doi: 10.1007/s10439-017-1815-7.

<sup>4</sup> Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G, Obata Y, Hirao Y, Hamada N, Shimamoto S, Imamura T, Nakashima K, Saitou M, and Hayashi K: Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature*, 539, 299-303 (2016) 査読有

doi: 10.1038/nature20104.

<sup>5</sup> Morohaku K, Tanimoto R, Sasaki K, Kawahara-Miki R, Kono T, Hayashi K, Hirao Y\*, and Obata Y\*: Complete in vitro generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113, 9021-9026 (2016) 査読有

doi: 10.1073/pnas.1603817113.

<sup>6</sup> Morohaku K, Hirao Y, and Obata Y\*: Developmental competence of oocytes grown in vitro: Has it peaked already? *J Reprod Dev*, 62, 1-5 (2016) 査読有

doi: 10.1262/jrd.2015-148.

<sup>7</sup> Obata Y\*: Epigenetic modification in mouse oocytes. *J Mamm Ova Res*, 31, 62-69 (2014) 査読有

doi: org/10.1274/jmor.31.62.

<sup>8</sup> Hara S, Takano T, Ogata M, Yamakami R, Sato Y, Kono T, and Obata Y\*: Establishment of a conditional transgenic system using the 2A peptide in the female mouse germline. *J Reprod Dev*, 60, 250-255 (2014) 査読有

doi: org/10.1262/jrd.2013-143.

<sup>9</sup> Hara S, Takano T, Fujikawa T, Yamada M, Wakai T, Kono T, and Obata Y\*: Forced expression of DNA methyltransferases during oocyte growth accelerates the establishment of methylation imprints but not functional genomic imprinting. *Hum Mol Genet*, 23, 3853-3864 (2014) 査読有

doi: 10.1093/hmg/ddu100.

〔学会発表〕(計 21 件)

<sup>1</sup> 府川夏実、佐々木恵亮、尾畑やよい: CRISPR/Cas9 システムによる新規 KRAB-ZFP 遺伝子機能欠損マウスの作製とその表現型解析。第 13 回日本生殖発生医学会 (2018)

<sup>2</sup> Sasaki K, Nakajima A, Morohaku K, Hara S, Asanuma Y, Sotomaru Y, Kono T, and Obata Y: Parental origin-derived primary memories are erased in Zfp57-deficient embryonic stem cells. 4th World Congress of Reproductive Biology (2017)

<sup>3</sup> 尾畑やよい、平尾雄二: マウス始原生殖細胞から卵子を産生する新規 in vitro 系の開発。第 39 回日本分子生物学会年会ワークショップ・招待講演 (2016)

<sup>4</sup> 隈本宗一郎、雉岡めぐみ、高橋望、外丸祐介、小川英彦、尾畑やよい、河野友宏: Dlk1-Dio3 ドメイン BAC TG マウスの致死性に対する miRNA の影響。第 39 回日本分子生物学会年会 (2016)

5 Hirao Y and Obata Y: Complete in vitro generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells. 2016 ART World Congress (2016)

6 隈本宗一郎、雉岡めぐみ、高橋望、外丸祐介、小川英彦、尾畑やよい、河野友宏: Dlk1-Dio3 ドメイン BAC TG マウスにおける網羅的 miRNA 発現解析. 第 109 回日本繁殖生物学会 (2016)

7 諸白家奈子、谷本連、佐々木恵亮、林克彦、平尾雄二、尾畑やよい: マウス胎仔卵巣のガラス化保存と体外培養による始原生殖細胞の高度利用技術の開発. 第 109 回日本繁殖生物学会 (2016)

8 有富大輝、武田久美子、尾畑やよい、平尾雄二: マウス始原生殖細胞を成熟卵子へと誘導する新規培養系の開発. 第 109 回日本繁殖生物学会 (2016)

9 谷本連、諸白家奈子、河野友宏、平尾雄二、尾畑やよい: ステロイドホルモン受容体の制御が in vitro におけるマウス卵形成に果たす役割. 第 109 回日本繁殖生物学会 (2016)

10 日下部央里絵、浜崎伸彦、永松剛、尾畑やよい、平尾雄二、濱田律雄、島本走、今村拓也、中島欽一、斎藤通紀、林克彦: 多能性幹細胞から卵母細胞を作出する体外培養技術の開発. 第 109 回日本繁殖生物学会 (2016)

11 Tanimoto R, Morohaku K, Sasaki K, Kawahara-Miki R, Kono T, Hayashi K, Hirao Y, and Obata Y: Abnormal Follicle Assembly In Vitro Correlates with Ectopic Expression of Amh in Mice. 49th Annual Meeting of The Society for the Study of Reproduction (2016)

12 谷本連、諸白家奈子、河野友宏、平尾雄二、尾畑やよい: in vitro で分化したマウス胎仔卵巣における網羅的遺伝子発現解析. 第 108 回日本繁殖生物学会 (2015)

13 尾畑やよい、平尾雄二: in vitro において産生されたマウス卵の発生能. 第 108 回日本繁殖生物学会シンポジウム・招待講演 (2015)

14 佐々木恵亮、原聡史、山上怜奈、竹内秀斗、長谷川 沙紀、小肩実央、河野友宏、尾畑やよい: 胚発生過程において DNA メチル化酵素がアクセス可能な遺伝子座のスクリーニング. 第 108 回日本繁殖生物学会 (2015)

15 尾畑やよい、平尾雄二: in vitro における機能的卵母細胞の作出. 第 36 回日本炎症・再生医学会シンポジウム・招待講演 (2015)

16 Morohaku K, Kono T, Hirao Y, and Obata Y: In vitro growth of primordial follicles derived from neonatal mouse ovaries. Gordon Research Conference 2015, Fertilization & Activation of Development (2015)

17 Sasaki K, Hara S, Yamakami R, Takeuchi S, Hasegawa S, Ogata M, Kono T, and Obata Y:

Ectopic expression of DNMT3A2 and DNMT3L during embryogenesis leads to abnormal methylations at certain gene promoters but not at the imprinted loci. Gordon Research Conference 2015, Fertilization & Activation of Development (2015)

18 尾畑やよい: in vitro における卵母細胞の成長・成熟. 第 60 回日本生殖医学会シンポジウム・招待講演 (2015)

19 尾畑やよい: DNA メチル化による卵子特異的インプリントの確立機構. 第 59 回日本生殖医学会シンポジウム・招待講演 (2014)

20 諸白家奈子、平尾雄二、河野友宏、尾畑やよい: 新生仔マウス由来卵胞から体外培養で得られた卵の発生能解析. 第 107 回日本繁殖生物学会 (2014)

21 尾畑やよい、原聡史、河野友宏: DNA メチル基転移酵素過剰発現により卵母細胞で早期に誘導されたメチル化インプリントの機能. 第 55 回日本卵子学会 (2014)

〔図書〕(計 1 件)

1 『哺乳動物の発生工学』 佐藤英明、河野友宏、内藤邦彦、小倉淳郎編 総ページ数 200 朝倉書店: 「発生学とエピジェネティクス」 尾畑やよい pp 13-26 (2014)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 始原生殖細胞を機能的に成熟した卵母細胞へと分化させる培養方法

発明者: 尾畑やよい、平尾雄二、林克彦

権利者: 東京農業大学、農研機構、九州大学  
種類: PCT

番号: PCT/JP2016/077574

出願年月日: 2016 年 9 月 16 日

国内外の別: 国外

〔その他〕

アウトリーチ活動

1 出張講義「卵子と精子のはなし」 尾畑やよい 2016 年 12 月 19 日 東京都立小石川中等教育学校 (SSH 指定校、東京)

2 出張講義「卵子と精子のはなし」 尾畑やよい 2014 年 11 月 7 日 埼玉県立和光国際高等学校 (埼玉)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾畑 やよい (OBATA, Yayoi)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号: 70312907