

学 位 論 文 題 名

Dynamic changes of DNA methylation in three murine endogenous imprinted genes during early embryogenesis and gametogenesis : Studies in undifferentiated ES, EG and EC cells as model systems

（マウス初期胚発生および配偶子形成過程におけるインプリント遺伝子のDNAのメチル化の変化：未分化ES、EGおよびEC細胞を用いたモデル系の研究）

学位論文内容の要旨

遺伝学の基礎であるメンデルの法則の例外的遺伝子の発現様式として、ゲノムインプリンティングが注目されている。父方と母方由来の遺伝子が等価に機能することがメンデルの法則の前提であるが、インプリント遺伝子は組織特異的に父方または母方由来の遺伝子の発現が抑制されている。哺乳類では単為発生により個体を生じた例は知られていない。この原因を明らかにするために実験的に作成した、雄核発生胚や雌核発生胚はそれぞれ特有の異常を示して、着床後間もなく失われる。これに反し、父母両ゲノムを持つ胚は正常に発生しうるので、父ゲノムと母ゲノムの間には機能上差があり、両者が共存してはじめて正常胚発生が可能になると結論された。両者の差は限られた数の遺伝子が受けるインプリンティングの違いの総和であると信じられている。哺乳類に特有の発現制御機構として注目されているインプリンティングには、DNAのメチル化、クロマチン構造、DNA複製タイミングが関与すると考えられているが、未だにその詳細は不明である。この機構を明らかにするためには、生殖細胞形成や初期胚発生での性に依存したインプリントの消去と樹立の過程および樹立後の遺伝子の発現制御の両面からの解析が重要と考えられる。

マウスES細胞は胚盤胞（3.5日齢胚）の内部細胞塊(ICM)細胞に由来し、無限増殖能と多分化能を兼ね備えた正2倍性の細胞である。雄核発生ES細胞や単為発生ES細胞と正常胚とのキメラ胚は雄核発生ICM細胞や単為発生ICM細胞と正常胚とのキメラ胚と似た形態異常を示すことから、ES細胞は起源細胞のインプリンティングの少なくとも一部を保持していると考えられている。この結果をふまえ、本論文では未分化胚(ES; Embryonic Stem, EG; Embryonic Germ, EC; Embryonic Carcinoma)細胞を材料に用い、現在まで同定されている約20個のインプリント遺伝子の中で最も解析が進んでいる*H19*, *Igf2*, *Igf2r*のDNAのメチル化を指標に、マウスの生殖細胞および初期胚におけるインプリントの消去と樹立過程の解明およびインプリントとDNA複製タイミングとの関連の解析を目的に3つの実験を行った。

第一章では、生殖細胞形成過程におけるインプリントの消去と樹立を探る目的で、マウス12.5日齢胚の生殖隆起中の始原生殖細胞から樹立した雌雄EG細胞でのDNAメチル化の状態をサザンハイブリダイゼーションを用いてES細胞と比較するとともに、*in vitro*における分化能とX染色体の不活性化を観察した。*H19*, *Igf2*, *Igf2r*遺伝子のDNAメチル化の状態はEG細胞とES細胞で異なっていた。また、雌雄EG細胞間でも差が認められた。そこで、培養条件下でESやEG細胞の分化を誘導してみたところ、雌EG細胞は雌ES細胞や雄EG細胞と比較し分化しにくい傾向が見られた。同時に、分化誘導開始後7日目に雌EG, ES細胞でX染色

体の不活性化を複製タイミングを指標に観察したところ、EG細胞では後期複製X染色体（不活性化X染色体）を持つ細胞の頻度がES細胞と比較し有意に少なかった。また、単為発生ES細胞や雌EG細胞では胚様体としての分化が雌ES細胞のそれと比較し遅れていた。これらの観察から、インプリンティングの状態がEG細胞とES細胞では異なっていると推定した。減数分裂以前に入る前から既に、生殖隆起中の始原生殖細胞ではインプリントの消去と書き換えが始まっているのであろう。

DNAのメチル化のインプリンティングへの関与が示唆されているが、性に依存したDNAのメチル化を新たにゲノムに授けるためには、親から受け継いだDNAメチル化を消去する必要がある。事実、脱メチル化現象が生殖細胞や初期胚で知られており、インプリンティングの樹立に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、研究を進める上で、生殖細胞や初期胚を十分量確保するのは困難である。X染色体の不活性化の維持にはDNAのメチル化が重要であるが、EC細胞とリンパ球の融合細胞ではリンパ球由来の不活性X染色体が活性化することが知られている。この事実は、細胞融合によりインプリント遺伝子のDNAのメチル化にも変化が起きる可能性を示唆している。そこで、第二章では、脱メチル化の性質を調べる目的で、EC細胞とリンパ球の細胞融合をモデル系に用い、第一章同様、*H19*、*Igf2*、*Igf2r*の3個のインプリント遺伝子のDNAのメチル化の変化を調べた。本実験で用いたマウスEC細胞株(PSA1、OTF9-63、LT-1、P19、B242g)とマウスリンパ球との融合細胞は全てEC細胞様の表現型を示し、両細胞に由来するほとんど全ての染色体を保持していた。DNAのメチル化の状態を親細胞と融合細胞間で比較したところ、PSA1とOTF9-63細胞との融合細胞ではリンパ球由来のインプリント遺伝子のメチル化DNAが脱メチル化していた。また、LT-1細胞との融合細胞では、両親細胞のインプリント遺伝子のアレルで脱メチル化が観察された。一方、P19やB242g細胞との融合細胞ではインプリント遺伝子のDNAのメチル化に変化は見られず、これらの融合細胞では不活性X染色体の再活性化能の欠如と脱メチル化能の欠如との間に相関が見られた。ここで調べた*Igf2*や*Igf2r*遺伝子のDNAのメチル化部位は初期発生胚での脱メチル化に抵抗性があり、初期インプリントではないかと考えられている。しかし、融合細胞では他の部位同様、これらの部位も脱メチル化されていた。初期インプリントと考えられているDNAメチル化部位は生体では脱メチル化から保護されているのであろう。発生段階特異的、塩基配列特異的メチル化DNA結合蛋白質の存在が予想される。

近年、父方由来のインプリント遺伝子を含む領域のDNA複製タイミングが母方由来のそれに先行することが蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)法により示され、DNA複製時期がインプリンティングに関連ありとされている。第三章では、この報告の確認を目的に、FISH法を用い*Igf2*領域のDNA複製タイミングの解析を試みた。ところが、従来の観察に反し、正常ES細胞、雄核発生ES細胞、雌核発生ES細胞、*Igf2*領域がともに母方由来の胚嚢維芽細胞の間期核で、この領域のDNA複製タイミングに差が見いだされなかった。従来の結果の再検討が必要であると思われる。ところが、細胞分裂中期の染色体上に3-4個のFISHシグナルが高頻度で観察された。この結果は、インプリント領域のクロマチン構造を反映していると考えられる。インプリント領域は非インプリント領域に比べてより緩いクロマチン構造をとっているのかも知れない。

この研究により、生殖細胞でのインプリントの消去と樹立および初期胚における広範な脱メチル化の機構の一面が明らかになった。同時に、FISHパターンからインプリント領域のクロマチン構造の特異性が推察された。これらの結果は、生殖細胞や初期胚の発生過程で徐々に樹立されるインプリントの機構として、遺伝子単位でのDNAのメチル化に加え、クロマチン領域としての大きな単位でも修飾が働いている可能性を示唆している。今後、二次的なDNAメチル化の消去が見いだされた12.5日齢の始原生殖細胞由来のEG細胞を生体の発生プログラムに従って分化させることにより、初期インプリントの解明の更なる進展が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 木 信 夫

副 査 教 授 木 村 正 人

副 査 教 授 吉 田 廸 弘

副 査 教 授 高 橋 孝 行 (大学院理学研究科)

学 位 論 文 題 名

Dynamic changes of DNA methylation in three murine endogenous imprinted genes during early embryogenesis and gametogenesis : Studies in undifferentiated ES, EG and EC cells as model systems

(マウス初期胚発生および配偶子形成過程におけるインプリント遺伝子の DNA のメチル化の変化 : 未分化 ES, EG および EC 細胞を用いたモデル系の研究)

哺乳類では単為発生により生じた個体は知られていない。雄核発生胚や雌核発生胚はそれぞれ特有の異常を示して、着床後間もなく失われる。従って、父ゲノムと母ゲノムの間には機能上差があり、両者が共存してはじめて正常胚発生が可能になる。両者の差は限られた数の遺伝子が受けるインプリンティングの違いにあると信じられている。インプリンティングにより対立遺伝子の一方の発現が組織特異的に抑制される。インプリンティングには、DNAのメチル化、クロマチン構造、DNA複製タイミングが関与すると考えられているが、詳細は不明である。その仕組み明らかにするためには、生殖細胞形成や初期胚発生での性に依存したインプリントの消去と樹立の過程および樹立後の遺伝子の発現制御の両面からの解析が重要である。

マウスES細胞は3.5日齢胚の内部細胞塊(ICM)細胞由来で、無限増殖能と多分化能を備えている。雄核発生ES細胞や単為発生ES細胞と正常胚とのキメラ胚は雄核発生ICM細胞や単為発生ICM細胞と正常胚とのキメラ胚と似た形態異常を示すことから、ES細胞は起源細胞のインプリンティングの少なくとも一部を保持していると考えられている。本論文では未分化胚細胞を材料に、解析が進んでいる*H19*, *Igf2*, *Igf2r* のDNAのメチル化を指標に、マウスの生殖細胞および初期胚におけるメチル化インプリントの消去と樹立過程およびインプリントとDNA複製タイミングとの関連を検討した結果を扱っている。

第一章では、12.5日齢マウス胚の始原生殖細胞から樹立した雌雄EG細胞でのDNAメチル化、*in vitro*での分化能とX染色体の不活性化を観察した。*H19*, *Igf2*, *Igf2r*遺伝子のメチル化の状態はEG細胞とES細胞で異なっているばかりでなく、雌雄EG細胞間でも違いが認

められた。培養下では、雌EG細胞は雌ES細胞や雄EG細胞よりも分化しにくい傾向があった。同時に、EG細胞ではX染色体が不活性化する細胞の頻度がES細胞と比較して少なく、単為発生ES細胞や雌EG細胞では胚様体としての分化が雌ES細胞に比べ遅れる。従って、インプリンティングの状態がEG細胞とES細胞では異なっており、生殖隆起中の始原生殖細胞ではインプリントの消去と書き換えが始まっていると考えられた。

新たなメチル化パターンが生じるには、古いものを消去する必要がある。事実、生殖細胞や初期胚では大規模な脱メチル化が起きるが、材料不足のため直接検討するのは難しい。EC細胞とリンパ球の融合細胞ではリンパ球由来ゲノムの脱メチル化が起きる可能が示されている。そこで、第二章では、EC細胞とリンパ球の細胞融合をモデルに、第一章同様、*H19*, *Igf2*, *Igf2r* の3個のインプリント遺伝子のメチル化の変化を調べた。用いたマウスEC細胞株(PSA1、OTF9-63、LT-1、P19、B242g)とマウスリンパ球との融合細胞では染色体の脱落はない。PSA1とOTF9-63、LT-1細胞との融合細胞ではリンパ球由来のインプリント遺伝子のメチル化領域が脱メチル化していた。一方、P19やB242g細胞との融合細胞ではインプリント遺伝子のメチル化に変化は見られなかった。ここで調べた *Igf2* や *Igf2r* 遺伝子のメチル化部位は初期胚での脱メチル化に抵抗性があるので、これらの部位は生体では脱メチル化から保護されている可能性がある。発生段階特異的、塩基配列特異的メチル化DNA結合蛋白質の存在が予想される。

近年、父方由来のインプリント遺伝子を含む領域のDNA複製タイミングが母方由来のそれに先行することがFISH法により示された。第三章では、この報告の確認を目的に、FISH法を用い *Igf2* 領域のDNA複製タイミングの解析を試みた。ところが、従来の観察に反し、正常ES細胞、雄核発生ES細胞、雌核発生ES細胞、*Igf2* 領域がともに母方由来の胚繊維芽細胞の間期核で、この領域のDNA複製タイミングに差が見いだされなかった。従来の結果の再検討が必要である。一方、細胞分裂中期の染色体上に3-4個のFISHシグナルが高頻度で観察された。インプリント領域は非インプリント領域に比べてより緩いクロマチン構造をとっていると推定された。

以上のように本論文は、生殖細胞でのインプリントの消去と樹立および初期胚における広範な脱メチル化の機構の一面を明らかにした。同時に、FISHパターンからインプリント領域のクロマチン構造の特異性も指摘した。これらの結果は、生殖細胞や初期胚の発生過程で徐々に樹立されるインプリントの機構として、遺伝子単位でのDNAのメチル化に加え、クロマチン領域としての大きな単位でも修飾が働いている可能性を示唆しており、これを基に初期インプリントとそれに続く遺伝子発現の抑制機構の解明が進むものと期待される。

審査員一同は、申請者が二人の子供を育てながらこの成果を得たことを高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。