

## 論文の内容の要旨

論文題目 Genome-wide Analysis of DNA Methylation of CpG Islands during Mammalian Development  
(哺乳類の発生期におけるゲノムワイドな CpG アイランドのメチル化解析)

氏名 クレメンスコイ・マキシム

DNA メチレーションは X 染色体の不活性化、インプリンティング、トランスポゾンの不活性化、そして不必要な転写ノイズの抑制に関連することが示されてきた。DNA メチレーションは細胞、組織特異的発現をする遺伝子の制御にも関与しており、T-DMR (組織細胞特異的メチル化領域) のメチル化を伴い遺伝子発現制御を行う。T-DMR は CpG アイランドと呼ばれる CpG 出現頻度の高い領域に見いだされる。CpG アイランドはハウスキーピング遺伝子のように恒常的に発現する遺伝子のみならず、組織・細胞特異的発現をする遺伝子の転写開始点付近に存在し、転写制御に関わる機能を果たす。

分化した細胞、組織はそれぞれ特有の形質を持つが、同様に特有の多数の T-DMR のメチル化状況からなる DNA メチル化プロファイルを持つ。さらに、細胞・組織特異的な DNA メチル化プロファイルの形成が分化に伴って起こっており、正常なメチル化プロファイルの形成が正常な形質発現に関わることが示唆されている。

家畜の繁殖において、優れた形質を持つ動物の産生は重要な課題であり、これを達成するためにクローン動物の作出が試みられて来た。核移植におけるクローン動物の作出において、異常な発生と着床後の胎子の流産は大きな課題である。正常な発生を達成するためには、分化した組織、細胞を特徴づける遺伝子が、連続して正しく発現する必要がある。この過程に正

常な DNA メチル化プロファイルの形成は必須であると考えられ、クローン動物発生過程で異常な DNA メチル化プロファイルの形成が起こっているものと考えられる。

本仮説に基づき、本研究では、家畜の発生に伴う DNA メチル化プロファイルの形成過程を、モデルとしてマウス ES 細胞の分化によって算出されるテラトーマ、さらに成体核移植により作出されたクローンウシの胎仔、胎盤、及び移植供与核の DNA メチル化プロファイルを、ゲノムワイドに調べた。また正常な発生に重要な役割を果たす 2 つの遺伝子の DNA メチル化状況を解析し、家畜の発生、特にクローンウシの発生に果たす DNA メチル化の役割について検討を加えた。

## 第1章

胚性幹細胞 (ES 細胞) から胚様体 (EB) への分化は、哺乳類発生初期に決定される細胞系譜を、*in vitro* で研究する系として有効である。この系を用いることにより、組織細胞特異的メチル化領域 (T-DMR) が 247 箇所の CpG アイランドに存在することが既に示されている。この結果は、哺乳類の発生において CpG アイランドのメチル化パターンの形成が重要なエピジェネティック事象であることを示している。

本章では、ES 細胞、EB、ES 細胞から発生した奇形腫の CpG アイランドのメチル化状態を、制限酵素 *NotI* をランドマークに用いた RLGs (Restriction landmark genomic scanning) 法を用いることにより、ゲノムワイドに解析した。この結果を、正常な胎仔 (10.5 日胚) と成体の組織のゲノム DNA の CpG アイランドのメチル化状況と比較した。これらの結果を基に、奇形腫に特異的にメチル化、非メチル化される新規な T-DMR を含む 259 箇所の T-DMR からなる DNA メチル化パネルを構築した。DNA メチル化パターンは複雑であり、ES 細胞、EB、奇形腫ごとに異なっており、この結果はメチル化及び脱メチル化の新生が分化に伴い起こっていることを証明している。細胞間、組織間で DNA メチル化パターンを比較したところ、奇形腫が ES 細胞からエピジェネティックに最も異なっていることが明らかとなった。本研究により作成した DNA メチル化プロファイルの解析は、ES 細胞、胎仔、EB、奇形腫、そして体細胞組織の発生、分化に関し新たな洞察を提供する。

## 第2章

核移植における動物の作出において、異常な発生と着床後の胎仔の流産は大きな課題である。クローン動物の低生存率の原因の一つは異常な DNA メチル化である。哺乳類ゲノムにおいて、CpG アイランドはハウスキーピング遺伝子の転写開始点に良く存在し、組織特異的な遺伝子に伴って存在する。CpG アイランドの DNA メチル化状態が正しく連続して起こる機構が、細胞・組織・器官の特徴を決める細胞種特異的な遺伝子発現に必須である。

CpG アイランドに存在する T-DMR はマウス、ラット、ヒトゲノムにおいて検討されてきたが、ウシゲノムでの報告は無い。レプチンは母体と胎児胎盤間の相互作用の制御に関わり、胎仔、胎盤の生長に役割を持つ。*POU5F1* はオクタマー結合転写因子4をコードし、動物の発生に関与する。

本章では人工授精と核移植によって作出された妊娠 48 日および 59 日目のウシ胎仔とその胎盤における *Leptin* 遺伝子、*POU5F1* 遺伝子の CpG アイランドの DNA メチル化状態を解析した。DNA メチル化は、クローンの胎仔、胎盤、子宮内膜組織において異なっていることを、バイサルファイトシーケンス法およびパイロシーケンス法によって確認した。ウシの *Leptin* 遺伝子、*POU5F1* 遺伝子に見いだしたこれらの組織特異的 DNA メチル化可変領域において、核移植により作出された胎仔では、人工授精により作出された胎仔に比べ DNA メチル化状態の変化が大きいことを見いだした。

### 第 3 章

CpG アイランドはハウスキーピング遺伝子、および多くの組織特異的遺伝子の転写開始領域にあり、CpG アイランドに起こる DNA のメチル化は、正常な胎仔の発生、細胞分化に重要な機能を果たしている。体細胞の核移植により、多くの哺乳類種において成体を得ることが出来るようになったが、最終段階まで発生する成功率はいまだ数パーセントと低い。高率に観察される妊娠初期の流産、周産期の死には、ドナー核の核移植後に起こる CpG アイランドの異常なエピジェネティック変化が関与しているものと考えられるが、それについて十分な解析の報告が無い。

第 3 章に於て、Restriction Landmark Genome Scanning (RLGS)法を用いて、培養卵丘細胞から得た核移植ドナーの核、およびクローン胎仔の組織のゲノム全域の DNA メチル化プロフィールを初めて調べた。RLGS プロフィールに現れる約 2600 箇所メチル化されていない NotI サイトのうち、35 箇所メチル化の違いが観察された。この解析により、人工授精によって作出された胎仔および核移植で得られた胎仔の胎盤、胎仔組織には、組織特異的な DNA メチル化を受ける CpG アイランドがあることが明らかとなった、さらにクローン動物の脳、胎盤で、DNA メチル化の異常と思われる複数の部位を見いだした。

### 総括

正常に組織が分化発生するためには、ゲノムワイドに存在する T-DMR の DNA メチル化プロフィールの形成が必須である。奇形腫は、多くの分化した細胞を含むため、動物の初期発生時の細胞分化のモデルとして用いられてきた。本研究における奇形腫をモデルに用いた解析により、分化に伴い DNA メチル化プロフィールが形成されることが確認され、さらに異常な

DNA のメチル化プロファイルの形成が、奇形腫の形成に関与していることが示唆された。

畜産において、優れた形質を持つ動物の繁殖は大きな課題であり、クローン技術の開発が行われてきた。実験動物であるマウスを用い、成体まで発生した個体の組織でも、DNA メチル化状態の異常が報告されている。本研究により、クローンウシの胎児期に組織特異的な DNA のメチル化プロファイルが、異なる DNA メチル化プロファイルを持つ供与核から正しく形成されていくことが確認された。その一方、異常な DNA メチル化を示す部位も多数存在し、DNA メチル化プロファイル形成の異常が、クローンウシに頻繁に観察される発生異常に関与していることが示唆された。

本研究で得られた T-DMR のメチル化状況を示すパネルは、クローン個体の正常さを知る指標として用いることが可能と考えられ、クローン胎仔で発見された異常な T-DMR の同定と解析により、クローン個体の DNA メチル化状況を指標とする診断法の開発につながることを期待できる。

またメチル化が異常であった T-DMR のメチル化状況を正常に戻すことが可能となれば、クローン技術の飛躍的な発展につながることを期待される。すでにアンチセンス RNA を用いることにより DNA メチル化状況を変化させることが出来ることが一部の遺伝子座で確認されており、今後、正常発生にクリティカルな遺伝子座の同定と、その治療法の開発が求められる。

本研究で得られた結果は、畜産分野のみならず再生医療分野にも適用可能である。発生分化に伴う正常な DNA メチル化プロファイルの樹立は共通する課題であり、本研究で得られた結果は、新たな技術を生み出す重要な手がかりを提供している。