

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Kremenskoj Maksym

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、分化した細胞・組織を特徴づける遺伝子が、秩序正しく発現する必要がある。哺乳類のゲノムには、細胞・組織特異的にメチル化修飾状態が変化する領域(T-DMR)が多数存在し、近傍の遺伝子発現を制御していると考えられている。T-DMR のメチル化あるいは非メチル化の組み合わせは膨大で、細胞種に特異的な DNA メチル化プロファイルが形成されている。哺乳類胚発生には、この DNA メチル化プロファイルのダイナミックな変化が伴う。本論文では、発生に伴う DNA メチル化プロファイルの形成過程とその異常に関する知見を得る目的で、マウス胚性幹細胞(ES 細胞)から形成されるテラトーマ、および、体細胞核移植(NT)により作出されたクローンウシの胎子、胎盤組織をモデルに DNA メチル化プロファイルを解析したもので、3 章より構成されている。

第 1 章では、マウス ES 細胞、胚様体(EB)、および ES 細胞から発生誘導したテラトーマの CpG アイランドを中心とした DNA メチル化状態が、制限酵素 NotI をランドマークに用いた RLGS (Restriction landmark genomic scanning)法により解析された。予想どおり、DNA メチル化プロファイルは、ES 細胞、EB、テラトーマで互いに異なっており、分化に伴い DNA メチル化と脱メチル化の両方が起きていることが証明された。

第 2 章ではウシゲノムにおける 2 つの CpG アイランドを有した遺伝子座の DNA メチル化解析が行われた。Leptin 遺伝子は母体と胎子胎盤間の相互作用の制御に関わり、胎子、胎盤の成長に役割を持つタンパク質をコードする。また、POU5F1 遺伝子はオクタマー結合転写因子 4 をコードし、哺乳類初期発生に重要である。人工授精と NT によって作出されたクローンウシ胎子(妊娠 48 日および 59 日齢)、およびそれらの胎盤組織における、両遺伝子座の CpG アイランドの DNA メチル化状態を解析すると、ウシ胎子、胎盤、子宮内膜組織において DNA メチル化状態が異なっていることが明らかになった。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発見されていたが、ウシゲノムでの報告は無い。両遺伝子座に見いだされたこれらの T-DMR において、NT により作出された胎子では、人工授精により作出された胎子に比べ DNA メチル化状態の変化が大きいことも見出された。

第 3 章では、RLGS 法を用いて、培養ウシ卵丘細胞から得た核移植ドナーの核、および NT クローンウシ胎子組織のゲノム全域の DNA メチル化プロファイルが調べられた。RLGS プロファイルに現れる約 2600 箇所の NotI 認識部位のうち、35 箇所で DNA 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子および NT で得られた胎子の胎盤、胎子組織には、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が発見された。

本研究では、テラトーマをモデルに用いた解析により、分化に伴い DNA メチル化プロファイ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、テラトーマの形成に関与していることが示唆された。また、クローンウシ胎仔期の研究では、組織特異的な DNA 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も一部正しく形成されていくことが確認された。しかし、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。このように、マウス ES 細胞を用いテラトーマ形成に伴う DNA メチル化プロファイル形成が明らかにされ、正常と異常な細胞分化についてのエピジェネティクス情報が得られた。また、ウシを対象に、正常発生とクローン発生における DNA メチル化解析も行われた。発生・分化に伴う正常な DNA メチル化プロファイルの確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。これらは、基礎生物学で重要な知見であるのみならず家畜繁殖分野および再生医療分野にも適用可能である。よって、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。