

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成 16 年度博士課程 進学

氏 名 新井 良和

指導教員名 塩田 邦郎

論文題目 マウス初期胚のエピジェネティクス

緒言

着床前胚の体外操作は、家畜生産やヒト不妊治療など幅広い分野で応用されている。従来、体外操作胚の正常性はヒトを含め、形態を基に評価されている。しかし、形態的に優れた胚を母体に移植したにも関わらず、着床後の発生異常や出生後も様々な疾病を伴うなど、胚への体外操作の影響は、着床前胚の形態だけでは判別できないのが現状である。

DNA メチル化は哺乳類のゲノム DNA に見られる唯一の化学修飾である。マウスゲノム上には細胞・組織特異的にメチル化されるゲノム領域が多数発見されている。このようなゲノム領域(T-DMR, Tissue dependently and differentially methylated region)が、細胞種によってそれぞれ異なるDNAメチル化状態を示すことによって、ある細胞種に固有の DNA メチル化プロファイルが形成される。T-DMR はゲノム上の遺伝子領域近傍に位置することが多く、一般に DNA メチル化は近傍の遺伝子発現を抑制する。このことから、細胞のDNAメチル化プロファイルは、細胞種固有のトランスクリプトームを規定する基盤になっていると考えることができる。細胞分化過程では、T-DMR の脱メチル化と新たなメチル化(de novo メチル化)の両方向の変化が起こり、分化細胞固有の DNA メチル化プロファイルが新たに形成される。

マウス初期発生では、受精後よりゲノム全体で脱メチル化が起こり、精子・卵に固有の DNA メチル化プロファイルが一旦消去されることが、全分化能の再獲得に重要であると一般的に考えられていた。と

ころが、*Dnmt1* 遺伝子座では、*de novo* メチル化を含む各発生ステージ特異的な DNA メチル化変化が生じる。このような *Dnmt1* 遺伝子座や T-DMR に関する我々の知見は、さらに多くの遺伝子領域でも着床前の発生ステージで DNA メチル化変化が生じ、各ステージ固有の DNA メチル化プロファイルが確立されている可能性を示唆している。DNA メチル化プロファイルが乱されれば、遺伝子発現やゲノムの安定性にも影響し、発生停止や着床後の表現型異常に繋がる可能性も考えられる。

そこで本論文では、第1章において、T-DMR として同定された遺伝子座に注目し、着床前初期胚での DNA メチル化プロファイルの確立を検証することを目的とした。さらに、酸素濃度条件が体外での発生能が異なる近交系、及び雑種 F1 マウス胚の DNA メチル化プロファイル形成に及ぼす影響を解析した。第2章では、マウス体細胞核移植胚における DNA メチル化異常が、体細胞核の DNA メチル化プロファイルの不完全な消去に由来するものだけであるかどうかを検証した。

第1章

「マウス初期胚 DNA メチル化プロファイルに対する体外培養の影響」

体外での着床前胚の発生には酸素濃度条件が大きく影響し、母体内環境の酸素濃度(3-10%)に近い 5% O₂ 条件の方が、外気と同じ約 20%(20% O₂) に比べて胚の発生率は向上する。しかし、現在も 20% O₂ での培養が一般的である。また、20% O₂ 条件におけるマウス初期胚の発生率は、マウスの系統により異なり、近交系マウスの胚盤胞形成率は雑種 F1 マウスに比べて劣ることが知られている。雑種 F1 マウスのトランスクリプトームはそれぞれのマウス系統と比較して大きく異なり、さらに精子と卵のマウス系統を入れ替えることでも変化するため、雑種 F1 個体が示す表現型の変化は、系統間の DNA 配列の違いのみによるものではなく、DNA メチル化のようなエピジェネティック機構も関与する可能性が考えられる。

本章では、まずマウス初期胚での DNA メチル化プロファイル形成について、5 遺伝子座(*Dnmt1*、*Oct4 DE*、*mPer1*、*Sphk1*、*Sall3*)を選び、解析を行った。次に、体外培養条件(酸素濃度)が初期胚の DNA メチル化状態に及ぼす影響の可能性を、近交系マウス胚(B6)と雑種 F1 マウス胚(BDF1)を用いて検証した。

着床前胚での遺伝子領域における DNA メチル化変化について、Restriction mapping 法を用いて解析を行った。母体内より回収された胚では、それぞれの遺伝子領域で発生ステージに応じた DNA メチル化変化が生じ、発生ステージ特異的な DNA メチル化プロファイルが形成されることが明らかとなった。これは、先に報告されている反復配列や非遺伝子領域での DNA メチル化状態と大きく異なり、遺伝子領域では着床前の発生ステージより、すでにダイナミックな DNA メチル化変化が生じているこ

とを示唆する。

B6 胚、BDF1 胚の DNA メチル化プロファイル形成に、体外での酸素濃度条件(20% O₂ または 5% O₂) が影響を与えるかどうか検証した。B6 胚では、20% O₂ 条件で胚盤胞への発生率は低下し、さらに桑実胚期で BDF1 胚と異なる高メチル化状態が複数の遺伝子領域で示された。一方、B6 胚も 5% O₂ 条件では、胚盤胞への発生率、DNA メチル化状態の乱れが共に改善された。また、BDF1 胚では酸素濃度条件によらず、胚盤胞への発生率が高く、母体内より回収された胚に類似した DNA メチル化プロファイルが形成された。以上の結果より、体外での酸素濃度条件は特に近交系マウス胚の DNA メチル化状態に影響し、卵管・子宮(3-10% O₂) よりも高い 20% O₂ 条件では、胚の DNA メチル化が乱されることが明らかとなった。このことは、着床前胚の DNA メチル化プロファイル情報が、体外操作が及ぼす胚への影響を評価する上で新たな指標となることを示唆している。

第2章

「マウス体細胞核移植胚における DNA メチル化プロファイル変化」

体細胞核移植技術は優良家畜の生産や再生医療など、様々な分野への応用が期待されている。しかし、体細胞クローン動物では分娩期までの発生能が低く、出生に至る個体でも過大仔や胎盤過形成などの表現型異常を示す。このような発生異常の可能性として、核移植胚では、体細胞核がもつ固有の DNA メチル化情報の消去が不完全であることに起因すると考えられていた。一方、第1章から、着床前胚の遺伝子領域における DNA メチル化変化は、発生ステージ特異的な脱メチル化と共に、*de novo* メチル化も伴うことが示された。本章では、着床前のマウス体細胞核移植胚の DNA メチル化プロファイル変化について、第1章で解析された 3 遺伝子座(*Oct4*、*Dnmt1o*、*Sall3*) の T-DMR に注目した。

生殖細胞(精子・卵)、核移植胚のドナー細胞(卵丘細胞)の 3 遺伝子座について、Pyrosequencing 法による定量的な DNA メチル化解析を行った。*Oct4* では卵丘細胞のみ高メチル化、生殖細胞は低メチル化状態であった。一方、*Sall3* では生殖細胞、卵丘細胞に共通して低メチル化状態が示された。

生殖細胞、卵丘細胞の DNA メチル化情報を基に、2細胞期胚での DNA メチル化変化について解析した。生殖細胞に由来する精子顕微授精(ICSI)胚、体外培養された自然交配卵では、3 遺伝子座に共通して、多くの個体で低メチル化状態が示された。一方、核移植胚の *Oct4* では多くの個体で高メチル化状態にあり、卵丘細胞からの脱メチル化が不完全であることが示された。興味深いことに、卵丘細胞でも低メチル化状態であった *Sall3* では、DNA メチル化の亢進が核移植胚にのみ高頻度に生じていた。また、2細胞期で発生停止・遅延した核移植胚では、このようなメチル化亢進が顕著に現れた。

以上の結果より、着床前の核移植胚での DNA メチル化異常は、メチル化亢進を含む両方向に生じることが明らかとなった。体細胞クローン動物の多くは胎生致死であり、核移植技術には依然として多くの問題が残されている。本結果から、DNA メチル化プロファイルは核移植胚の異常を知る上で有用な情報となることが期待される。

総合討論

本研究より、組織特異的な DNA メチル化パターン (T-DMR) が形成される 5 遺伝子座 (*Oct4*, *Dnmt1o*, *mPer1*, *Sphk1*, *Sall3*) では、メチル化の消去のみでなく、*de novo* メチル化を含めたダイナミックなメチル化変化が、着床前の発生ステージでも生じていることが明らかとなった。さらに、こうした初期発生の各ステージに特徴的な DNA メチル化状態が、形態的には母体内で発生した胚と違いがない場合でも、体外操作胚により乱されることが本研究で明らかとなった。これは、体外操作がインプリント遺伝子以外の複数の遺伝子領域で、着床前胚の DNA メチル化を乱すことを示した初めての報告である。

DNA メチル化プロファイルは、ステージごとにダイナミックに変化するものではあるが、DNA メチル基転移酵素の活性により、娘細胞へと受け継ぐことも可能である。本研究で観察された DNA メチル化プロファイルの乱れがゲノム全般で起こっていた場合、一部の乱れがゲノム上に記憶され、着床後の発生を経て出生後まで残存する可能性も十分考えられる。こうした DNA メチル化の乱れが、出生後の遺伝子発現をも乱し、表現型異常の原因となる危険性は否定できない。その意味で、本研究で検出された体外培養・操作による初期胚での DNA メチル化プロファイルの乱れは、ヒトを含む胚の体外操作への注意を喚起するものである。今後、何らかの異常がヒト体外受精児に多く見られた場合、本研究で明らかにした“エピジェネティック異常”も原因究明の糸口として議論されるべきであろう。

体外操作技術は家畜生産やヒト不妊治療に応用され、我々に多くの恩恵をもたらしている。しかし、本研究で示されたように体外操作は遺伝子領域のエピジェネティック修飾状態を乱し、着床前胚の形態には現れない影響を個体発生に及ぼしている危険性が十分考えられる。今後、DNA メチル化情報は、各種の体外操作による胚への影響を評価する上での新たな指標となり、胚への傷害が少ない培養系・操作法の確立へと繋がることを期待される。