

論文の内容の要旨

応用動物科学 専攻
平成 22 年度博士課程 進学

氏名 中西 もも
指導教員名 田中 智

論文題目 Studies on establishment of trophoblast cell lineage-specific DNA methylation profile
(栄養膜細胞特異的な DNA メチル化パターン形成の研究)

緒言

ほ乳類のゲノムには、細胞種・組織間で DNA メチル化状態の異なる領域 (T-DMR) が数多く存在し、T-DMR におけるメチル化状態の集約である DNA メチル化プロファイルはそれぞれの細胞に固有である。これはつまり、細胞が分化する際には DNA メチル化プロファイルの刷新が起こることを意味する。細胞分化に伴う新たな DNA メチル化プロファイルへの置換とその保持が、細胞形質の発現・維持に重要であると考えられる。

ほ乳類の胚発生では、最初の細胞分化によって栄養膜細胞系譜と胚体細胞系譜が分岐する。本研究では、この細胞分化において栄養膜細胞特異的な DNA メチル化プロファイルが形成されると考え、その機構を明らかにするべくマウス胚組織、および初期胚より樹立された培養細胞株 trophoblast stem (TS) 細胞, embryonic stem (ES) 細胞を用いて解析を行った。

第1章

ほ乳類の胚発生における最初の細胞分化により、胚盤胞期に栄養外胚葉 (TE) と内部細胞塊 (ICM) が生じる。これが栄養膜細胞系譜と胚体細胞系譜の分岐が形態的に明らかになる最初のステージである。本研究はまず、(1) マウス胚発生において、栄養膜細胞系譜特異的な DNA メチル化パターンの形成は起こるのか、(2) そのメチル化パターンの差異は胚盤胞期において TE と ICM の間ですでに生じているのか、の 2 つの疑問について検証することから開始した。

TE, ICM から樹立された幹細胞株である TS 細胞, ES 細胞はそれぞれ元となる組織の分化能, および遺伝子発現パターンをよく反映する。そこでまず, 両細胞株間でメチル化状態の異なるゲノム領域 (TS-ES T-DMR) を探索し, これをもとに *in vivo* においても栄養膜-胚体細胞系譜間で T-DMR である領域 (trophoblast-embryonic T-DMR, T-E T-DMR) を同定した。T-E T-DMR は, 6.5 日胚の胚体外外胚葉 (ExE) と原始外胚葉 (Epi) の比較においてもメチル化状態に差が見出された。また, これらマウスで同定された T-E T-DMR の配列はヒトゲノムでも保存されており, ヒト胎盤絨毛組織とヒト ES 細胞の間でもマウスと同様のメチル化傾向を示す T-DMR であった。つまり, T-E T-DMR における細胞系譜特異的なメチル化パターンは, 種を超えてヒトでも保存されていた。しかし, マウス 3.5 日胚盤胞におけるメチル化状態を解析すると, TE と ICM は形態も遺伝子発現様式も全く異なり, 両者の分化は明らかに起こっているにもかかわらず, TE, ICM のいずれにおいても T-E T-DMR はほとんどメチル化されておらず, 両組織の間に差は見られなかった。この結果から, 栄養膜細胞-胚体細胞系譜間の分化において, 細胞系譜特異的なメチル化パターンの確立は形態的な分化に遅れて起きることが明らかになった。

また, 着床遅延胚, 胚盤胞の接着培養で得られる outgrowth, および Hanging drop 中で接着させずに培養した胚盤胞, の 3 条件で, いずれも受精から 7.5 日が経過したサンプルを解析に供した, 着床遅延胚は胚盤胞の構造を維持したままであるが, Hanging drop 中で培養した胚盤胞は形態が変化し egg cylinder 様の構造をとる。また, 種々のマーカー遺伝子の発現を解析したところ, outgrowth および egg cylinder 様胚では 3.5 日胚盤胞と比較して, 栄養膜細胞の分化進行に伴って発現する遺伝子の発現上昇が見られた。DNA メチル化解析の結果, 着床遅延胚では, 3.5 日, 4.5 日胚と比べほとんどメチル化の亢進は見られなかったのに対し, outgrowth と egg cylinder 様胚では T-E T-DMR のメチル化の上昇が起きていた。以上の結果から, 栄養膜細胞特異的な DNA メチル化は時間の経過によって自動的に施されるのではなく, 分化・発生段階の進行に伴って起こることが示唆された。

第2章

ほ乳類は、活性を有する DNA メチル基転移酵素 (DNA methyltransferase, Dnmt) を 3 種類持つ。維持型とされる Dnmt1, 新規にメチル化を導入する (de novo 型) Dnmt3a, Dnmt3b である。第 2 章では, T-E T-DMR における栄養膜細胞特異的な DNA メチル化パターンの形成をいずれの Dnmt が担っているのか検証を行った。

Dnmt3a, 3b それぞれを欠損する 6.5 日胚の ExE および Epi の T-E T-DMR におけるメチル化状態を解析したところ, いずれの Dnmt を欠損するかによってメチル化率の低下が見られるゲノム領域は異なっていた。また, すべての活性型 Dnmt を欠損する TS 細胞 (TKO TS 細胞) に各 Dnmt を導入した場合のメチル化変化を解析したところ, この場合にも, ゲノム領域によって DNA メチル化の上昇をもたらす de novo 型 Dnmt は異なっていた。これらの結果から, T-E T-DMR における栄養膜細胞特異的な DNA メチル化を担う Dnmt はゲノム領域によって使い分けが行われていることがうかがわれた。一方, TKO TS 細胞にいずれの Dnmt を導入した場合でも, 本来 TS 細胞では低メチル化状態にあるゲノム領域ではメチル化の亢進は見られなかった。

以上の結果から, (1) 栄養膜細胞特異的な DNA メチル化パターンの形成には Dnmt3a, Dnmt3b の両方が寄与しているが, 領域によって主にそのメチル化を担う Dnmt が異なる, (2) TKO TS 細胞における DNA の「再メチル化」は, 本来 TS 細胞でメチル化されるべきゲノム領域に特異的に起こる, という結論が導かれた。そして, この DNA 再メチル化の特異性には, DNA メチル化の受け手であるゲノム側の状態が関与しているのではないかと推測した。

第3章

第 2 章の結果から, TS 細胞のゲノム上には, メチル化する／しないの目印として機能し, 栄養膜細胞の DNA メチル化プロファイルを形成するための基盤となるエピジェネティックマークが存在する, という仮説を立てた。そこで, その候補としてヒストン修飾に着目し, クロマチン免疫沈降法により T-E T-DMR における種々のヒストン修飾状態を調べた。得られたヒストン修飾レベルの相対値と, TKO TS 細胞に Dnmt を導入した際の DNA 再メチル化率を各領域についてプロットすると, H3K9me, H3K9me2, H3K36me2 修飾レベルと, Dnmt3a によって誘導されるメチル化率との間に正の相関があることがわかった。さらに, TKO TS 細胞のヒストン修飾レベルの値について同様にプロットした場合にも, この相関は維持されていた。

この結果から, Dnmt3a によって栄養膜細胞特異的な DNA メチル化パターンが形成される機構として, (1) Dnmt, もしくは Dnmt をリクルートする因子が H3K9me, H3K9me2, H3K36me2 修飾を認識し, そのゲノム領域に Dnmt が DNA メチル化を施す, (2) これらのヒストン修飾

を担うヒストンリシンメチル化酵素が Dnmt をリクルートし、結果として同じゲノム領域にヒストンのメチル化と DNA のメチル化が高いレベルで見出される、という 2 つの可能性が考えられた。

総括

本研究の結果から、マウス胚発生における栄養膜細胞系譜の分化に伴う DNA メチル化プロファイルの確立は、形態的な TE/ICM の分化に遅れて起こることが示された。過去の報告により、胚盤胞期のゲノムワイドな DNA メチル化レベルは ICM において TE よりも高いと考えられてきた。しかし本研究は、T-E T-DMR における細胞系譜特異的なメチル化の変化はゲノムワイドな DNA メチル化レベルの変化するパターンとは異なるという知見を示した。そして、この細胞系譜特異的な DNA メチル化は、さらに発生・分化の段階が進行するにつれて生じることを見出した。

また、T-E T-DMR における DNA メチル化を担う Dnmt は各ゲノム領域によって異なっており、特に Dnmt3a を介した栄養膜細胞特異的な DNA メチル化パターンの形成には、H3K9 および H3K36 のメチル化、もしくはその修飾酵素が重要な働きを持つ可能性が示された。