



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マウスゲノム多倍体化が個体発生およびエピジェネティック修飾に及ぼす影響 [全文の要約]
Author(s)	山崎, 渉
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第12710号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65957
Type	doctoral thesis
File Information	Wataru_Yamazaki_summary.pdf



学位論文内容の要約

博士の専攻分野の名称: 博士(農学)

氏名 山崎 渉

マウスゲノム多倍体化が個体発生およびエピジェネティック修飾に及ぼす影響

背景

倍数性とは細胞核中の遺伝情報を含む染色体のセットであるゲノムをいくつ持つかという概念である。通常哺乳類におけるゲノムの多倍体化は、そのほとんどが胎生致死を引き起こす。しかし、哺乳類がゲノムの多倍化によって、その生存を許容しない原因については明らかとなっていない。これらの原因を探ることは、通常の二倍体を逸脱した異数性により引き起こされる様々な疾患および発生異常の根本的な原因の解明につながるかもしれない。ゲノムの多倍体化による個体発生の障壁としては、一細胞あたりの遺伝子コピー数の増加による「ジェネティクス」の要因が考えられるが、「エピジェネティクス」の要因については、その研究がほとんどなされていない。そこで本研究ではマウス多倍体胎子、特に四倍体胎子を対象とし、エピジェネティックな観点から、ゲノムインプリンティング、および着床後の分化能を精査することにより、ゲノム多倍体化が哺乳類個体発生に与える影響について検証することを目的とした。

(1) マウス四倍体胚の個体発生

【目的】

マウス四倍体胚は2つの雌性ゲノム、および2つの雄性ゲノムから構成された多倍体胚であり、その作出方法や発生能については古くから検証が行われてきた。マウス四倍体胚はその特徴として、胎齢14.5日で胎生致死となり、卵筒期におけるアポトーシスの増加、頭部形成異常、特に前脳や眼球の形成不全、脊椎軸の異常形成が挙げられる。しかし、このような特徴を

裏付ける分子生物学的な解析報告は未だなされていない。そこで本項では、はじめに効率的な四倍体胚の作出方法を検討した。次に、作出された四倍体胚の着床前後の発生能を検証した。また、胎齢 10.5 日マウス四倍体胎子において、発生学的特徴との関連が予想される遺伝子の発現レベルの解析を行った。

【材料と方法】

本実験では、精子採取のための雄マウス、および卵子採取のための雌マウスは、性成熟した(8~12 週齢)B6D2F1(C57BL/6N × DBA/2)を用いた。これらマウスを用いて、体外受精を行い、受精卵を作出した後、体外培養を行い、二細胞期に達した胚を実験に供した。はじめに、効率的な四倍体胚の作出方法を検討するため、二細胞期胚の割球を融合させるため、センダイウイルスを用いる場合、そして、電気刺激を加えた場合とで、その融合効率を比較して割球融合法を決定した。次に、決定した方法により四倍体胚を作出し、体外培養による胚盤胞期胚までの発生、および、胚移植による、着床後、胎齢 10.5 日における発生能を検証した。最後に、作出した胎齢 10.5 日四倍体胎子から mRNA を抽出し逆転写後、アポトーシス関連遺伝子である *p53*、脊椎軸形成関連遺伝子である *Hoxc9*、神経発生関連遺伝子である *Map1b*、*Pax6*、*Nestin* の相対発現量を、Quantitative real-time PCR により、二倍体胎子と比較した。

【結果と考察】

はじめに、センダイウイルスと電気刺激による割球融合効率の比較を行ったところ、センダイウイルスの割球融合率は 31.6%であったのに対し、電気刺激による割球融合率は 96.5%であった。そこで以降の実験では、四倍体胚の作出は電気刺激による割球融合法を採用することとした。続いて、この電気刺激による割球融合法により作出した四倍体胚の胚盤胞期胚までの発生率を、二倍体胚と比較した。その結果、二倍体胚の胚盤胞期胚までの発生率は、95.9%であったのに対し、四倍体胚の胚盤胞期胚までの発生率は 99.5%であり、二倍体胚と同程度

の発生率を示した。次に、これら胚盤胞期胚を胚移植に供し、胎齢 10.5 日における、着床痕の形成を基準とした着床率、生存胎子の割合を指標にした生存率を比較した。その結果、四倍体胚の着床率は 70.5%と、二倍体胚の着床率(92.6%)と比較して遜色なかった。しかし、生存胎子の割合については、二倍体胎子が 51.9%であったのに対し、四倍体胎子は 8.6%と、劇的に生存率が減少した。また、胎齢 10.5 日の四倍体胎子においては、既報と同様の特徴である、頭部形成異常、前脳や眼球の形成不全、脊椎軸の異常形成などの発育不全を示す表現型が観察された。最後に、胎齢 10.5 日における四倍体胎子において、これら発生学的特徴と関連する遺伝子の相対発現レベルを二倍体胎子と比較した。その結果、アポトーシス関連遺伝子である *p53* の発現レベルは二倍体胎子と同程度であったものの、脊椎軸形成関連遺伝子である *Hoxc9*、神経発生、眼球形成関連遺伝子である *Map1b*、*Pax6*、*Nestin* の mRNA 発現レベルはいずれも有意に低い発現レベルを示した。これらのことから、マウス四倍体胚を効率よく構築する実験系が確立でき、マウス四倍体胎子における発育不全の特徴と発生関連遺伝子の発現レベルとの関係が示された。

(2) マウス四倍体胎子のインプリント遺伝子発現解析および多倍体胎子における DMR メチル化解析

【目的】

前項に引き続き、四倍体胎子の発育不全と発生関連遺伝子の関連をさらに深く理解すべく、本項では哺乳類特有のインプリント遺伝子群に着目した。インプリント遺伝子はマウスゲノム上に 80 以上存在し、機能的に着床後の個体発生の正常な進行に必要不可欠なものが多く、片親由来ゲノムからのみ発現を示す。この片親性発現は、雌雄アレル間で DNA メチル化状態が異なる領域(DMR)上における性特異的メチル化パターンの差異により制御されていることから、代表的なエピジェネティック修飾が制御する生命現象の一つである。そこで本項では、はじめに、四倍体胎子において、マウス胎子成長や神経発生に関連するインプリント遺伝子群の発

現レベルを検証し、それら発現を制御する DMR の DNA メチル化レベルと片親性発現の維持について調べた。また、DMR の DNA メチル化解析は、同じく多倍体胚である、三倍体胎子についても行った。

【材料と方法】

マウス四倍体胎子は、前項同様に電気刺激により作出し、胎齢 10.5 日の胎子を解析に供した。マウス三倍体胎子は、前核移植法により作出し、体外培養、胚移植に供し、胎齢 10.5 日の胎子を解析に供した。インプリント遺伝子発現解析に用いた四倍体胎子は前項と同じく雌雄は B6D2F1 を用い、DMR メチル化解析、およびインプリント遺伝子発現アレル解析に用いた四倍体胎子、三倍体胎子は、亜種間多型に基づき雌雄アレルを区別して解析を行うため、雌には B6D2F1 を、雄には JF1/Ms 系統を用いて作出した。インプリント遺伝子発現解析は、前項と同様に胎齢 10.5 日の四倍体胎子から mRNA を抽出し、逆転写後、相対発現量を、Quantitative real-time PCR により、二倍体胎子と比較した。DMR の DNA メチル化解析は、胎齢 10.5 日の胎子からゲノム DNA を抽出し、バイサルファイト処理を施し、バイサルファイトシーケンスにより DMR の DNA メチル化レベルを検証したインプリント遺伝子発現アレル解析は B6D2F1-JF1/Ms 胎子から、mRNA を抽出し、逆転写後、ダイレクトシーケンスにより発現アレルを決定した。なお、コントロールとして、すべての解析に二倍体胎子を用いた。なお、インプリント遺伝子発現解析は、父性発現インプリント遺伝子として、*Igf2*、*Dlk1*、*Peg3*、*Snrpn*、*Ndn*、*Ipw* の 6 遺伝子を、母性発現インプリント遺伝子として、*H19*、*Gtl2*、*Igf2r*、*Grb10*、*Zim1* の 5 遺伝子を対象とした。また、DMR の DNA メチル化解析は、父性メチル化 DMR として *H19*-DMR および *IG*-DMR を、母性メチル化 DMR として *Igf2r*-DMR2、*Snrpn*-DMR を対象とし、インプリント遺伝子発現アレル解析は *Igf2*、*Gtl2*、*Dlk1* を対象とした。

【結果と考察】

インプリント遺伝子発現解析の結果、マウス四倍体胎子は、二倍体胎子(100%)と比較し、*Dlk1*(329%)、*Peg3*(263%)、*H19*(201%)、*Gtl2*(346%)、*Igf2r*(532%)、*Grb10*(215%)および *Zim1*(1170%)において有意な発現レベルの上昇が検出された。また、*Ndn*(29.3%)、*Ipw*(2.87%)においては有意な発現レベルの減少が見られた。続いて、これらインプリント遺伝子の発現レベルの変化の原因を探るため、DMR の DNA メチル化解析を行った。その結果、四倍体胎子、および三倍体胎子における *H19*-DMR、IG-DMR、*Igf2r*-DMR および *Snrpn*-DMR の 4 か所の代表的な DMR における DNA メチル化レベルは全て性特異的 DNA メチル化レベルを維持していた。また、四倍体胎子におけるインプリント遺伝子もすべて、性特異的片親性発現を維持していた。以上の結果より、成長抑制に機能する母性発現インプリント遺伝子群の発現レベルが上昇していたことから、四倍体胎子における発育不全との関連が推察された。また、神経発生関連の機能を有する *Ndn* や *Ipw* の発現レベルの減少は、前項における神経発生関連遺伝子群の発現レベルの低下と矛盾しないものとなった。これらのことから、マウス四倍体胎子におけるインプリント遺伝子発現レベルは二倍体胎子と比較し、胎子が保有するゲノム数を反映しない発現様式を示しており、四倍体胎子の発育不全を裏付けるものであった。一方で、このインプリント遺伝子発現レベルの変化の原因は、DMR の性特異的 DNA メチル化レベルの変化や、インプリント遺伝子の片親性発現様式崩壊の直接的な原因ではないことが明らかとなった。DMR メチル化レベル非依存的なインプリント遺伝子発現変化の要因としては、過去の知見から、四倍体細胞特有の細胞周期、細胞増殖性、および細胞分化能の二倍体細胞との相違が推察された。

(3) マウス四倍体胎子における着床後分化能の検証

【目的】

前項において、マウス四倍体胎子のインプリント遺伝子発現レベルの変化の要因として、四

倍他細胞の細胞分化能の関与が考察された。しかし、マウス四倍体胎子の分化能に関しては、組織形態学的解析が主で、分子生物学的解析がほとんどなされていない。そこで本項では、マウス四倍体胎子の着床後分化能について、未分化マーカー遺伝子発現制御の観点から解析した。マウス胚は、着床前の内部細胞塊や、着床後における卵筒期の将来胎子本体を形成するエピブラスト部位において、未分化マーカー遺伝子である *Oct4* および *Nanog* の発現維持により、未分化能が保たれるが、その後、エピブラストから、胎子組織へ分化する際には *Oct4* や *Nanog* の発現レベルが減少する。そして、*Oct4* および *Nanog* の発現は、その遺伝子のプロモーター部位の DNA メチル化修飾により制御されていることが知られている。本項では、*Oct4* および *Nanog* のプロモーター部位の DNA メチル化レベルを指標とし、マウス四倍体胎子における分化能について検証した。

【材料と方法】

胎齢 10.5 日における四倍体胎子の *Oct4* および *Nanog* のプロモーター部位の DNA メチル化解析は、前項と同様に、マウス四倍体胎子からゲノム DNA を抽出し、バイサルファイト処理後、バイサルファイトシーケンス法により検証した。

【結果と考察】

胎齢 10.5 日におけるマウス四倍体胎子の *Oct4* および *Nanog* のプロモーター部位の DNA メチル化を、二倍体胎子と比較したところ、*Oct4* プロモーター部位の DNA メチル化レベルは同時期の二倍体胎子と同程度であった(二倍体: 26.4%、四倍体: 32.3%)。しかし、*Nanog* プロモーター部位の DNA メチル化は二倍体胎子と比較し、低メチル化レベルにあることが判明した(二倍体: 17.0%、四倍体: 9.0%)。これらの結果から、マウス四倍体胎子において、分化能の低下、あるいは遅延との関連が示唆された。マウス四倍体胎子における *Nanog* のプロモーター部位の DNA メチル化の低下が、細胞分化能の低下、あるいは遅延を引き起こし、これによ

り四倍体胎子のインプリント遺伝子発現レベルの変化や、発育不全が起きていることが推察された。

結論

哺乳類個体発生におけるゲノムの多倍体化は、DMRの性特異的DNAメチル化レベル非依存的なインプリント遺伝子発現や、未分化マーカー遺伝子プロモーター部位のDNAメチル化獲得に影響を及ぼし、その影響は個体発育を阻害へと導くことが示唆された。これらの研究結果は哺乳類においてゲノム多倍体化による個体発生への影響をエピジェネティックな観点から実証したもので、発生生物学ならびに分子生物学的に重要な知見となるため、将来的に家畜やヒトのゲノム重複由来疾患の原因解明ならびに新たな治療法の開発に寄与するものと期待される。