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［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	山﨑, 渉
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/2115/65959
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Wataru_Yamazaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博　士（農学）　　氏名　　山﨑　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

哺乳類におけるゲノム多倍体化は胎生致死を引き起こす。しかし、ゲノム多倍体化による個体発生阻害の分子的な機構は明らかとなっておらず、DNA 塩基配列の変化を伴わないエピジェネティック修飾に基づく遺伝子発現調節機構の観点からの解析は不十分である。そこで本研究では、マウス多倍体胎子、特に四倍体胎子を中心に、エピジェネティックな観点から、雌雄ゲノム機能差に関わるゲノムインプリンティング、および、着床後の分化能に着目して解析することにより、哺乳類におけるゲノム多倍体化が個体発生に及ぼす影響について調べることを目的とした。

(1) マウス四倍体胚の個体発生

マウス四倍体胚は 2 セットずつの雌性および雄性ゲノムから構成され、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、前脳や眼球の形成不全、脊椎軸の異常形成が特徴的である。しかし、このような特徴を裏付ける分子生物学的な知見が得られていなかった。そこで本項では、初めに四倍体胚の発生能を二倍体胚と比較するとともに、上記四倍体胎子の発生生物学的特徴と関連が予想される遺伝子の発現解析を実施した。四倍体胚の着床前後の発生率は、着床前発生率は二倍体胚と同程度であったものの、着床後胎齢 10.5 日における発生率は大幅に減少しており、胎子には既報と同一の特徴を備えた表現型が観察された。これら四倍体胎子について既知の発生関連遺伝子発現レベルを調べた。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が、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* および *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、マウス四倍体胎子における発育不全の特徴といくつかの発生関連遺伝子の発現レベルとの関連が示された。

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

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、機能的に個体発生の正常な進行に関わるものが多く、片親性アリル発現を示す。この片親性発現は、雌雄アリル間で DNA のメチル化状態が異なる領域（DMR）上における、性特異的 DNA メチル化パターンの差異によって制御されていることから代表的エピジェネティックな生命現象の一つである。初めに、主だったインプリント遺伝子の発現レベルを定量 PCR により調べ、それらの発現を制御する 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。DMR のメチル化解析には、バイサルファイトシークエンス法を用い、B6D2F1-JF1/Ms 間のマウス亜種間多型から、雌雄アリルの区別を行った。また、転写産物のダイレクトシークエンスを行い亜種間多型に基づいて発現アリルを決定した。解析したインプリント遺伝子は、父性発現インプリント遺伝子を 6 種、母性発現インプリ

ント遺伝子 5 種を対象とした。DMR メチル化解析では、*H19*-DMR、IG-DMR、*Igf2r*-DMR2、および *Snrpn*-DMR の 4 領域について解析を実施した。解析の結果、四倍体胎子では、*Dlk1*、*Peg3*、*H19*、*Gtl2*、*Igf2r*、*Grb10* および *Zim1* が、二倍体胎子と比較して有意に高い発現レベルを示していた。また、*Ndn* および *Ipw* においては有意に低い発現レベルを示していた。しかし、四倍体胎子における 4 つの DMR 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おり、発現様式も二倍体胎子同様に片親性発現を維持していた。以上の結果より、成長抑制機能を示す母性発現インプリント遺伝子群の発現が上昇していたことから、四倍体胎子の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もつ *Ndn* および *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の発現レベル低下の結果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べて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の崩壊ではないことが明らかになった。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、細胞分化能が推察された。

(3)　マウス四倍体胎子における着床後分化能の検証

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原因一つとして、四倍体細胞の細胞分化能の関与が考察された。そこで本項では、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 *Oct4* および *Nanog* の発現制御の観点から、両遺伝子プロモーター部位の DNA メチル化レベルを指標として、四倍体胎子における分化能について調べた。バイサルファイトシークエンスの結果、胎齢 10.5 日における四倍体胎子の *Oct4* プロモーター領域の DNA メチル化レベルは二倍体胎子と同程度であった。しかし、*Nanog* プロモーター領域の DNA メチル化レベルは二倍体胎子と比較し、低メチル化状態にあることが判明した。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* プロモーターメチル化レベルの異常が、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における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。

本研究から、マウス四倍体胎子の発育不全とインプリント遺伝子などの発生に重要な遺伝子群の発現異常との関連が示唆された。さらに、インプリント遺伝子発現異常が DMR 性特異的 DNA メチル化レベルの変化や片親性発現の崩壊とは独立した原因で生じていることが初めて明らかとなった。最後に、マウス四倍体胎子では未分化マーカー遺伝子 *Nanog* プロモーター部位の DNA メチル化レベルが低下しており細胞分化のレベルが二倍体胎子に比較して低い可能性が示された。結論として、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、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。