

# 研 究 報 告 書

## 「ゲノムインプリンティングによる生体の恒常性維持機構の解明」

研究タイプ: 通常型(※延長無／増額無)

研究期間: 平成 27 年 6 月～平成 30 年 3 月

研 究 者: 山口 新平

### 1. 研究のねらい

ゲノムインプリンティングは父母アレルのうち片方からのみ特異的に発現し、片方のアレルが抑制される遺伝子である。この分子基盤は精子と卵子において異なるパターンで獲得される DNA メチル化やヒストン修飾であり、この異なるエピジェネティック状態が受精後も維持されるために片アレル性の遺伝子発現が生じる。インプリンティング遺伝子はマウスやヒトにおいて 100-150 遺伝子程度報告されており、胎盤形成や成長、発生などに重要な機能を果たしている。そのため、インプリンティング遺伝子の異常が生じる遺伝的、あるいはエピジェネティックな変異は疾患と密接に関わっている。例えば、Kcnq1ot1 遺伝子領域の DNA メチル化異常によって生じる Beckwith-Wiedemann 症候群では過成長や腫瘍の頻発などの症状が認められる。このような生理的な重要性にもかかわらず、インプリンティング遺伝子領域のアレル特異的なエピジェネティック状態がどのように維持されているのかは未解明である。ゲノムワイドな DNA 脱メチル化が生じる初期胚発生や、始原生殖細胞発生初期においてもインプリンティング領域が特異的に脱メチル化を免れていることが明らかになっている。このことから、アレル特異的なエピジェネティック状態を維持する未知の因子が存在するのではないかと考え、その同定を目的に研究を行った。

本研究ではゲノムワイドスクリーニングを通じて未知のインプリンティング維持因子の同定を試みた(研究テーマ A)。また、同時に、既知の報告や分子的な特徴からインプリンティングを制御する候補遺伝子を絞り込み、その欠損マウスにおける遺伝子発現や DNA メチル化状態、表現型の解析するアプローチも行った(研究テーマ B)。さらに、当初は想定していなかったが、研究テーマ A を進める過程で胚性幹(ES)細胞の樹立過程でインプリンティングが消失していくことを見出したことから、その分子機構を解明する目的で、ES 細胞の樹立プロセスの解析も行った(研究テーマ C)。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

ゲノムワイドスクリーニングを目的とした研究テーマ A に関しては、インプリンティング破綻を検出可能なレポーターマウスおよび細胞の樹立に成功した。父性ゲノムのみを持つ単為発生胚に由来する ES 細胞を樹立し、母性発現遺伝子の下流にレポーターを挿入した。また、ヒストン修飾依存的インプリンティング遺伝子 Phf17 のレポーターマウスと、その他の DNA メチル化依存的インプリンティング遺伝子のレポーターマウスの樹立にも成功した。

候補遺伝子を絞り込んだ上での解析を行った研究テーマ B においては、DNA 脱メチル化に関連する Tet1 がインプリンティング維持に機能していることを見出した。Tet1 欠損マウスでは成長遅延が認められるが、成長を制御する脳下垂体において複数のインプリンティング遺伝

子の発現低下が生じていた。Tet1 は、インプリンティング領域の非メチル化アレルに生じるメチル化エラーを常に脱メチル化することで低メチル化状態に維持することで、遺伝子発現の活性状態を維持していることがわかった。また、インプリンティング遺伝子だけでなく、成長ホルモンの発現低下およびプロモーター領域の高メチル化も生じていた。これらのことから、Tet1 は脳下垂体における DNA 脱メチル化を通じて正常な成長の担保に機能していることが示唆された。

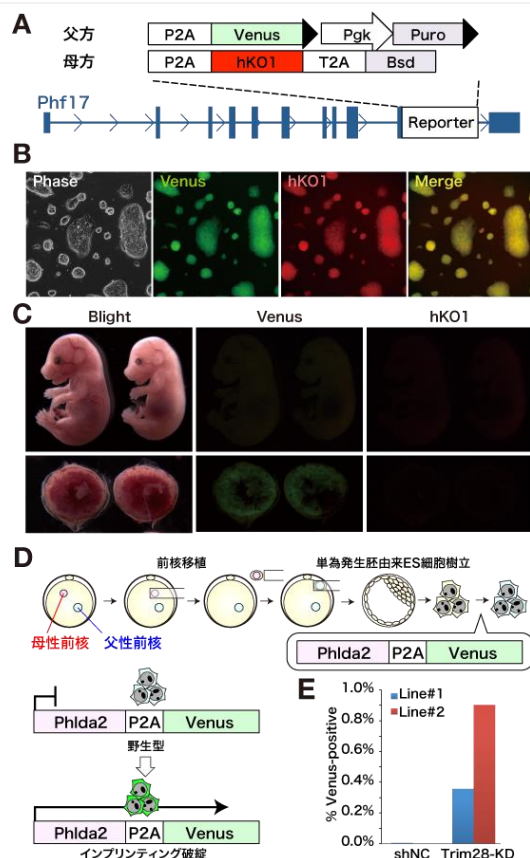
胚盤胞から樹立される胚性幹 (ES) 細胞では、ほとんどのインプリンティングが消去されて両アレル発現が生じていることを見出した。そこで、研究テーマ C として ES 細胞樹立の分子機構を解明するために、ES 細胞の維持と樹立で要求されるシグナルを詳細に解析した。その結果、MEK 経路の阻害は ES 細胞の維持には不要だが、樹立の過程で必要となること、また、培養開始3日間 MEK 経路を阻害すれば、その後は MEK 阻害なしに ES 細胞の維持が可能となること、この3日間には X 染色体上の未分化維持因子の活性化が生じていることを見出した。

## (2) 詳細

研究テーマ A「インプリンティング破綻検出のためのレポーター系の樹立」

ゲノムワイドスクリーニングを行うために、父方アレル特異的発現インプリンティング遺伝子 Phf17 の父方、母方アレルに緑色蛍光タンパク質 Venus 遺伝子、赤色蛍光タンパク質 hKO1 遺伝子をそれぞれ挿入したマウスを樹立した(図 1A)。Phf17 レポーター ES 細胞ではインプリンティング破綻が生じて両アレルから発現が認められるが(図 1B)、レポーターマウスの胎盤においては父方アレルからのみの発現が認められる(図 1C)。この胎仔及び胎盤組織から初代培養細胞や線維芽細胞を樹立したが、いずれもレポーターの発現が認められず、胚体外内胚葉幹細胞では両アレルからレポーターが発現するインプリンティング破綻が生じていて実験に用いることができなかった。そこで、ES 細胞を用いてレポーター細胞を樹立する方針に計画を変更した。ES 細胞と胚盤胞のアレル特異的トランスクリプトーム解析

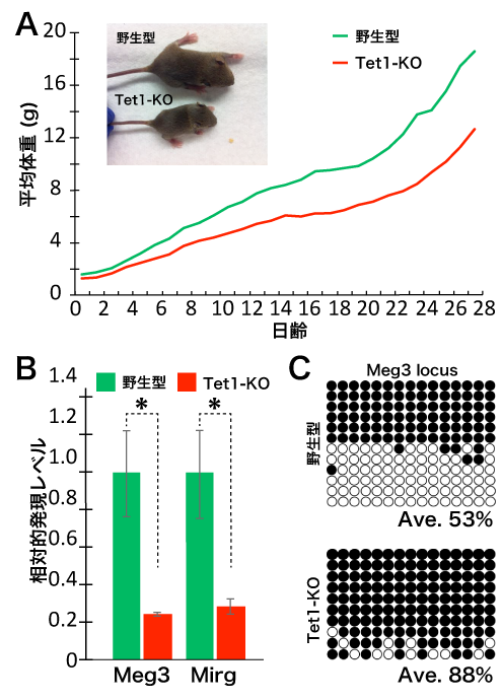
を行い、片アレル性発現を維持している因子を網羅的に解析した。その結果、Beckwith-Wiedemann 症候群関連領域に存在する母性発現遺伝子 Phlda2 が ES 細胞においても片アレル発現を維持していることを見出した。そこで、受精卵の前核移植を行うことで父方アレルしか有しない雄性単為発生胚を作出し、ES 細胞を樹立した(図 1D)。この雄性単為発生胚由来



ES 細胞の Phlda2 遺伝子領域に Venus 遺伝子を挿入することで、レポーター細胞を樹立した。この細胞ではインプリンティング維持されているとレポーターの発現が認められないが、インプリンティング破綻が生じると発現の上昇が認められる。検証のためにインプリンティングの維持に機能することがわかっている Trim28 をノックダウンしたところ、Venus 陽性細胞の有意な上昇が認められ、インプリンティング破綻を検出できることがわかった(図 1E)。これらのマウス、細胞はインプリンティングの制御機構を明らかにする上で重要な研究ツールとして応用可能である(研究成果(3)-1)。

#### 研究テーマ B「Tet1 による脳下垂体におけるインプリンティング維持」

インプリンティング領域は、片方のアレルではメチル化状態を、もう片方のアレルでは非メチル化状態を維持する必要がある。非メチル化状態を維持するためには、メチル化エラーを除去する恒常的な DNA 脱メチル化が生じているのではないかと考え、DNA 脱メチル化に寄与する Tet1 に着目した。Tet1 欠損マウスでは成長異常が生じて体のサイズが通常より 30%程度小さくなっていた(図 2A)。成長に重要な器官である脳下垂体を解析したところ、Meg3, Mirg, Peg3, Cdkn1c, Igf2 など複数のインプリンティング遺伝子が発現異常を示していた(図 2B)。第14番染色体父親性ダイソミー症候群の責任遺伝子領域にある Meg3 に着目して DNA メチル化を解析したところ、野生型の下垂体では約 50%のメチル化を示して片アレル型のメチル化が維持されていた一方、Tet1 欠損マウスでは 88%までメチル化が上昇していた(図 2C)。また、インプリンティング遺伝子だけでなく、成長ホルモン遺伝子も発現の低下とメチル化の上昇を示していた。これらの結果から、Tet1 による DNA 脱メチル化はインプリンティングの非メチル化アレルの低メチル化状態の動的維持や成長ホルモンの発現上昇に寄与していることが示唆された(研究成果(3)-2, 3)。



#### 研究テーマ C「ES 細胞の樹立と維持で異なる要求性とその分子機構」

ES 細胞は未分化状態をほぼ無限に維持することが可能であるが、生体内では未分化細胞は一過的にしか出現せず、発生に伴って消失するものである。この未分化状態の安定化がどのように生じているのかを明らかにするために、まず、ES 細胞の維持と樹立に必要な条件の検証を行った。その結果、従来必要と考えられていた MEK 経路の阻害は ES 細胞の維持には必須ではないが、樹立の過程では必須であることがわかった。さらに詳細に培養条件を検証した結果、胚盤胞の培養開始3日間 MEK 阻害剤を添加しておくことで、未分化状態が安定化し、MEK 阻害無しでも安定した培養が可能になることがわかった。培養初期の3日間では X 染色体上に存在する未分化維持因子 Eras の活性化が生じているが、MEK 経路が阻害されていない状態では Eras の活性化が生じず、ES 細胞の樹立が行えないことがわかった(研究成果(1)-1, (3)-4)。

### 3. 今後の展開

研究テーマ A ではインプリンティング破綻をリアルタイムで検出できる実験系が確立されたことで、スクリーニングの準備が整った。ゲノムワイドなスクリーニングを通じて未知のインプリンティング維持因子を同定する。一方で、ほとんどのインプリンティングが破綻し、両アレル性発現を示す ES 細胞において、なぜ Phlda2 は片アレル性発現を維持できるのか、という点も明らかにしていきたい。インプリンティングの頑強性は遺伝子によって異なることが示唆されており、その分子基盤に迫る重要な研究ツールとなることが期待される。

研究テーマ B に関しては、DNA 脱メチル化を通じたエピゲノム恒常性維持機構に研究を展開していく。これまでの研究では DNA メチル基転移酵素及びその共因子によるメチル化パターンの維持が注目されてきたが、本研究結果は、恒常的なメチル化除去による非メチル化パターンの維持も重要であることを示唆している。Tet タンパク質による産物である DNA ヒドロキシメチル化シトシンが下垂体の発生過程と成体においてどのようなゲノム分布を示すのか、それが破綻した時にどのようなエピゲノムおよび遺伝子発現異常を示すのか、をゲノムワイドに明らかにしていく。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

当初計画していた未知のインプリンティング維持因子を同定するという目的は達成できなかったが、スクリーニングを行うために必要な研究ツールの樹立と、Tet1 がエピゲノム恒常性維持に関与することを見出した。これまでの研究成果に立脚し、非メチル化アレルの維持因子として Tet1 を同定できたことは評価できていると考えている。特に、恒常性維持の重要器官である脳下垂体の発生において、Tet1 が絶え間ない脱メチル化によってメチル化エラーを除いているという「動的恒常性維持」に機能していることを明らかにしたことは、領域の目的とも合致していると自負している。さきがけ期間中に論文の形として発表できなかった点は反省すべきであり、さきがけ終了後も研究を継続して速やかに発表する計画である。なお、研究費のほとんどは物品と消耗品に用いており、妥当であった。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題ではゲノムワイドスクリーニングを通じて未知のインプリンティング維持因子の同定、ならびに既知の報告や分子的な特徴からインプリンティングを制御する候補遺伝子を絞り込み、その欠損マウスにおける遺伝子発現や DNA メチル化状態、表現型の解析を試みた。さらに、胚性幹(ES)細胞の樹立過程でインプリンティングが消失していくことを見出したことから、その分子機構を解明する目的で、ES 細胞の樹立プロセスの解析も行った。その結果、DNA 脱メチル化に関連する Tet1 が脳下垂体におけるインプリンティング維持に機能していることを見出した。また、胚盤胞から樹立される胚性幹(ES)細胞では、ほとんどのインプリンティングが消去されて両アレル発現が生じていることを見出した。また、インプリンティング破綻



を検出可能なレポーターマウスの樹立にも成功した。従って、インプリンティングという非常に興味のある生命現象の分子メカニズムの解明に一步近づいたと言える。

山口新平研究者のこのような生物学における難関に挑戦する姿勢を高く評価したい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Riyo Konishi, Toru Nakano, Shinpei Yamaguchi. Distinct requirements for the maintenance and establishment of mouse embryonic stem cells. Stem Cells. Under review.

### (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 学会発表

1. 山口新平, ES 細胞の樹立におけるインプリンティング破綻の機構と役割. 第 11 回日本エピジェネティクス研究会年会, 東京, 2017/05/20
2. S Yamaguchi, T Maeda, T Nakano, Molecular function of Tet1 in the epigenetic reprogramming through mouse germ cell development, 88th Annual Meeting of the Genetics Society of Japan. Mishima, 2016/9/7
3. Shinpei Yamaguchi, Physiological function of Tet1 in germ and somatic cell development, International Symposium of Oral and Craniofacial Development and Diseases. Osaka, 2017/11/17
4. Riyo Konishi, Toru Nakano, Shinpei Yamaguchi, Distinct requirements for the establishment and maintenance of sustainable pluripotency of mouse embryonic stem cells, 18th International Congress of Developmental Biology. Singapore, 2017/06/20