研究課題別評価

１．　究課題名：雄の生殖細胞への卵子型インプリントの導入−雄どうしは交配できるか？

２．　研究者氏名：畑田出穂

研究員：野村扶（研究期間：H15.3.1〜H18.3.31）

深澤正幸（研究期間：H15.4.1〜H16.8.13）

森田純代（研究期間：H16.12.1〜H18.3.31）

３．　研究のねらい：

ほ乳類の発生、分化においてゲノムのエピジェネティク情報の維持とリプログラミングは重要なはたらきをする。配偶子形成過程においてはインプリント遺伝子のエピジェネティクな情報のリプログラミングとその後の維持により、精子型、あるいは卵子型のそれぞれ特異的なエピジェネティクな情報の記憶が次世代に伝わり、受精後の個体発生において異なる働きをするため単一性の親由来ゲノムのみの胚の発生を不可能にしている。エピジェネティク情報の維持とリプログラミング機構を理解することにより、この機構を自由にあやつることができれば単一親からの固体発生や、発生分化を制御することが可能にもなると考えられる。この研究ではゲノムのエピジェネティク情報の維持とリプログラミング機構を理解することをめざした。

４．　研究成果：

（1）Dicer ノックアウトマウスを用いたリプログラミング機構の解析

エピジェネティクな遺伝子の不活性化の機構において RNAi が重要な働きをしていることは植物、酵母ではわかってきているがほ乳類では明らかではなかった。我々はインプリント遺伝子の１つの U2af1−rs1 が cosuppression という RNAi 機構と密接に関係した現象を起こすことをみいだしており、ほ乳類においても RNAi がインプリンティングをはじめとするエピジェネティク機構に関与するのではないかという仮説を考えた。そこで RNAi 機構の最重要要素の１つである Dicer1 遺伝子のノックアウトマウスの解析を試みた。予想に反してホモマウスが致死ではなかった。このマウスは Dicer1 遺伝子のエクソンをトラップするかたちで作製されていたが、完全にトラップされていないことが遺伝子発現の漏れにつながり結果として Dicer1 遺伝子の大幅に低下したマウスになっていたことがわかった。しかしマウスにおける Dicer1 遺伝子発現の大幅な低下はインプリント遺伝子のエピジェネティクな状態の維持、あるいはメスの生殖細胞におけるリプログラミングには影響がないことがわかった。また Dicer1 遺伝子の低下のマウスへの表現型の影響を調べたところ、ホモマウスの出生率の低下、神経系の異常が起こることがわかった。

（2）Ago2 ノックアウトマウスを用いたリプログラミング機構の解析

RNAi 機構のもう1つの重要な因子である Ago2 (Eif2c2)のノックアウトマウスの解析を試みた。その結果ホモマウスは出生せず、E3.5 では正常であるが E6.5 では明らかに異常であることがわかった。インプリント遺伝子の発現、メチル化を解析をおこなったが大きな異常はなく RNAi 機構はインプリンティングの維持にはあまり影響がないことがわかった。またその他、反復配列のメチル化を調べたが異常はないことがわかった。しかし一部の反復配列で発現上昇が DNA メチル化の変化なしにおこっていることがわかった。従ってほ乳類では RNAi 機構は DNA メチル化を介さない機構によりエピジェネティク機構をになっていることが示唆される。

（3）エピジェネティク情報の異常は生殖細胞でのリプログラミングに影響するか？

正常な状態ではほ乳類の生殖細胞はインプリント遺伝子のリプログラミングをおこなうことができる。しかしもしリプログラミングされる前の生殖細胞のインプリント遺伝子のエピジェネティク情報が異常であったらリプログラミングが正常におこるかどうかはこれまでわかっていなかった。そこでインプリント遺伝子が母性型のものしかない単為発生胚と正常胚のキメラを作製し、単為発生胚由来の生殖細胞でのインプリント遺伝子のリプログラミングを調べた。その結果はリプログラミングは正常におこりエピジェネティク情報の異常はリプログラミングに影響しないことがわかった。このことは単一の親由来の生殖細胞も正常にリプログラミングが起こることを示しており、同一性の交配が可能なことを示唆する。

（4）エピジェネティク情報の網羅的解析法の開発

エピジェネティク機構の研究をおこなううえでゲノム中のどのような遺伝子でこれらの情報の変化が起こっているかを把握することは重要である。そこでプロモーターマイクロアレイを作製し、ゲノム中の DNA のメチル化を正確に把握する Micraoarray-based Integrated Analysis by Isoschizomer (MIAMI)法を開発した。この方法では同じ認識部位を切断するメチル化感受性制限酵素 Hpa II とメチル化非感受性制限酵素 Msp I に対するゲノム DNA の感受性を比較することにより極めて正確にゲノムワイドな DNA のメチル化の解析をおこなうことができる。

5. 自己評価:

ほ乳類におけるエピジェネティク機構に RNAi 機構が関与するかどうかということは大きな注目の的となっている。RNAi の鍵となる遺伝子である Dicer1 の発現がかなり低下してもそれほど生命を維持していくことに影響ないということは驚くべき事である。このマウスにおいて Dicer1 を完全につぶせなかったのでこの遺伝子とエピジェネティク機構との直接の関係に対する答えはでなかっ

たが、逆に生きた状態を観察することができ神経系における働きなど今後の展開が期待される。

一方、Ago2 のノックアウトマウスにおいては遺伝子が完全に破壊され重特な発生異常が起こったが、エピジェネティク機構にはほとんど影響がなかったのは驚くべき発見であると考えられる。しかしながら一部の遺伝子で DNA のメチル化を介さず発現に影響があるというのは他の生物とはRNAi 機構の関与の仕方が異なることを示唆し、今後の研究につなげていきたいと考えている。

エピジェネティク情報の異常は生殖細胞でのリプログラミングに影響するかどうかという課題は単純な課題であるがこれまでにきちっとした検証はおこなわれていなかった。そこでエピジェネティク情報の異常は生殖細胞でのリプログラミングに影響ないという結論は今後、同一性のみによる交配技術など応用につながる成果であると評価できる。

エピジェネティク情報の網羅的解析法はこれからのエピジェネティク研究において重要になっており、今後多くの研究者により利用されこの分野の研究の発展に寄与すると期待できる。

6.　研究総括の見解:

エピジェネティック生物学がいわゆるポストゲノム解読期の重要課題として急速に浮上しつつある。ことは始まったばかりであり、当該研究者のゲノムインプリントに焦点をあわせたアプローチは先駆的な取り組みであり評価できる。思いがけない結果に次々と遭遇しながらも研究を着実に進めていることは評価する。問題はこれからの展開であり、期待したい。ゲノム DNA のメチル化解析に注目しての新しい解析法を開発したことは評価してよい。その波及効果はこれからであって見守りたいところ。ただ、エピジェネティックスの抱えている課題は RNAi レベルにとどまらず、より大きな広がりを見せつつある。当該研究者の本分野での先駆者としての優れた活躍を期待する。興味を分散させることなく、基本的に最重要な点の解明に取り組んで欲しい。

7.　主な論文等

論文

1. Sumiyo Morita, Takuro Horii, Mika Kimura, Takahiro Ochiya & Izuho Hatada
   An Argonaute family, Eif2c2 is essential for the development of early post-implantation embryo not for epigenetic silencing. (*submitted*).
2. Fukasawa M, Morita S, Kimura M, Horii T, Ochiya T, & Hatada I
   Genomic imprinting in Dicer1-hypomorphic mouse.***Cytogenetic & Genome Res***. (*in press*).
3. Hatada I, Fukasawa M, Kimura M, Morita S, Yamada K, Yoshikawa T, Yamanaka S, Sakurada A, Sato M, Endo C, Kondo T, Horii A, Ushijima T, & Sasaki H
   Genome-wide profiling of promoter methylation in human..***Oncogene*** (*in press*).
4. Fukasawa M, Kimura K, Morita S, Matsubar K, Yamanaka S, Endo C, Sakurada A, Sato M, Kondo T,

Horii A, Sasaki H, & Hatada I

Microarray analysis of promoter methylation in lung cancers. ***J Hum Genet*** (*in press*)

5. Horii T, Nagao Y, Kimura M, & Hatada I.

Normal Reprogramming of Imprinting in Parthenogenetic Female Germ Cells.. *Reprod. Fetil. Dev.* 17: 236, 2005.

6. Higashimoto K, Soejima H, Yatsuki H, Joh K, Uchiyama M, Obata Y, Ono R, Wang Y, Xin Z, Zhu X, Masuko S, Ishino F, Hatada I, Jinno Y, Iwasaka T, Katsuki T, & Mukai T. Characterization and Imprinting Status of OBPH1/Obph1 Gene: Implications for an Extended Imprinting Domain in Human and Mouse. ***Genomics***. 80:575-584. 2003.

総説

1. Abe K, Hiroyuki A, Beck S, Bulyk ML, Farnham P, Greally JM, Hatada I *et al.*

Applying whole-genome studies of epigenetic regulation to study human disease..*Cytogenetic & Genome Res.* (*in press*).

2. 畑田出穂, ゲノム的エピジェネティクス解析方法, ゲノム医学, 5: 481-487, 2005.

3. 尾畑やよい, 河野友宏, 畑田出穂、in vitro ゲノムインプリンティング確立システム, 細胞工学, 21: 1220-1221. 2002.

国際学会招待講演

1. Hatada I Microarray-based detection of DNA methylation. International Symposium on Genome-Wide Epigenetics,. 2005. 11.7.

2. Hatada I In vitro culture system for studying genomic imprinting. 6th European Meiosis Meeting. Obertraun, Austria. 2003. 9. 13.

国内招待講演 3件