

生殖細胞特異的な遺伝情報場の継承のメカニズムの解明

京都大学大学院 医学研究科 遺伝医学講座 分子遺伝学教室
篠原 美都

1. 背景と目的

遺伝子発現の異常はゲノムのDNA塩基配列情報の変化だけでなく、ヒストンのメチル化修飾などによるクロマチン構造変化でも起こる。しかしこれらのエピジェネティックな異常は生殖の発生過程において消去され、次世代には伝達されない。このことは生殖系列細胞において遺伝情報を正しく継承するための分子基盤が確保されていることを示唆している。ところが最近我々は、後述するようにマウスの雄性生殖細胞から試験管内操作後に作成した産仔において、インプリンティング遺伝子のメチル化の異常が数世代にわたって継承される事例を発見した。本研究はこの実験系を基に、生殖系列細胞の遺伝情報継承のメカニズムを解明することを目的に行った。

我々はマウス精子形成の源となる精子幹細胞の長期培養系を確立し、これをGermline Stem (GS) 細胞と名付けた(文献1)。生後精巣から樹立されたGS細胞は極めて安定な細胞であり、2年以上の培養によっても正常な核型を維持し、精巣内移植により精子形成し正常な子孫を産生する。ところが、この技術を胎生期の細胞に適用した場合、樹立された細胞(embryonic Germline Stem : eGS細胞)は、独特のエピジェネティック異常を伴っていることが明らかになった。eGS細胞はGS細胞と外見上非常に似ており、正常なDNAメチル化パターンを示し、精子形成能力を持つ点でも同じであるが、その子孫にインプリンティング遺伝子のDNAメチル化異常と体重異常が観察された。さらにこのDNAメチル化の異常は世代を超えて継続し、合計4世代までDNAメチル化の異常と体重異常が持続した(文献2)。

これまでもクローン動物や顕微授精で産まれた産仔についてインプリンティングの異常による発育異常は報告されているが、生殖細胞では胎生中期にインプリンティング遺伝子のメチル化の消去がなされた後、性特異的なメチル化が行われるため、次世代には異常が伝達しない。eGS細胞ではどのような因子がエピジェネティックな変異を世代を超えて伝搬しているのか明らかでないが、メチル化異常をともなうF4 世代から樹立したGS細胞が、メチル化の異常とともにインプリント領域のヒストン修飾を示すことから、ヒストン修飾の異常がこの現象の源となった可能性が示唆された。

我々はこの現象が、ヒストンやプロタミン、microRNAなどの物質が精子のゲノムとともに受精卵に持ち込まれ、それらを介して世代を超えて異常な遺伝子発現調節が伝達されるのではないかと仮説を立てている。eGS細胞にインプリント遺伝子周辺のヒストン修飾の異常とクロマチン修飾分子の発現異常があることから、本研究ではヒストン修飾の異常と精子幹細胞のインプリンティング遺伝子の発現制御機構の関わりを調べた。

2. 方法

1) GS細胞にてヒストン修飾の異常の誘因となる遺伝子の検索

本研究ではヒストン修飾の異常を持つeGS細胞、持たないeGS細胞、正常なGS細胞、もしくは異常

DNAメチル化をもつ個体から樹立されたGS細胞間での4種類の細胞のRNAレベルでの遺伝子発現をマイクロアレイ法にて解析した。特に発現差が観察されたRNAについて生後の個体から樹立されたGS細胞へ遺伝子導入を行いヒストン修飾やDNAメチル化の異常を誘導できるかを解析した。

2) ノックアウトマウスやRNAi法によるヒストン修飾酵素欠損eGS細胞、GS細胞の樹立

現在、ヒストン修飾酵素が多数同定されている。多くの場合、これらのヒストン修飾酵素の欠損個体は胎生致死の表現型をしめすために、これらの遺伝子をloxP配列で挟み込んだfloxed マウスが作製されている。本研究では*Ezh2*, *Suz12*などの遺伝子欠損マウス精巣からGS細胞の樹立を行った。アデノウイルスを用いたGS細胞への遺伝子導入法(文献3)を用いて、GS細胞もしくはeGS細胞においてこれらの遺伝子欠損を誘導し、DNAメチル化異常がおこるかどうかをCOBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) 法により解析を行った。

また、GS細胞のマイクロアレイデータをもとに、発現レベルの高いヒストン修飾遺伝子を候補として選び、shRNAによるノックダウンを行い、COBRA法にてDNAメチル化異常の有無を調べた。

3) eGS細胞の樹立ステージの拡大

我々はこれまでに胎生12.5日以降のマウスからeGS細胞の樹立に成功した。しかしながら生殖細胞は胎生期7日には存在しており、その発生直後から劇的なヒストン修飾の変化が観察されることから、より早期の生殖細胞から樹立すれば違った表現系を持つeGS細胞を得られると期待される。本実験では培養条件の改善により(文献4)、胎生期8.5-11.5日のPrimordial germ cell (PGC)からのeGS細胞の樹立を試みた。精子幹細胞の自己複製因子であるGlial cell line –derived neurotrophic factor (GDNF)、Fibroblast Growth Factor-2 (FGF2)の存在下で培養を行い、樹立された細胞について Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)法やフローサイトメトリーにより遺伝子発現パターンを調べるとともに、インプリンティング遺伝子のメチル化の異常の有無をCOBRA法にて調べた。また、レンチウイルスにより *Enhanced green fluorescent protein (EGFP)* 遺伝子を導入した後、内因性の精子形成の欠損したWマウスの精巣内に移植し、コロニー形成の有無を調べた。

3. 結果

1) GS細胞にてヒストン修飾の異常の誘因となる遺伝子の検索

マイクロアレイの結果から、我々はGS細胞で強く発現していて、eGS細胞では発現していない*pdxdc*遺伝子をマイクロアレイで同定し、その実際の発現もreal time PCRにより確認することができた。一方で、eGS細胞で発現が強く、GS細胞で発現が認められない*mir125*もmicroRNAアレイにより同定することができた。現在、これらの遺伝子の強制発現およびノックダウンによる遺伝子発現の減少が*H19*の遺伝子発現およびDNAメチル化に影響しうるか否かを検討している。

2) ノックアウトマウスやRNAi法によるヒストン修飾酵素欠損eGS細胞、GS細胞の樹立

マイクロアレイのデータをもとにGS細胞で発現の高いヒストン修飾遺伝子を28個候補として選び、それぞれレンチウイルスを用いてshRNAによるノックダウンを行い、GS細胞への影響を調べた。COBRA法にて調べたところ、*H19*や*Igf2r*などGS細胞のインプリンティング領域のメチル化に変化を起こすものはなかったが、*Ash11*, *Ash21*, *Jarid2*, *Ehmt1*, *Setd2*, *Setd3*, *Chd1*遺伝子ノックダウンではGS細胞の増殖や生存に影響を及ぼした。特に生存に影響を及ぼす候補遺伝子については、その細胞死が*p53*に依存するものか否かを調べるため*p53*欠損GS細胞に同遺伝子のノックダウンを行った。その結果、こ

これらの遺伝子中 *Chd1* については、細胞死をレスキューすることができた。これは *Chd1* による細胞死が *p53* 遺伝子依存性に起こることを強く示唆する。しかしながら、この *Chd1* 遺伝子をノックダウンされた *p53* 欠損GS細胞においてH19のDNAメチル化を調べてみたが、特に変化は見られなかった。

3) eGS細胞の樹立ステージの拡大

これまでに用いてきた培地では胎生12.5日以降のPGCからのみeGS細胞の樹立が可能であった。これを改変することにより(文献4)、胎生8.5-11.5日のPGCの培養を行った。樹立された細胞についてRT-PCR法やフローサイトメトリーにより遺伝子発現パターンを調べるとともに、COBRA法にて調べたインプリンティング遺伝子のメチル化の異常の有無を調べたが、培養細胞においては胎生12.5日以降のPGC由来のものと類似した結果が得られた。しかしながら樹立ステージが異なることにより、産仔の遺伝子発現に異なった影響を及ぼす可能性があるため、現在樹立された細胞にレンチウイルスによりEGFP遺伝子を導入した後、Wマウスの精巣内に移植し、コロニー形成の有無を調べている。

4. まとめ

遺伝情報を正確に次世代に継承するために、生殖細胞は特有のクロマチン制御機構を持つと考えられているが、生殖細胞においてその機構の破綻のモデルとなる実験系はこれまで無かった。eGS細胞を用いた実験系はin vitroで増殖可能な細胞であることから、生化学的な解析もしやすく、生殖細胞特異的な遺伝情報継承のメカニズムの解明に役立つと考えられる。

本研究ではヒストン修飾遺伝子と eGS細胞に見られるような生殖細胞の遺伝子発現制御の破綻の関連を調べた。ヒストン修飾遺伝子の中にインプリンティング遺伝子のメチル化には異常を起こすものは見つかっていないが、一部の遺伝子はGS細胞の増殖に影響することが分かった。今後これらの遺伝子の作用について更に調べるとともに、ヒストン修飾とともにeGS細胞の遺伝子発現異常を媒介する因子の候補と考えられるmicroRNAについても、関与を調べていく予定である。

胎生期の生殖細胞でも精巣内に移植すると精子に分化し、産仔を作成できることを我々は2005年に報告している(文献5)。この場合に産まれた産仔はeGS細胞によるものとは異なり、インプリンティング遺伝子の異常は見られなかった。このことは同じPGCであったも精巣内と試験管内のどちらかで成熟したかにより、エピジェネティックな修飾に深刻な違いが生じることを示唆している。今後の研究では精巣の体細胞がどのような形で生殖細胞特異的な遺伝情報継承のメカニズムの獲得に関わっているかについても明らかにしていきたい。

5. 参考文献

- 1) Kanatsu-Shinohara M., et al. *Biol. Reprod.* 2003; 69:612-616.
- 2) Lee J., et al. *Biol. Reprod.* 2009; 80:518-527.
- 3) Takehashi, M., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104, 2596-2601.
- 4) Kanatsu-Shinohara M., et al. *Biol. Reprod.* published 15 Sep 2010; PMID:20844279.
- 5) Chuma S., et al. *Development* 2005; 132:117-122.