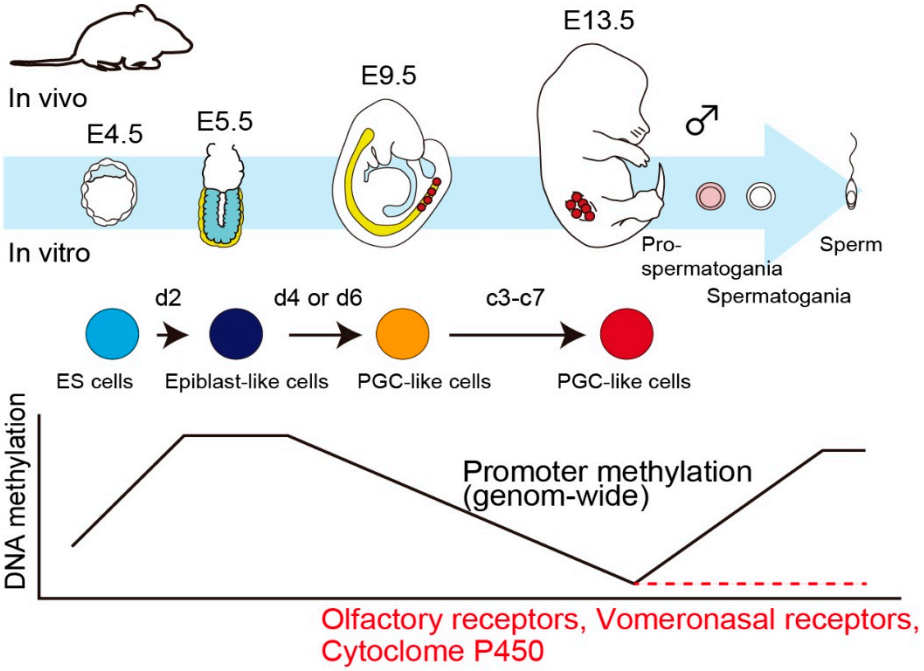
37　機能ゲノム部位の「世代間エピゲノム継承機構」の解析	栗本　一基

【目的】ゲノム情報は親から子へと伝達され生命の連続性を担保するが、哺乳類ではDNAのメチル化など後成的に付与された情報（エピゲノム）はほとんど遺伝しない。これは、配偶子の起源である始原生殖細胞（primordial germ cell : PGC）におけるエピゲノムの消去と、その後の再構築からなる初期化機構による（エピゲノムリプログラミング）。PGCにおけるDNAメチル化消去は、メチル化維持に必須の遺伝子Uhrf1の発現抑制による受動的な機構によると考えられる。本研究の目的は、PGCの体外再構成および増殖システムを用いて、遺伝子プロモーターを含む機能ゲノム部位の世代間継承メカニズムを解明することである。

【方法】マウスにおいては、PGC形成過程でゲノムDNAのメチル化が消去された後、雄では前精原細胞の分化にともなってゲノムワイドに再度メチル化を受ける。この再メチル化過程でのメチル化されにくく、低メチル化状態を維持するゲノム部位は、リプログラミング過程が異常であった場合に最も影響を受けやすいゲノム部位であると予想される。本研究ではまず、体外培養系および胚体内のPGC、前精原細胞におけるゲノムワイドなDNAメチル化および遺伝子発現データを解析し、PGC形成過程で脱メチル化されるが、前精原細胞では再メチル化されず低メチル化状態を維持するプロモーターを同定した。

【結果】上記の条件に合致するプロモーター（PGCで脱メチル化され前精原細胞で低メチル化状態を維持するプロモーター）は1,081個同定され、嗅覚受容体、鋤鼻受容体、シトクローム P450構成因子など、重要な機能カテゴリーに属する遺伝子が有意に濃縮していた。これらの遺伝子はPGC発生過程では全く発現しておらず、プロモーターの低メチル化は次世代における発現のために準備されたものである可能性があり興味深い。また、初期胚においてUhrf1タンパク質の分解に関わることが知られているPramel7は、意外なことにPGCにおいて全く発現が検出されなかった。その一方で、PRAMEファミリーに属する別の遺伝子*Pramel1*の発現はPGC発生過程で上昇しており、PGCにおけるUhrf1の転写後制御に関与する可能性があり、その機能検証は興味深い。

雄性生殖細胞への分化において低DNAメチル化状態を維持するプロモーター群の同定



37. 機能ゲノム部位の「世代間エピゲノム継承機構」の解析

栗本　一基

*京都大学 大学院医学研究科 生体構造医学講座 機能微細形態学分野

Key words：DNA メチル化，始原生殖細胞，エピゲノムリプログラミング

緒　言

ゲノム情報は親から子へと伝達され生命の連続性を担保するが、哺乳類では DNA のメチル化など後成的に付与された情報（エピゲノム）はほとんど遺伝しない。これは、配偶子の起源である始原生殖細胞（primordial germ cells：PGC）におけるエピゲノムの消去と、その後の再構築からなる初期化機構による（エピゲノムリプログラミング）。一方で、父母の環境曝露が代謝などの生理的形質として子孫に伝達されることもよく知られており、世代間の継承機構が存在すると考えられている。伝達因子の候補として DNA メチル化が有力視され、PGC における主要な消去機構は、DNA メチル化維持に必須な因子である Uhrf1 の発現量が減少し、DNA 複製において新規合成された DNA 鎖にメチル化が付与されないことであると考えられている。世代間エピゲノム継承は、栄養源など環境曝露による子孫の形質変化などが盛んに解析されてきた一方で、世代間での継承過程の多くはブラックボックスである。この要因の一つとして、プロモーターなど、反復配列以外の機能ゲノム部位における修飾が、生殖細胞形成過程、特に PGC 発生過程においてどのような動態を示すのか（どのようにメチル化情報が消去されていくのか）、および、DNA メチル化消去過程に異常がある場合に、異常が次世代に継承されうる部位がどこであるかが明確ではなかったことが挙げられる。また、DNA メチル化消去過程の異常を効率よく人為的に引き起こして、異常の起きる過程を詳細に調べることも困難であった。報告者を含むグループは、多能性幹細胞から PGC を誘導し、さらにこれを増殖して、エピゲノムリプログラミングを完遂させることができる体外培養系を構築した［1，2］。本研究では、この系におけるリプログラミングと、体内の始原生殖細胞形成過程、また前精原細胞への分化過程を解析して、リプログラミング異常が次世代に継承されやすいと考えられる部位を同定すること、さらに、Uhrf1 の発現量を人為操作してリプログラミングに摂動を与え、世代間エピゲノム継承の詳細な解析を可能とすることを目的とする。

方法および結果

1.　PGC におけるエピゲノムリプログラミングと、前精原細胞分化過程における DNA メチル化動態

マウス PGC は発生 7 日ごろに着床後胚のエピブラスト（epiblast）を起源として出現し、発生 13.5 日までに内在性レトロウィルスを含む反復配列など一部例外を除き、全ゲノムレベルで DNA メチル化を消去する。一方、生殖巣（精巣・卵巣）の体細胞は発生 12 日目ごろから雌雄それぞれに特異的な性分化を開始し、その影響のもと PGC も発生 12.5 日ごろには遺伝子発現に明白な性的二型を示す。その後、生殖細胞は雌雄それぞれの配偶子への分化を続け、雄性生殖細胞は前精原細胞（prospermatogonia）、雌性生殖細胞は一次卵母細胞（primary oocyte）へと分化する。卵母細胞は全体として低メチル化状態を継続するが、前精原細胞は反復配列を除くゲノム全体で急激なメチル化を開始し、後に反復配列が piRNA による特異的な機構によってメチル化される。

一連の過程において、エピブラストで高度にメチル化され、発生 13.5 日の PGC で十分に脱メチル化し、その後、前精原細胞への分化過程でメチル化が再獲得されない/再獲得されるのが遅いゲノム部位は、不十分な脱メチル化によってメチル化レベルが高いまま維持された場合に遺伝子発現などの機能的な影響を与えやすいと考えられる。そこで、多能性幹細胞（胚性幹細胞 embryonic stem cells：ESCs）からエピブラスト様細胞（epiblast-like cells）を介し凝集培養の中で誘導した PGC 様細胞（PGC-like cells）を、さらに平面培養で増殖させた一連の細胞における DNA メチル化

*現在の所属：奈良県立医科大学 発生・再生医学講座

［2，3］、発生 9.5～13.5 日の胚内の PGC［4，5］、発生 16.5 日の前精原細胞における DNA メチル化 データ［5］（post bisulfite adaptor tagging : PBAT により定量）から、全遺伝子のプロモーターのメチル化率を抽出した（図 1a）。上記のメチル化動態を示す遺伝子を抽出するため、エピブラストにおけるメチル化率が 75%以上かつ、DNA メチル化を完遂した d4c7-PGC-like cells（4 日の凝集培養における誘導後[d4]、平面培養で 7 日間増殖させた[c7]PGC-like cells）、発生 13.5 日 PGC、発生 16.5 日の前精原細胞の 3 細胞種の全てにおいてメチル化率 10%未満となる遺伝子を探索した。

この条件を満たす遺伝子は 1,081 個同定され、ウェブベースの解析プログラム DAVID 6.8 による gene ontology（GO）解析の結果、嗅覚受容体（Olfr 遺伝子群）、鋤鼻受容体（Vmn 遺伝子群）、免疫グロブリン遺伝子群が突出して高い濃縮率を示した（図 1c）。特に嗅覚受容体遺伝子は解析に含めた 1,115 個の内 241 個（22%）、鋤鼻受容体は 324 個の内 25 個（8%）が含まれており、遺伝子ファミリー全体として、このカテゴリーに含まれるメチル化動態を示すことがわかった。また、これらの突出した濃縮を示す遺伝子群を除去した GO 解析では、Toll 様受容体を含む自然免疫や炎症に関わる遺伝子群（GO:0042535、GO:0045087）、アラキドン酸の代謝（エポキシゲナーゼ経路）に関わるシトクローム P450 複合体の構成因子（GO:0019373）が有意に濃縮されていた（図 1d）。

次にこれらの遺伝子の正常な発生過程での脱メチル化が、直接遺伝子発現の制御に関わりうるか否かを解析した。体外培養系におけるエピゲノムリプログラミング過程［2］および、胚内の PGC 発生過程（発生 9.5～13.5 日）［1，6］を RNA-seq 解析し、エピブラスト様細胞と比較して、ゲノムワイドな発現動態に対する相対的な発現量を検討した。ゲノムワイドな遺伝子発現パターンは既報の通り、PGC および体外培養系のいずれにおいても DNA メチル化消去の影響をほとんど受けておらず、また上記のプロモーターメチル化カテゴリーに属する遺伝子についても、Ribosomal Protein L39 Like（Rpl39l）を除き、有意な遺伝子発現変動を示さなかった。

2. Uhrf1 関連因子および、Uhrf1 タンパク質の分解に関する因子の発現動態

Uhrf1 は PGC の発生直後から発現抑制を受け、継続的に発現レベルが低下し続ける。一方、Uhrf1 は初期胚や ES 細胞において、Preferentially Expressed Antigen in Melanoma like7（Pramel7）を介した経路で、プロテアソームにおける分解による制御を受けることも報告されている［7］。従って、体外培養系および PGC における Uhrf1 結合因子（Uhrf1bp1、Uhrf1bp1l）および、PRAME ファミリー遺伝子群の発現動態を解析した。

Uhrf1 の発現レベルは既報のとおり PGC 発生過程の初期から発生 11.5 日までは継続的な減少を示したが、性分化を始める発生 12.5 日以降は逆に増加に転じた。一方、Uhrf1bp1 はほぼ一定の発現レベルを示し、Uhrf1bp1l は低いレベルの発現量を維持した（図 2）。

PRAME ファミリー遺伝子群は PGC 発生過程を通して低い発現量にとどまった。意外なことに初期胚における Uhrf1 の分解に寄与する Pramel7 も、極めて低い発現量にとどまっていた。ES 細胞における発現量は、Uhrf1 のわずか 1/500 程度であり、体外培養系では検出限界付近でかろうじて検出されるが、胚体内の PGC においては検出されなかった。一方で、他の PRAME ファミリー遺伝子の中で、*Pramel1* は、ES 細胞では検出限界以下であったが、PGC の体外培養系では発生の進行に伴い発現量が増加し、胚体内の PGC においてはさらに高い発現量を示し、特に Uhrf1 の発現量が増加に転じる発生 12.5 日と 13.5 日においては最も高い発現レベルに達した。この発現レベルは同じ発生ステージの Uhrf1 の概ね 1/2 程度であった。すなわち、*Pramel1* は、発生初期には Uhrf1 に対して相補的な、後期には Uhrf1 と相同の発現動態を示す（図 2）。

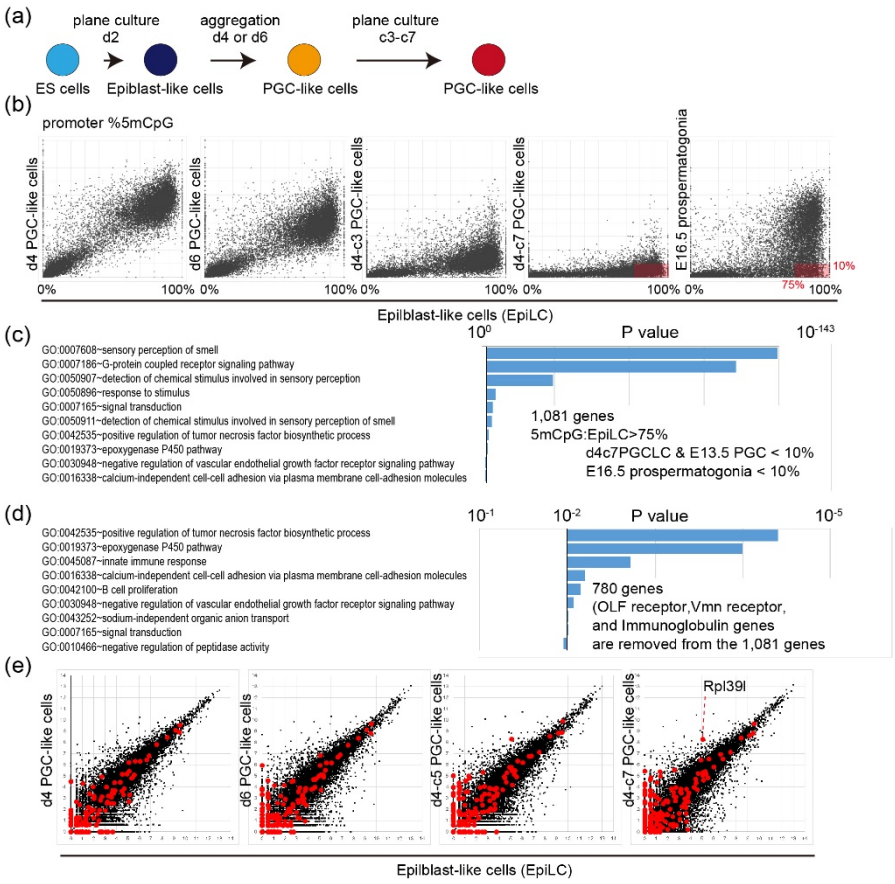


図 1. PGC と前精原細胞の DNA メチル化動態

a) PGC 様細胞の体外培養系のスキーム。

b) プロモーターにおける DNA メチル化レベル。エピブラスト様細胞を横軸に示す。

c) PGC リプログラミング過程での脱メチル化が前精原細胞で維持されるプロモーターの GO 解析。

d) c) から嗅覚受容体、鋤鼻受容体、免疫グロブリンを除いた遺伝子群の GO 解析。

e) c) で解析した遺伝子群（b で赤色掛で示される）の遺伝子発現パターン。

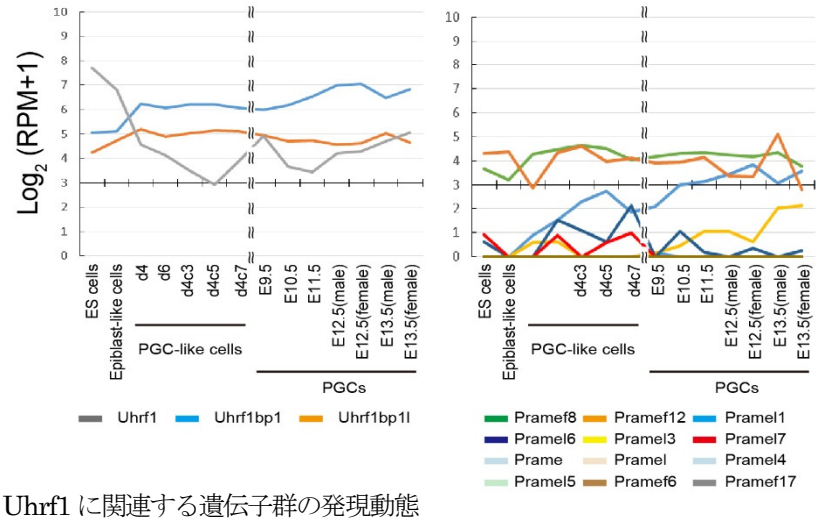


図 2. Uhrf1 に関連する遺伝子群の発現動態

Uhrf1、Uhrf1bp、Uhrf1bpl を左パネルに、PRAME ファミリー遺伝子群を右パネルに示す。各パネルの左側に体外培養系を、右側に胚体内の PGC を示す。

考　察

本研究ではエピゲノム情報（DNA メチル化）の世代間継承に関与しうるプロモーターの同定と、Uhrf1 の代謝に関与しうる遺伝子ファミリーの発現動態解析を行った。PGC におけるリプログラミング過程で脱メチル化されつつ前精原細胞への分化過程で再メチル化されない遺伝子は、リプログラミングが不十分であった場合にメチル化率が高いまま次世代に引き継がれるリスクが大きいと考えられる。機能的な遺伝子カテゴリー（嗅覚受容体、鋤鼻受容体）がまとまって、このような遺伝子群に含まれることは興味深い。また、シトクローム P450 は、細胞膜に含まれる脂肪酸アラキドン酸からエポキシエイコサトリエン酸を含む生理活性物質を産生する代謝経路（エポキシゲナーゼ経路）で機能する酵素であり、その構成因子（Cyp2a22、Cyp2c44、Cyp2c68 等）が含まれることは、PGC におけるリプログラミング異常がこれらの代謝経路に影響する可能性を示唆している。これらの遺伝子は成体においては肝臓で最も高い発現を示すが、PGC ではほとんど発現しておらず、プロモーターでのメチル化レベルが低く抑えられる意義は、受精後の発生過程における発現に備えたものであると考えられる。現在、これらのプロモーターにおける Uhrf1 の過剰発現の影響を調べるため、Rosa26 部位からの過剰発現系を構築しており、Uhr1f の mRNA の発現に成功している。しかしながら Uhrf1 の過剰発現は、それ自体が PGC における遺伝子発現パターンに影響することも示唆される結果を得ており、より精度の高い発現量調整が必要である。また、本研究では、Uhrf1 のタンパク質代謝に関わる Pramel7 のファミリー遺伝子群の発現を検討した。Pramel7 の発現量は極めて低く、これが Uhrf1 タンパク質の代謝に寄与するかどうかは検証の価値がある。また同じファミリーに属する Pramel1 が Uhrf1 の動態に対応した興味深い発現変化を示しており、遺伝子破壊などによる機能検証が興味深い。

共同研究者・謝辞

本研究は主に京都大学大学院医学研究科機能微細形態学（斎藤通紀教授）で行った。共同研究者は、斎藤通紀教授、大田浩准教授、学部生の笹田大道氏である。この場を借りて深く感謝申し上げます。

文　献

1) Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. Cell. 2011;146(4):519-32. Epub 2011/08/09. doi: S0092-8674(11)00771-9 [pii]

2) Ohta H, Kurimoto K, Okamoto I, Nakamura T, Yabuta Y, Miyauchi H, et al. In vitro expansion of mouse primordial germ cell-like cells recapitulates an epigenetic blank slate. EMBO J. 2017. doi: 10.15252/embj.201695862. PubMed PMID: 28559416.

3) Shirane K, Kurimoto K, Yabuta Y, Yamaji M, Satoh J, Ito S, et al. Global Landscape and Regulatory Principles of DNA Methylation Reprogramming for Germ Cell Specification by Mouse Pluripotent Stem Cells. Dev Cell. 2016;39(1):87-103. doi: 10.1016/j.devcel.2016.08.008. PubMed PMID: 27642137.

4) Seisenberger S, Andrews S, Krueger F, Arand J, Walter J, Santos F, et al. The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. Mol Cell. 2012;48(6):849-62. Epub 2012/12/12. doi: 10.1016/j.molcel.2012.11.001.. PubMed PMID: 23219530; PubMed Central PMCID: PMC3533687.

5) Kobayashi H, Sakurai T, Miura F, Imai M, Mochiduki K, Yanagisawa E, et al. High-resolution DNA methylome analysis of primordial germ cells identifies gender-specific reprogramming in mice. Genome Res. 2013;23(4):616-27. Epub 2013/02/16. doi: gr.148023.112 [pii]
10.1101/gr.148023.112. PubMed PMID: 23410886; PubMed Central PMCID: PMC3613579.

6) Kagiwada S, Kurimoto K, Hirota T, Yamaji M, Saitou M. Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. Embo J. 2013;32(3):340-53. Epub 2012/12/18. doi: emboj2012331 [pii] 10.1038/emboj.2012.331. PubMed PMID: 23241950; PubMed Central PMCID: PMC3567490.
7) Graf U, Casanova EA, Wyck S, Dalcher D, Gatti M, Vollenweider E, et al. Pramel7 mediates ground-state pluripotency through proteasomal-epigenetic combined pathways. Nat Cell Biol. 2017;19(7):763-73. doi: 10.1038/ncb3554. PubMed PMID: 28604677.