

学位論文要約 畑中勇輝

近年のリプログラミング研究により、体細胞はリプログラミングされることで分化多能性を有する Induced Pluripotent stem (iPS) 細胞に誘導されることが明らかになった (Yamanaka et al., 2006)。iPS 細胞は体を構成するほぼあらゆる細胞や器官へと分化できる能力を有することから、再生医療分野や不妊治療などの医学分野への大きな貢献が期待されている。しかしながら、現在の iPS 細胞の作製方法では、強制的な遺伝子発現により誘導されるため、発癌のリスクが高いことや誘導効率が非常に低いことが原因で、臨床応用には至っていない。さらに、体細胞によってエピジェネティックな修飾が異なるため、誘導された iPS 細胞の不均一性の存在が報告されている。これらのことから、エピジェネティックリプログラミング機構を理解することは、これら問題点を解決するためには重要な課題となっている。生体内において、エピジェネティックリプログラミングが行われる細胞として、生殖細胞が挙げられる。特に、エピジェネティックリプログラミングがダイナミックに起きる時期は、受精直後と PGC 形成過程であり、このリプログラミングが引き起こされた細胞は、受精卵では分化全能性を有し、PGC においてはエピジェネティックリプログラミングに伴い、潜在的分化多能性を獲得することが明らかになっている (Matsui et al., 1992)。以上のことから、生殖サイクルにおけるエピジェネティックリプログラミング機構を理解することは、分化全能性や分化多能性の獲得の理解だけでなく、iPS 細胞を誘導するための効率的な誘導方法の確立が期待でき、基礎生物学だけでなく医学分野への貢献に繋がることを考えられる。そこで本研究では、エピジェネティックリプログラミングがダイナミックに起こる受精直後で特徴的な発現パターンを示す生殖細胞特異的発現遺伝子 GSE に着目して、受精直後及び PGCs における GSE タンパク質の機能解析を行った。

まず第 2 章では、受精直後における GSE の機能解析を行った結果、GSE はエピジェネティックリプログラミングの一つである DNA 脱メチル化に関与していることが明らかになった。まず、GSE 遺伝子がどれくらいの種で保存されているかを調べた。その結果、GSE は広範な生物種で保存された機能を有している可能性が考えられた。GSE タンパク質は受精直後の前核期から核内に局在していることが示されていることから (Mizuno et al., 2006)、GSE タンパク質は前核期のどのステージから局在しているのかについて検討した。その結果、GSE は DNA 脱メチル化が起こる直前の PN2 期から雌性及び雄性前核で局在していることが明らかになった。この局在で、GSE はクロマチン構造に結合しているか調べた。その結果、GSE は雄性前核のみ PN2 からクロマチンに結合していることが示された。また、GSE はヒストン H3 や H4 と直接的に相互作用していることが示された。次に、この時期において GSE タンパク質の機能を明らかにするために、GSE タンパク質ノックダウン (GSE-KD) が DNA 脱メチル化に及ぼす影響について調べた。まず、GSE-KD 胚における 5mC 及び 5hmC の蛍光免疫細胞化学的解析を行った。その結果、GSE-KD 胚は、PN3

期から開始する 5mC の低下と 5hmC の増加が抑制されていることが明らかになった。さらに、この結果を個々の遺伝子レベルで明らかにするために、この時期に脱メチル化が報告されている Line1、Lem1、Nanog、Oct4 の CpG 領域におけるバイサルファイト解析を行った。その結果、GSE-KD 胚では、これら遺伝子領域のメチル化が抑制されていることが明らかになった。最後に、この高レベルなメチル化状態は 5mC から 5hmC への変換が抑制されているためであることを証明するために、Line1 ゲノム領域における 5mC 抗体及び 5hmC 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (MeDIP 及び hMeDIP)を行った。その結果、GSE-KD させた胚では、未処理区胚と比べて、Line1 ゲノム領域の 5mC レベルは有意に高く、5hmC レベルは有意に低いことが明らかになった。以上のことから、GSE は受精直後の胚において 5mC から 5hmC への変換により起こる DNA 脱メチル化に関与していることが明らかになった。最近の知見で、受精直後にこの変換を制御しているタンパク質は TET3 であることが知られている (Gu et al., 2011)。しかしながら、TET3 タンパク質が男性ゲノムにリクルートされる機構や、リクルートされるための特定のヒストン修飾マークが存在しているのか明らかになっていない。

そこで第 3 章では、受精直後の DNA 脱メチル化機構において GSE がどのような分子機序により関与しているのかを明らかにするために、まず、酵母 two-hybrid スクリーニングによる GSE タンパク質の相互作用するタンパク質の探索を行った。その結果、GSE タンパク質は、新規遺伝子(GSE interacting protein; GIAP)及びコアヒストンと相互作用していることが明らかになった。GIAP について機能を予測するためにアミノ酸配列解析を行ったところ、GIAP はメチル化活性ドメインを有し、さらに相同性解析では、GIAP はメチル化活性をもつタンパク質の中でも PRMT ファミリーと相同性があり、分子進化解析では PRMT ファミリーの type II と近く、アライメント解析では、PRMT ファミリーで保存されたモチーフを有していることが明らかになった。そこで、GIAP が PRMT 活性を有しているか調べるために、リコンビナント GIAP タンパク質を作製し、PRMT 活性を測定した。アルギニンリッチなペプチド (RGRGRGRGRGRGRG)を用いた活性測定の結果、GIAP はアルギニン残基をメチル化していることが示された。さらに、GIAP はヒストン H3 を基質とし、さらに前核期胚で修飾レベルが上昇すると知られている H3R17 のジメチル化 (Sarmiento et al., 2004)されることが *in vitro* の実験から認められた。そこで、前核期において詳細な局在を調べるために、GIAP と H3R17me2 の蛍光免疫細胞化学的解析を行った。その結果、GIAP タンパク質のシグナルは細胞質と核に局在することが観察された。また H3R17me2 シグナルレベルは、DNA 脱メチル化が起こる直前で認められ、GSE が男性クロマチンへ結合する時期である PN2 期において、そのシグナルが蓄積することが明らかになった。さらに、PN2 期における GIAP のクロマチン結合解析では、男性クロマチンへの結合が確認された。以上のことから、前核期胚の DNA 脱メチル化される時期において、GSE は GIAP と相互作用し、H3R17me2 修飾が増加していることが示された。*in vitro* において GIAP は H3R17 を基質とすることから、前核期における H3R17me2 レベルの上昇

は、GSE と相互作用する GIAP によるものである可能性が考えられた。今後、GIAP や H3R17me2 修飾が DNA 脱メチル化機構に及ぼす影響について調べる必要がある。

第 4 章では、PGCs における GSE の発現プロファイルを調べるために、まず、着床後胚における GSE mRNA の発現解析を行った。その結果、GSE mRNA は着床後 E7.5 から雌雄胎子で発現が認められることが明らかになった。マウスにおいて E7.5 は PGCs が出現する時期であることから、次に、胎子において GSE mRNA の局在を明らかにするために、E9.5 及び E10.5 胎子における GSE mRNA の *in situ hybridization* 解析を行った。その結果、GSE mRNA は PGCs で発現が確認できた。次に、PGC 形成過程の E7.5 から E11.5 における GSE タンパク質の発現解析を行った。その結果、GSE はその発現プロファイルに性差が存在し、雄胎子では E7.5 と比較して、E9.5 から E11.5 で有意に高い発現が認められたが、雌胎子では E7.5 から E11.5 胎子通して有意な差は認められなかった。さらに、PGC 形成過程の E7.5 から E11.5 における GSE タンパク質の局在解析を行った。その結果、GSE は雌雄胎子ともに PGCs で局在が認められ、核内でシグナルが認められた。最後に、PGCs において GSE がクロマチン構造に結合しているか明らかにするために、E11.5 gonad を単細胞化した PGCs における GSE のクロマチン結合解析を行った。その結果、雌雄ともに GSE はクロマチンに結合していることが示された。以上のことから、GSE は PGCs においても発現が認められ、さらに DNA 脱メチル化時期である E11.5 においてクロマチンに結合していることが明らかになった。このことは、GSE が PGCs における DNA 脱メチル化に関与し、さらにいまだ明確でない PGCs における DNA 脱メチル化機構が 5mC から 5hmC への変換による機構を介しているという可能性が考えられる。

生殖サイクルにおいて引き起こされるエピジェネティックリプログラミングの一つである DNA 脱メチル化の時期は受精直後と PGCs である。様々な細胞から iPS 細胞を作製した際の DNA メチル化状態の不均一性や、体細胞クローン胚の高レベルな DNA メチル化状態などは、依然、作製効率の観点で問題となっている。本論文の研究結果は、エピジェネティックリプログラミング機構の解明に繋がるのみならず、これら問題を解決する糸口になると考えられる。

以上