

体細胞クローン胚における DNA のメチル化制御機構の解明とその評価

高橋昌志・阪谷美樹・山中賢一

農研機構九州沖縄農業研究センター

要 約

体細胞クローン牛の報告が成されて以降、10年を超え、その作成手法や胚発生効率向上の研究が全世界で実施されてきている。我が国においても国公立研究機関、民間や大学で精力的に遂行されている。特に、我が国のクローン研究は他の国とは異なり、乳肉生産を最終目的として、その実施が成されており、これまでに600頭近い産子個体の作出数が報告されている。しかしながら、その作出効率は依然として低く、「安心安全」を求める消費者への理解は未だ遠いという状況にある。体細胞クローン個体作出効率向上は、実験動物も含めてその基礎的研究が進んでおり、新たな局面からのアプローチが待たれるところである。近年、体細胞クローン研究において、分化した体細胞をドナーとすることで、通常受精を経た初期胚に見られるようなゲノムの初期化が十分に起こらないために、正常な遺伝子調節が成されていないことがその原因の一つとしてとらえられている。この不全現象を「後性的遺伝子修飾機構：エピジェネティクス」の観点からDNAの修飾・発現機構不全を解明、評価、および制御することで、より受精胚に近い発生・分化条件を整える研究が期待される。本稿では、クローン胚のエピジェネティクス機構をDNAのメチル化の観点から検出し、その状況を評価することと共に、メチル化制御に関与する因子を制御する手法としてのRNA干渉を用いた新たな調節技術研究の知見についての紹介を行う。

キーワード：体細胞クローン胚、メチル化、DNAメチル基転移酵素、RNA干渉

1. はじめに

1997年の体細胞クローン羊「ドリー」誕生以降、核移植技術の飛躍的な発展により国内においても体細胞クローン産子の産生例が数多く報告されている。しかしながら、移植した際の低受胎率、胎盤形成異常、死産あるいは分娩後の死亡等の問題が依然として残されており（図1）、体細胞クローン産子の安定的生産のためには、解決すべき点は少なくない。クローン胚における低受胎率、発育不全等の問題の原因を解明する場合、核移植によって導入されたドナー細胞由来の遺伝子情報および機能が通常に働くか否かの検証がポイントの一つであると考えられる。クローン動物も含めた個体発生に関わる研究分野において、エピジェネティクスという研究領域が近年注目されている。このエピジェネティクスとは「DNA配列の変化を伴わずに子孫や娘細胞に伝達される

遺伝子機能の変化と、この現象を探求する学問」と定義されている（牛嶋と服部 2008）。遺伝子はその機能を発揮するには、その発現の調節が必要である。クローン胚発育の問題点の一つとして考えられる点としては、本来であれば、受精、初期発生を介して分化したゲノム情報がリセットされ、細胞増殖・分化が進むにつれて組織分化に向けての新たな遺伝子発現が起こるところ、核移植により導入されたDNA情報により、本来の遺伝子機能が十分に機能し得ていないことに起因するところが多いとみられる。このDNA配列変化を伴わない遺伝子発現調節の観点から、クロマチンの構造及びDNAのメチル化修飾が組織や細胞特異的な制御に大きく関与することが近年の研究により明らかになりつつある。本項では、クローン胚のメチル化調節に関わる因子の一つであるメチル基転移酵素の発現制御とメチル化状態の検出についての紹介を行う。

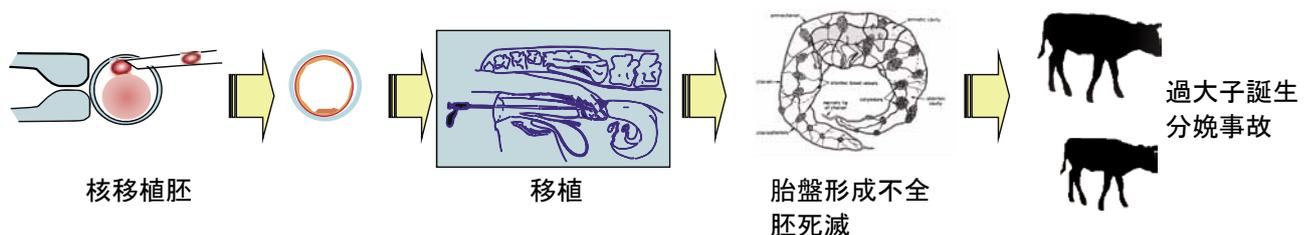


図1. 核移植による産子生産の課題点

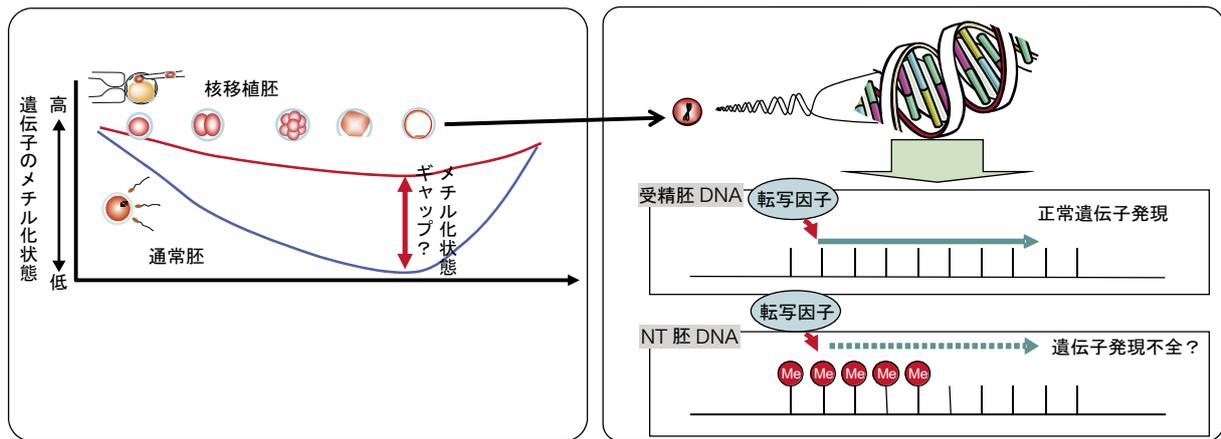


図2. 核移植胚発生時のメチル化状態変化とメチル化修飾による遺伝子発現調節模式図

2. DNA のメチル化制御機構と遺伝子発現制御

真核生物のゲノム中では構成塩基のうち、シトシンにメチル基が修飾された5メチルシトシンがゲノム DNA の機能を制御する生理的に重要な役割を担っている部位として知られている。DNA 配列中では、CG の2塩基が並んだ部位のシトシンについて5メチルシトシンの修飾がなされ、「CpG アイランド」と呼ばれる。CpG アイランドのメチル化は転写に関与しており、転写調節領域遺伝子には、非メチル化CpG アイランドが主に認められる。分化した組織では、組織特異的な CpG アイランドのメチル化による遺伝子発現制御がなされているが、哺乳動物の初期発生については、分化組織におけるメチル化制御とは異なるメチル化の大きな変動が見られることが知られている (Jaenisch 1997)。すなわち、受精後、初期発生の過程において、精子と卵子ゲノムが有するメチル化シトシンの大半が胚盤胞までに失われ、着床後細胞分化の進行に伴ってゲノムメチル化レベルが上昇する (図

2)。発生に伴う胚ゲノムメチル化状態の変動は、マウス、ウサギ、ウシ、ヒツジ胚で解析され、胚盤胞期に至ると発生に伴って減少したメチル化状態に部位特異的な変化が見られる。栄養膜細胞においてはメチル化が低い状態であるが、内部細胞塊では再メチル化が始まっており、内部細胞塊における分化開始の制御状態を反映していると考えられる (Dean ら 2001)。しかしながら、受精過程を経ず、核移植によって作成されたクローン胚においては、メチル化の「リセット」が見られず、高いメチル化状態が維持されることが見られる (Dean ら 2001)。ゲノム全体におけるメチル化に加えて、特定の遺伝子についての研究によっても同様に、受精胚と比較して、クローン胚でのメチル化変動パターンが異なることが次々と明らかになっている (Kang ら 2001; Kang ら 2003)。また、クローン胚栄養膜細胞のサテライト I 領域 DNA のメチル化状態が高い状態が残され、胎盤形成に何らかの影響をしていることが示唆されている (Kang ら 2002)。

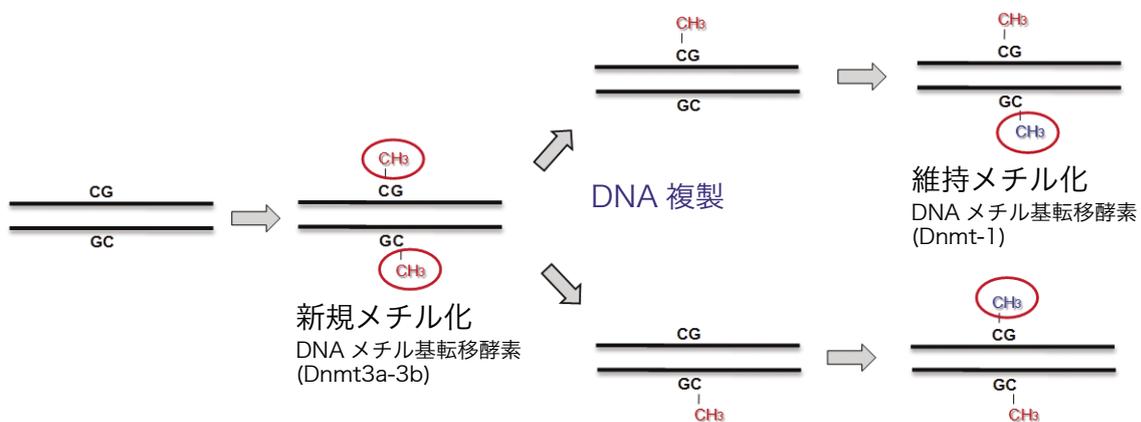


図3. DNA メチル化状態の次世代への伝達

クローン胚が個体までの発生能を獲得するためには、ドナー細胞が本来持っていたエピジェネティック修飾が消去・再構築されることが必要である。しかしながら、上記したようにクローン胚における DNA のメチル化およびヒストンのアセチル化レベルは通常の受精胚と比べて異なる。したがって、まずドナー細胞のエピジェネティック修飾の特徴およびそれらに関連する酵素の遺伝子発現パターンがリプログラミングにどのように影響を及ぼすのか、あるいは、核移植後のドナー細胞のエピジェネティック修飾調節機構を明らかにすることが重要である。

DNA のメチル化には、細胞分化等に伴って DNA 鎖に新たにメチル基を導入する「新規メチル化」と、同じ細胞種等の遺伝子発現機能を DNA 複製に伴ってもそれを維持する「維持メチル化」の 2 種類がある。哺乳類では 3 種の主要なメチル基転移酵素群が知られ、新規メチル化に関与する DNA methyltransferase (Dnmt) 3a および Dnmt3b の 2 種類と、維持メチル化に関与する Dnmt1 がそれらの新規、維持メチル化を調節している(図 3)。分化したドナー体細胞における高いメチル化状態の DNA が導入され、通常の受精現象における「リセット」が起こらない場合、維持型メチル基転移酵素(Dnmt1)によって胚発生を通じてメチル化の高い状態が維持されることが推察される。事実、受精卵をドナー細胞に用いた受精卵クローンの胚盤胞ではサテライト I 領域のメチル化状態が受精胚と同レベルの低い状態であることが調べられている(澤井 2006)。加えて、クローン胚におけるエピジェネティック修飾の異常を回避するためには、リプログラミングされやすい特徴を持つドナー細胞の選別が重要であることが報告されており(Bliloch ら 2006)、ドナー細胞のメチル化レベルがクローン胚のその後の発生の成否に重要な要因であり、DNA メチル化レベルが低い状態を有する細胞がドナー細胞として適していることが示唆されている。

また、ドナー細胞における Dnmt1 の遺伝子発現量の違いがクローン胎子の発育性と遺伝子発現に影響を及ぼすことも示されている(Bliloch ら 2006)。すなわち、Dnmt1 の発現量の低いドナー細胞で作製したクローン胚のほうが通常の受精胚に近い遺伝子発現パターンを示すことが明らかとなっている。さらに、胚盤胞期胚への体外発生率は Dnmt1 発現量の高い細胞を用いたほうが良好であったが、胚移植後の胎子の発生状態は発現量の低い細胞を用いたほうが良好であったという興味深いものである(Giraldo ら 2008)。この結果は、クローン胚の体外発生率が必ずしもクローン胚の品質を反映していないということおよび作製したクローン胚の体外発生率が高い細胞がドナー細胞として適しているとは限らないということを示唆しており、高生存クローン胚の選別に際

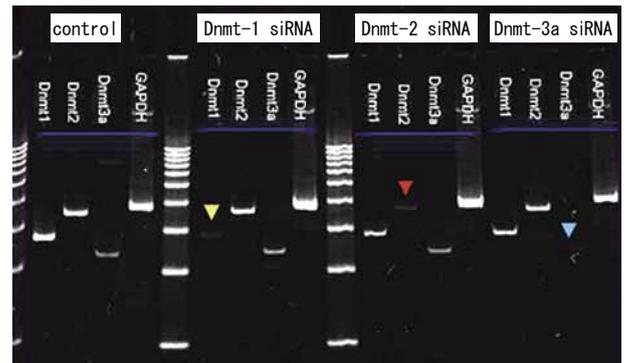


図 4. 牛ドナー細胞における Dnmt 遺伝子の RNA 干渉

しての指標としての今後の利用可能性が期待される。同様にウシにおいては、ドナー細胞の培養時にヒストン脱アセチル化阻害剤である Trichostatin A (TSA) を添加することでドナー細胞の Dnmt およびヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) のタンパク質量の低下や反復配列であるサテライト I における DNA メチル化レベルが低下し、クローン胚の胚盤胞期までの発生率が向上することが報告されている(Wee ら 2007)。このように、TSA 添加によるエピジェネティック修飾の改変はドナー細胞、クローン胚どちらに用いても効果があり、非常に簡便かつ安価な方法であるといえる。さらに、TSA と同様の HDAC 阻害剤である sodium butyrate によるドナー細胞の処理によるエピジェネティック修飾も報告されている(Mohana Kumar ら 2007)。我々は、RNA 干渉を用いた Dnmt 1 の遺伝子発現を抑制する系を確立(Yamanaka ら 2010)し(図 4)、ドナー細胞あるいはクローン胚におけるエピジェネティック修飾の解析も現在実施している。

3. 初期胚メチル化状態の検出

前記したように、クローン胚の作成効率を上げる場合には、メチル化の制御ならびに検出が重要な鍵を握るともいえる。近年、メチル化状態の解析手法にはめざましいものがあり、網羅的なメチル化、あるいは特定の遺伝子配列におけるメチル化解析等、発生・分化、あるいは細胞のガン治療とも相まって様々な手法が日進月歩で開発されている(図 5)。しかし、高価格の分析機器を必要とする手法もあり、クローン胚のような構成細胞が少なく、十分な DNA を確保しにくいサンプルを用いる場合には PCR による解析を併用した手法がとりやすくと考えられる。

近年、遺伝子特異的にメチル化状態を比較的容易に解析できる手法として、亜硫酸水素 (bisulfite) 法による検出手法が簡便で信頼性の高い手法として広範囲にわたって利用されている。Bisulfite 法は早津らによって開発されたメチル化を解析する手法である(Hayatsu

ら 1970)。基本原理としては、メチル化を受けていないシトシンは亜硫酸水素ナトリウムで処理することで、ウラシルに置換されるが、メチル化を受けているメチルシトシンは置換されない。このため、bisulfite 処理後、鋳型の段階でメチル化された DNA とメチル化されない DNA で全く異なった塩基組成に変換される。この原理を利用した様々な解析法が開発されている。bisulfite 処理後、PCR により CpG アイランドを有する特定領域を増幅し、メチル化を受け、変換されていない部位についての配列決定による bisulfite sequencing や、メチル化感受性制限酵素の処理を行うことで、鋳型でのメチル化状態を反映した定量的な解析方法である combined bisulfate restriction analysis (COBRA) (Bird と Southern 1978) が有効な手法として細胞分化やガン化におけるメチル化解析に広く用いられている。また、シーケンシングにより、塩基配列中のどの CpG アイランドがメチル化されているかということも解析が可能となる (Clark ら 1994)。本手法を使った牛クローン胚でのメチル化状態検出の有効性が報告され、クローン胚における異常の早期検出とその評価手法への利用が広がっている (Kang ら 2001)。我々も改変 COBRA 法 (高橋ら 2006) (図 6 a) および bisulfite sequencing (図 6 b) によってクローン胚盤胞のメチル化がほぼドナー細胞の状態を反映していることを確認している。

Bisulfite 法を利用することで、少数胚におけるメチル化解析が可能であり、特に、クローン胚における作出過程あるいは培養過程における操作の影響等、胚正常性評価への利用が考えられる。しかしながら、ゲノム DNA 中の反復配列であるサテライト I 領域のような増幅が容易な配列についてのみならず、発現遺伝子やプロモーター領域のような単一遺伝子配列をバイオプシー等によって胚から得た少数の細胞 DNA 試料から正確に解析するためには、さらなる増幅条件やプライマー配列設計等の条件検討が必要である。加えて、クローン胚の異常を引き起こす原因遺伝子は未だ解明されておらず、どの領域におけるメチル化状態をもって遺伝子機能発現の正常性を判断するかが確定されていないし、「メチル化正常性」評価の基準といえる数値も未だ確定していない。このことから、より精密な評価を行う際には、複数の遺伝子領域におけるメチル化解析を実施すると同時に、どのレベルを持って正常、異常と判断するかの基準データを蓄積していくことも必要であろう。

4. おわりに

クローン胚の効率的な作出に向けての「エピジェネティック」の観点からの検出・解析研究と制御・調節研究が進行している。遺伝子情報の初期化およびその後のトレーシングを正確に実施することにより効率に産子を得

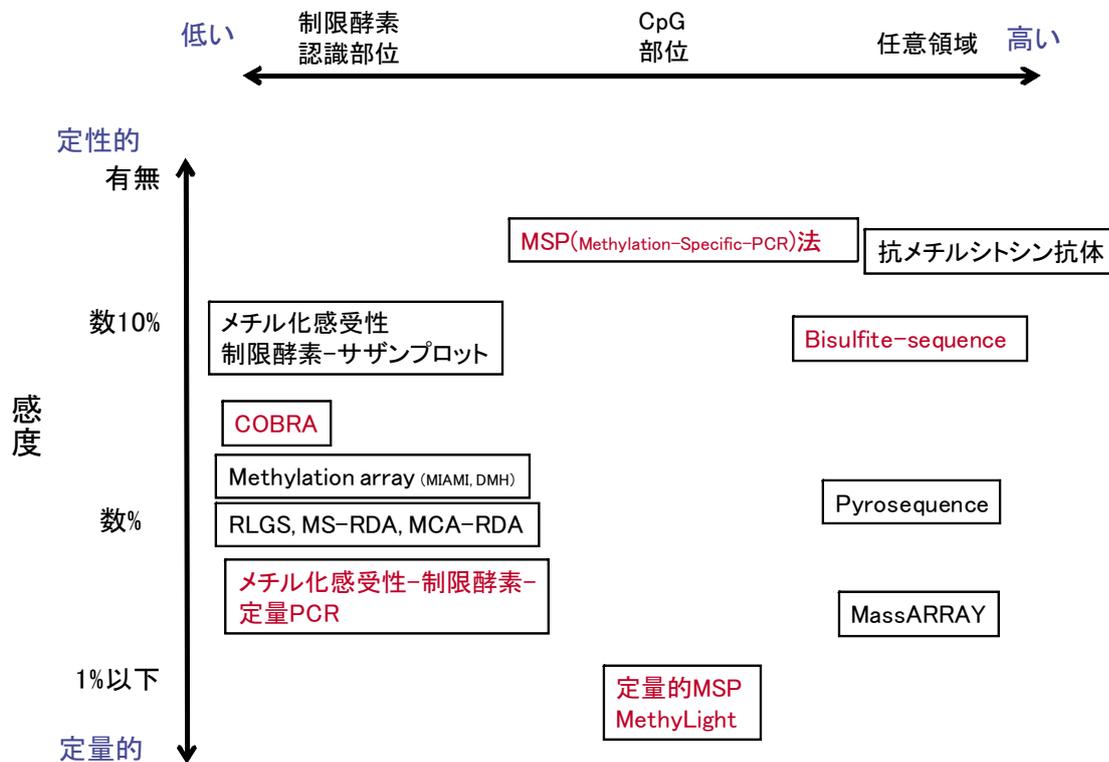


図 5. メチル化解析手法 牛嶋ら (2008) の図を引用改変

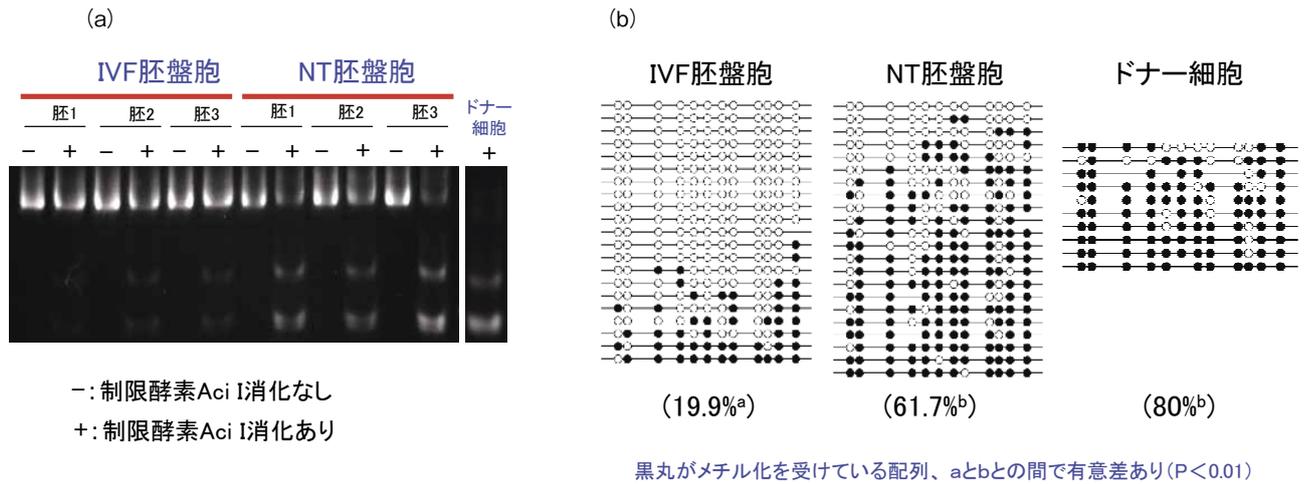


図 6. COBRA 法 (a) および bisulfite sequencing 法 (b) による体外受精胚とクローン胚の Satellite I 領域におけるメチル化状態の解析

られる系の確立に向けて、着実に進みつつある。加えて、正常に生まれたクローン個体における生殖細胞形成の正常化や、この後代個体では全くの異常が見られないというデータが蓄積されてきており、発生過程での生殖細胞へのリプログラミングによる個体発生の正常化も注目されている (Fulka ら 2004)。実際に、牛においてもクローン個体やその後代個体における正常性が明らかにされており (Watanabe と Nagai 2009)、いかにクローン個体を正常に生ませることができるかという部分での研究が待たれる。

今後、さらなる簡易かつ高感度の検出法の開発により複数の遺伝子メチル化解析が可能になり、かつ、それらのデータ蓄積によるドナー細胞およびクローン胚におけるメチル化調節と正常産子性の評価手法が確立されることで、生産効率につながる技術の開発が期待される。

文 献

Bird AP, Southern EM. 1978. Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. *Journal of Molecular Biology* 118, 27-47.

Blelloch R, Wang Z, Meissner A, Pollard S, Smith A, Jaenisch R. 2006. *Stem Cells* 24 (9), 2007-2013.

Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. 1994. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Research* 22, 2990-2997.

Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W. 2001. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proceedings of National Academy of*

Sciences of the USA 98, 13734-13738.

Fulka Jr. D, Miyashita N, Nagai T, Ogura A. 2004. Do cloned mammals skip a reprogramming step? *Nature Biotech* 22, 25-26.

Giraldo AM, Hylan DA, Ballard CB, Purpera MN, Vaught TD, Lynn JW, Godke RA, Bondioli KR. 2008. Effect of epigenetic modifications of donor somatic cells on the subsequent chromatin remodeling of cloned bovine embryos. *Biology of Reproduction* 78 (5), 832-840.

Hayatsu H, Wataya Y, Kai K. 1970. The addition of sodium bisulfite to uracil and to cytosine. *Journal of the American Chemical Society* 92, 724-726.

Jaenisch R. 1997. DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends in Genetics* 13, 323-329.

Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Chung AS, Lee KK, Han YM. 2001. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nature Genetics* 28, 173-177.

Kang YK, Park JS, Koo DB, Choi YH, Kim SU, Lee KK, Han YM. 2002. Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos. *EMBO Journal* 21, 1092-1100.

Kang YK, Yeo S, Kim SH, Koo DB, Park JS, Wee G, Han JS, Oh KB, Lee KK, Han YM. 2003. Precise recapitulation of methylation change in early cloned embryos. *Molecular Reproduction and Development* 66, 32-37.

Mohana Kumar B, Song HJ, Cho SK, Balasubramanian S, Choe SY, Rho GJ. 2007. Effect of histone acetylation modification with sodium butyrate,

- a histone deacetylase inhibitor, on cell cycle, apoptosis, ploidy and gene expression in porcine fetal fibroblasts. *Journal of Reproduction and Development* 53 (4) , 903-913.
- 澤井 健. 2006. いざ“生の扉へ” - クローンとエピジェネティクスの新展開 (今川和彦, 東条秀昭編), アドスリー, 東京, 26-41.
- 高橋昌志, 阪谷美樹, 小林修司, 小林修一, 澤井 健, 志賀一穂. 2006. 体細胞クローン牛胚におけるメチル化状態の検出と評価. *日本胚移植学雑誌* 28, 112-117.
- 牛嶋俊和, 服部奈津子. 2008. エピジェネティクス実験プロトコール, 18-29, 羊土社
- Watanabe S, Nagai T. 2009. Death losses due to stillbirth, neonatal death and diseases in cloned cattle derived from somatic cell nuclear transfer and their progeny: a result of nationwide survey in Japan. *Animal Science Journal* 80 (3) , 233-238.
- Wee G, Shim JJ, Koo DB, Chae JI, Lee KK, Han YM. 2007. Epigenetic alteration of the donor cells does not recapitulate the reprogramming of DNA methylation in cloned embryos. *Reproduction* 134 (6) , 781-787.
- Yamanaka K, Balboula AZ, Sakatani M, Takahashi M. 2010. Gene Silencing of DNA Methyltransferases by RNA Interference in Bovine Fibroblast Cells. *Journal of Reproduction and Development* 56 (1) , 60-67.