

氏 名 千葉 初音

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1519 号

学位授与の日付 平成 24 年 3 月 23 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Genomic imprinting independent of *de novo* DNA
methyltransferases in mouse oocytes

論文審査委員 主 査 准教授 小出 剛
教授 相賀 裕美子
教授 角谷 徹仁
助教 浅岡 美穂
教授 有馬 隆博 東北大学

Genomic imprinting is a germline specific gene-marking phenomenon in mammals that regulates parental-origin specific expression of the imprinted genes. Imprinting is crucial for normal mammalian development and relevant to congenital malformation syndromes and cancers. More than one hundred imprinted genes have been identified in mice and humans and most of them are clustered in certain chromosome domains. These imprinted gene clusters contain imprinting control regions (ICRs) that are CpG-rich and methylated only on one of the two parental chromosomes. The ICRs control the allele-specific expression of the imprinted genes within the clusters.

Mammals have two active *de novo* DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b, and their regulator Dnmt3L. It has been shown that Dnmt3a and Dnmt3L are required for the establishment of DNA methylation imprint of the ICRs in both male and female germline and parental-origin specific expression of the imprinted genes. Furthermore, Dnmt3b is also required for DNA methylation of the *Rasgrf1* ICR in the male germline. These studies indicated that the molecular nature of the germline imprints is DNA methylation.

However, it was reported that some imprinted genes in the *Lit1* cluster maintain the normal monoallelic expression even in the absence of the maintenance DNA methyltransferase Dnmt1 in the trophoblast. This suggests that the trophoblast has a DNA methylation-independent imprint maintenance mechanism. In addition to the maintenance of the imprints, several recent studies imply the role of epigenetic modifications or factors other than DNA methylation in establishment of the imprints. Taken together, there may be an imprint establishment mechanism other than *de novo* DNA methylation in the germline.

To reveal the existence of the DNA methylation-independent germline imprints, I used mice lacking the *de novo* DNA methyltransferases or their regulator in the germline. Unfortunately, both Dnmt3a mutant males and Dnmt3L mutant males display meiotic arrest and azoospermia, and thus it is not possible to assess the effect of loss of DNA methylation at the paternally methylated ICRs in the embryo. Therefore, I obtained female mice lacking Dnmt3a and Dnmt3b or those lacking Dnmt3L specifically in oocytes. I crossed these females with wild-type males and analyzed the allele-specific expression of the imprinted genes in E9.5 embryos and trophoblasts by using single nucleotide polymorphisms in cDNAs (cSNPs). The cSNPs between the laboratory strains and the JF1 mice were identified in the NIG mouse genome database (<http://molossinus.lab.nig.ac.jp/msmdb/>) and confirmed by PCR amplification and direct sequencing in 17 imprinted genes from seven clusters.

RNAs from the embryo proper and trophoblast of wild-type, [*Dnmt3a*^{matKO}, *Dnmt3b*^{matKO}] and *Dnmt3L*^{matKO} embryos at E9.5 were subjected to RT-PCR and direct sequencing. While 15 of 17 imprinted genes showed a disruption in the monoallelic

expression, *Kcnq1* in the *Lit1* cluster maintained the normal maternal expression pattern in these embryos and trophoblasts. The trophoblast-specific imprinted gene *Cd81* in the *Lit1* cluster also retained the normal maternal expression in the trophoblast. These results suggest that the establishment of the imprints of some genes occurs independent of the *de novo* DNA methyltransferases and its positive regulator Dnmt3L.

Next, I examined the expression levels of some imprinted genes and confirmed that *Cdkn1c* and *Lit1* are biallelically silenced and biallelically expressed, respectively, in [*Dnmt3a*^{matKO}, *Dnmt3b*^{matKO}] and *Dnmt3L*^{matKO} embryos. By contrast, the expression levels of *Kcnq1* and *Cd81* were unexpectedly altered in [*Dnmt3a*^{matKO}, *Dnmt3b*^{matKO}] and *Dnmt3L*^{matKO} embryos despite that they maintained the normal monoallelic expression. These results show that, although the imprint establishment of *Kcnq1* and *Cd81* in oocytes is independent of the Dnmt3a, Dnmt3b, and Dnmt3L, their expression levels after fertilization are influenced, either directly or indirectly, by the mutations of these genes.

Then I confirmed that the ICRs are not methylated in [*Dnmt3a*^{1lox/1lox}; *Dnmt3b*^{1lox/1lox}] and *Dnmt3L*^{-/-} oocytes and the maternally derived ICRs in [*Dnmt3a*^{matKO}, *Dnmt3b*^{matKO}] and *Dnmt3L*^{matKO} embryos and trophoblasts by bisulfite sequencing. These results strongly suggest that imprinting of *Kcnq1* and *Cd81* is not just independent of *de novo* DNA methyltransferases and their regulator but indeed independent of DNA methylation.

Interestingly, some imprinted genes such as *Peg10* maintained the normal monoallelic expression patterns in some *Dnmt3L*^{matKO} embryos, but not in any [*Dnmt3a*^{matKO}, *Dnmt3b*^{matKO}] embryos. To reveal the methylation status of the *Peg10* ICR in six *Dnmt3L*^{matKO} embryos, I performed bisulfite sequencing and found that two embryos had the DNA methylation imprint, while four embryos did not. This suggests that the DNA methylation imprint at the *Peg10* ICR can be established without *Dnmt3L*. Furthermore, *Dnmt3L*^{matKO} embryos without DNA methylation at the *Peg10* ICR also maintained the normal monoallelic expression of *Peg10*. This implies the existence of an imprint establishment mechanism dependent on the *de novo* DNA methyltransferases, but not on DNA methylation.

Finally, to investigate whether there is any difference in expression between the genes controlled by the *de novo* DNA methylation dependent (*Cdkn1c*, *Lit1* and *Tssc4*) and an independent (*Kcnq1* and *Cd81*) mechanisms within the *Lit1* cluster in [*Dnmt3a*^{1lox/1lox}, *Dnmt3b*^{1lox/1lox}] and *Dnmt3L*^{-/-} oocytes, I performed quantitative RT-PCR using these oocytes. Expression of *Lit1* was extremely increased in both [*Dnmt3a*^{1lox/1lox}, *Dnmt3b*^{1lox/1lox}] and *Dnmt3L*^{-/-} oocytes, whereas expression of the other imprinted genes within the *Lit1* cluster was comparable to that in wild-type oocytes. These results suggest that, while the expression of *Lit1* in oocytes is repressed by DNA methylation, its ectopic expression of *Lit1* in mutant oocytes does not affect the

expression of other imprinted genes within the *Lit1* cluster. This contrasts with what happens in the embryos, in which the genes in the cluster are normally repressed by *Lit1* non-coding RNA.

Based on these results, I propose a model of the establishment of genomic imprints other than DNA methylation in mouse oocytes. The model suggests that, in addition to the DNA methylation imprints at the ICRs, each imprinted gene may have gene-specific epigenetic marks that regulate monoallelic expression. The model will provide a basis for understanding the mechanism of the imprint establishment.

遺伝子の発現調節において、その遺伝子アレルが由来する親の性に依存して、発現するか否かが決まる現象はゲノムインプリンティングと呼ばれている。インプリント遺伝子はマウスやヒトにおいて 100 種類以上すでに報告されており、多くの遺伝子はゲノム上に遺伝子クラスターをつくって存在している。こうしたクラスター領域には、*imprinting control region* (ICRs) と呼ばれる CpG が多く集まった領域が存在する。この ICR がアレルの由来する親の性に依存してメチル化修飾を受けることで、クラスター内の遺伝子が発現誘導または発現抑制を受けることが知られてきているが、その発現制御の分子機構については不明の点も多い。

千葉初音さんは、哺乳類 DNA の新規メチル化が *Dnmt3a* と *Dnmt3b* という二つの *de novo* DNA メチル化酵素とその調節因子である *Dnmt3L* により調節されていることに着目し、これらの DNA メチル化酵素が母親の生殖細胞中で働かない（欠損）場合に、ゲノムインプリンティングがどのように影響を受けるか調べた。博士前期課程においては、胚体外組織と着床前胚において雌親由来 X 染色体が特異的に不活化耐性を示すインプリンティングに対して、卵成熟期の DNA メチル化酵素欠損の効果を調べた。その結果、X 染色体不活化耐性インプリンティングは、卵成熟期の DNA メチル化酵素には依存せずに生じていることを示した。次に博士後期課程において、こうした DNA メチル化欠損が常染色体上の母方インプリント遺伝子クラスターに及ぼす影響を 9.5 日胚の胚体および胚体外組織について調べた。その結果、調べた 17 個の遺伝子のうち、15 個の遺伝子については、アレル特異的な発現を消失していたものの、*Lit1* クラスターに存在する *Kcnq1* は胚体組織と胚体外組織で、胚体外組織特異的インプリント遺伝子である *Cd81* は、胚体外組織でアレル特異的な発現が維持されていた。*Lit1* クラスターには、母方アレルで DNA メチル化を受ける ICR が存在するが、DNA メチル化酵素欠損の胚体や胚体外組織ではメチル化がみられなかった。また、本来母方アレルでは抑制されているはずの *Lit1* 遺伝子が発現していることも確認された。これまでに、*Lit1* クラスター内のインプリント遺伝子は *Lit1* の転写に依存して発現抑制を受けることが報告されていたが、今回の *Kcnq1* と *Cd81* の結果はこれまでの報告とは異なる機構が関与していることを示している。

千葉さんはこれらの研究結果をもとに、新たなモデルを提案している。それは、クラスター内の各遺伝子には、ICR における DNA メチル化に依存したインプリンティング修飾とは別に、DNA メチル化に依存しない別のエピジェネティックな修飾が存在し、それがアレル特異的な発現に関与しているというものである。このモデルについては、今後修飾分子を同定するなどの試みにより証明されることを期待したい。

この一連の研究は、卵成熟期の DNA メチル化酵素の欠損が、着床前胚、および着床後の胚体および胚体外組織においてゲノムインプリンティングにどのような影響をもたらすか詳細に調べた初めての研究である。今後のこの分野の研究に大きな展開をもたらす可能性を持つ成果である。審査員全員で審査した結果、本大学院における学位授与の水準を十分に満たす論文であると判断した。