

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20062002

研究課題名（和文） 卵および初期胚における遺伝子発現リプログラミングの調節機構

研究課題名（英文） Regulation of gene expression reprogramming in the oocytes and embryos.

研究代表者

青木 不学 (AOKI FUGAKU)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20175160

研究成果の概要（和文）：受精前後における遺伝子発現リプログラミングの調節機構を明らかにするために、まずリプログラミングによって起こる 1 細胞期での遺伝子発現パターンの解析を行った。その結果、これまでほとんど明らかにされていなかった 1 細胞期で発現する遺伝子を多数同定することができ、それらの中に受精前の卵で発現していない遺伝子が多く含まれていることが明らかとなった。また、受精前後でゲノム全体にわたりヒストン変異体の置換が大規模に起こることが明らかになり、これらが遺伝子発現のリプログラミングに関わっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism regulating the reprogramming of gene expression after fertilization, I investigated the change in the gene expression pattern after fertilization in mice. I identified 4,000 genes which are expressed in the 1-cell stage embryos and found that in this set of genes, there are many genes which were not expressed before fertilization. The analysis for the dynamics of histone variants revealed that H2A and H3 variants are dramatically replaced in the whole genome just after fertilization, which would be involved in the regulation of gene expression reprogramming.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	12,700,000	0	12,700,000
2009 年度	12,700,000	0	12,700,000
2010 年度	12,700,000	0	12,700,000
2011 年度	12,700,000	0	12,700,000
2012 年度	12,700,000	0	12,700,000
総計	63,500,000	0	63,500,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：卵、初期胚、リプログラミング、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

生命の誕生は、分化した精子と卵子が接合し、全能性を持つ受精卵を生じることから始まる。そして、その際に遺伝子発現のリプロ

グラミングが起こると考えられている。すなわち、成長中の卵母細胞は分化した細胞であり、生殖細胞特異的な遺伝子発現パターンを示す。その後、成長期の終盤になって一旦遺

伝子発現を停止し、そのまま減数分裂を進行させて未受精卵となる。そして、受精後に遺伝子の発現が開始し、新しい発現プログラムが始まる(参考文献1)。この様に、分化した精子と卵子が接合し、全能性を持つ受精卵を生じるということは、遺伝子発現の面から見ると、受精の前後で遺伝子発現のリプログラミングが行われているということを示している。しかし、そのリプログラミングの機構については現在までのところほとんど知見が得られていない。

近年、再生医療あるいは体細胞クローン動物に関連して、リプログラミングということに対する関心が高まっているが、現在までのところ、この「リプログラミング」とは単なる概念であり、実際に分子レベルでゲノムにどのような変化が起こるのかについてはまったく説明されていない。例えばクローン動物の例では、その誕生によって「リプログラミングされた」という結果を判断しているのであり、実際のリプログラミングの過程を調べた研究は極めて少ないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は受精前後における遺伝子発現リプログラミングのメカニズムを明らかにすることである。この目的のため、本研究では、転写制御機構の変化に着目し研究を進める予定である。すなわち、転写の制御に重要な働きをしている転写因子およびエピジェネティック因子の変化を調べることで遺伝子発現リプログラミングの実態とその調節機構を明らかにしようという研究戦略である。エピジェネティック因子として、クロマチンを構成するヒストン変異体の置換を主な解析のターゲットとする。

3. 研究の方法

本研究計画は以下の3つのステップから成っている。

(1)リアルタイムに発現している遺伝子プロファイルの作成

(2)転写制御機構の解析—転写因子・エピジェネティックな因子

(3)RNAi による機能解析

具体的な実験計画内容を以下に記す。

【計画内容】

(1)リアルタイムに発現している遺伝子プロファイルの作成

まず、活発に遺伝子を発現している成長中の卵と受精後の初期胚において、リアルタイムに発現している遺伝子のプロファイルを作成する。この両者の間で遺伝子発現のリプログラミングが起きていると考えられているが、その結果として実際にどのように発現パターンが変化したかについては、これまで明らかにされていない。そして、実際の転写パ

ターンを知るためには、卵や胚中に大量に蓄積された母性 mRNA から、新しく合成された mRNA (新生 mRNA) を単離する必要がある。手法としては、申請者らにより開発された新生 mRNA 単離法を用いる(参考文献1)。すなわち、卵あるいは胚にプロモ標識した UTP を取り込ませ、抗 BrU 抗体で沈降させることによって BrU を取り込んだ新生 mRNA を単離し、マイクロアレイで解析する。また、アレイに搭載されていない遺伝子に対応するため、卵と胚で得られた新生 mRNA を用いてサブトラクションを行う。

(2)転写制御機構の解析—転写因子・エピジェネティックな因子

(1)で得られた卵と胚の遺伝子発現パターンに関して、それぞれの転写制御機構とその変化を引き起こす要因について、転写因子およびエピジェネティックな因子の2つのポイントから解明していく。

①まず、同定された発現遺伝子について、それぞれその制御領域および関連する転写因子を推定する。その際、申請者の研究室で得られた卵と胚で発現している転写因子のデータベースを利用する。

②発現遺伝子の制御領域についての情報が得られたら、その領域に EGFP を繋いだプラスミドを構築し、これを卵あるいは胚にマイクロインジェクションする。そしてその発現を調べ、さらに転写因子に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) によって制御領域に結合する転写因子を明らかにする。さらに、ターゲットとした制御領域周辺のヒストン置換を、現在申請者の研究室で作成中の Flag タグ付きヒストン変異体トランスジェニックマウスを用いて行う (ヒストン変異体を有効に見分ける抗体が存在しないため)。すなわち、卵や初期胚にマイクロインジェクションしたプラスミドについて抗 Flag 抗体を用いた ChIP 解析を行う。

③上記のようにして、卵および初期胚における遺伝子発現調節に関する情報が集積してきたら、これを用いて卵から初期胚への遺伝子発現の変化に関与する因子の候補について絞込みをかける。

ここで、未だ十分な情報が得られていない場合は、卵あるいは初期胚特異的な発現を行う遺伝子の制御領域を逆に発現していない方にマイクロインジェクションして、転写因子の結合、およびエピジェネティックな修飾を調べる。

(3)RNAi による機能解析

上記(2)-(3)の実験により、卵から胚への遺伝子発現の変化に関与する因子の候補が発見できた場合、RNAi により発現を抑制し、その機能を調べる。そのために2つの手法を試みる。まず、small RNA 分子を化学合成し、それを生後10-12日のマウスから得られた

成長卵にマイクロインジェクションして 12-14 日間培養する。この間に合成されたターゲット mRNA は RNAi によって分解され母性 mRNA としての蓄積が阻害されることが期待される。そして、その後の減数分裂、胚発生への影響を調べる。2 つ目の手法として、候補因子の hairpin dsRNA を ZP3 プロモーターに繋げた construct を導入したトランスジェニックマウスを作成する。これにより、減数分裂期特異的に RNAi で発現が抑制され、その機能が明らかとなる。

4. 研究成果

(1) リプログラミングによって受精後に新たに発現する遺伝子の解析

受精前後において遺伝子発現のリプログラミングが起こると考えられているが、その実態はほとんど明らかにされていない。その大きな原因の 1 つとして、リプログラミングが起こる前後の遺伝子発現状態が明らかにされていないことがある。これまでに受精前の卵で発現する遺伝子については数多くの報告があるが、受精直後の胚から転写される遺伝子についての報告はほとんど見られない。その原因として、受精前に卵に蓄積された大量の母性 mRNA に対して受精後に生成される胚由来の mRNA 量が非常に少なく、これらを同定することが極めて困難であることがあげられる。

そこで、BrUTP を取り込ませた 1 細胞期胚から抗 BrU 抗体によって新しく合成された mRNA (新生 mRNA) を単離する方法を確立した。この方法によって回収された新生 RNA をマイクロアレイで解析した結果、確実に 1 細胞期に転写されているといえる遺伝子が 11 個見つかった。これらは、受精後に最初に発現する遺伝子であり、受精後の遺伝子発現開始機構の解析において有用なマーカー遺伝子とすることができる。実際に、上記の遺伝子の中の 1 つである Tkt11 の転写開始点上流域をレポーター遺伝子に繋げたプラスミドを受精前後の卵に顕微授精を行うことで、その発現調節を調べたところ、上流域 500bp のみで受精前の卵では発現が見られず受精後に始めて発現するという調節が可能であることが分かった。

また、これまでの研究で用いられてきたマイクロアレイよりもさらに感度の高い RNA シーケンスを用いて、受精直後の遺伝子発現パターンを解析することを試みた。その結果、受精前には発現せず、受精後に発現する 23 個の遺伝子を発見した。そして興味深いことに、これらの転写産物はスプライシングがなされておらず、イントロンを含んだままであることが明らかとなった。実際に、イントロンを含む cRNA を 1 細胞期胚に顕微注入したところ、イントロンはスプライシングされな

かったが、受精前の成長期卵および 2 細胞期胚に顕微注入したものでは、イントロンがスプライシングされて取り除かれていた。したがって、1 細胞期胚はスプライシング機構が機能していないことが分かった。そして、この 1 細胞期の性質、すなわちその転写産物がイントロンを含むという性質を利用することで、1 細胞期で転写される遺伝子を新たに約 4000 個同定することができた。これらの中には、受精前の卵で発現していない遺伝子が数多く含まれていた。このように多数の遺伝子を同定できたことで、その転写制御領域の解析が可能となった。

(2) 受精前後のクロマチン構造変化とその機能解析

受精前後における遺伝子発現リプログラミング機構の解明のために、クロマチン構造の変化に大きな役割を果たすことが知られているヒストン変異体の置換を受精前後の卵と胚で調べた。

まず、クロマチンを形成する 4 つのコアヒストンのうち最も変異体の種類が多い histone H2A に焦点を当てて解析を行った結果、受精直後に核内から H2A.Z と macroH2A が急激に消失することが明らかとなった。また、H2A も核内から次第に失われていったが、前述の 2 つの変異体とは異なり、完全に消失することはなかった。一方、H2A.X だけは、受精後逆にその核内への局在を増加させていった。これらの変異体の発現量は受精前後で変化していなかったことから、核局在量の変化はクロマチンへの取り込み量に変化が起こったものと考えられた。実際に、flag タグを付加した各変異体をコードする mRNA を顕微注入して、そのタンパク質の核内への取り込みを調べたところ、受精後には H2A.X のみが活発に取り込まれていた。このような受精直後における H2A.X の活発な取り込みは、その C 末端のアミノ酸配列が重要であることが明らかとなった。すなわち、H2A.X の C 末端アミノ酸を H2A.Z あるいは macroH2A に付加したところ、これらの変異体も受精後に核内に取り込まれるようになった。興味深いことに、これらの変異体を核内に取り込んだ胚は 2 細胞期への分裂が遅れ、さらには胚盤胞への発生率が有意に低下していた。したがって、受精直後に H2A.Z と macroH2A が核クロマチンから消失することが初期発生に必要な現象であることが明らかとなった。

次にヒストン H3 変異体 (H3.1 および H3.3) の挙動に注目して研究を行った。そのため、Flag タグ付きヒストン H3.1 および H3.3 のトランスジェニックマウス作成し、卵形成および初期発生過程におけるヒストン変異体の挙動変化を Flag タグに対する抗体を用いた免疫染色法によって明らかにすることを試

みた。

まず、H3.3のトランスジェニックマウスの作成に成功し、卵成長、減数分裂中の卵、そして受精後の初期胚におけるH3.3を調べたところ、卵成長中にH3.3はクロマチンに取り込まれており、その状態は、減数分裂中にも維持されていた。ところが、受精直後に雌性前核からH3.3は急激に消失していた。したがって、活性化した遺伝子の制御領域付近のクロマチンに多く存在し、遺伝子発現のマーカーとなっていると考えられているH3.3が、受精直後にグローバルに消失することにより、それまでの分化した細胞である卵の遺伝子発現パターンをリセットし、受精後の全能性のある胚での新しい遺伝子発現プログラムの開始を可能にしているものと考えられる。

次に、ヘテロクロマチン形成に関与し哺乳類特異的であるヒストンH3.1に焦点を当てて解析を行った。ヒストンH3変異体は互いにアミノ酸配列が非常に類似しており、それらを有効に識別できる抗体が存在しないため、Flagタグを付加したヒストンH3.1のトランスジェニックマウスを作成し、これを用いてH3.1の動態を解析することにした。まず、調べたすべての体組織でFlag-H3.1が恒常的に発現しているトランスジェニックマウスの作出が確認できた。このマウスから得られた卵および初期胚におけるFlag-H3.1の動態を調べたところ、成長卵および受精後の4細胞期まで核内にFlag-H3.1が検出されず、桑実胚期で初めてこれが検出された。一方で成長卵あるいは1細胞期胚でFlag-H3.1のmRNA発現が確認できたことから、H3.1をクロマチンに組み込むシャペロンが成長卵および初期胚で機能していないことが示唆された。さらに卵成長期を遡って、生後9日目のマウスから得られた成長期卵を調べたところ、この時期にもFlag-H3.1は核内に検出されなかった。したがって、卵形成のより早い時期にH3.1がクロマチンから消失していることが示された。また、ヒストンH3変異体の発現をRTP-PCRで解析した結果、卵および受精後の初期胚においてH3.1の発現量は低く、桑実胚期から増加することが明らかとなった。一方、H3.2およびH3.3は卵においても発現量が高かった。これらの結果は、卵および初期胚でH3.1がクロマチンに存在しないのは、シャペロンの機能不全だけでなく、H3.1自身の発現量が低いこともその1つの原因になっていることを示唆している。

ところで以上の結果は、ゲノム全体のグローバルな変化を調べたものであり、個々の遺伝子領域で同様の変化が生じているかどうかは明らかではない。そこで、個々の遺伝子領域でのエピジェネティックな因子を解析する手法として、DM-ChIP法の確立を目指し

た。すなわち、成長期卵特異的に発現するZP3遺伝子の制御領域をコードするDNA断片を成長期卵および成長卵にマイクロインジェクションし、これを抗アセチル化ヒストン抗体で免疫沈降により回収した。その結果、グローバルにアセチル化レベルの高い成長卵からより多くのDNA断片が回収され、本実験法が有効に使用できることが示された。したがって、本方法を用いて、上記(1)で同定したリプログラミングにより発現する遺伝子領域での様々なエピジェネティック因子、特にヒストン変異体の動態を解析することにより、リプログラミングのメカニズムが明らかにされるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

- ① Kawamura M, Akiyama T, Tsukamoto S, Suzuki MG & Aoki F: The expression and nuclear deposition of histone H3.1 in murine oocytes and preimplantation embryos. *J. Reprod. Dev.*, 28, 557-562, 2012. (査読有)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/58/5/58_2012-074/_article
- ② Nashun B, Akiyama T, Suzuki MG & Aoki F: Dramatic replacement of histone variants during genome remodeling in nuclear-transferred embryos. *Epigenetics*, 6: 1489-1497, 2011. (査読有)
doi: 10.4161/epi.6.12.18206
- ③ Akiyama T, Suzuki O, Matsuda J & Aoki F: Dynamic replacement of histone H3 variants reprograms epigenetic marks in early mouse embryos. *PLOS Genetics*, 7: e1002279 (12 pages), 2011. (査読有)
doi: 10.1371/journal.pgen.1002279
- ④ Inoue A, Ogushi S, Saitou M, Suzuki MG & Aoki F: Involvement of murine nucleoplasmin 2 in the decondensation of sperm chromatin after fertilization. *Biol. Reprod.*, 85: 70-77, 2011. (査読有)
doi: 10.1095/biolreprod.110.089342
- ⑤ Nashun B, Yukawa M, Liu H, Akiyama T & Aoki F: Changes in the nuclear

deposition of histone H2A variants during preimplantation development in mice. *Development*, 137, 3785-3794, 2010. (査読有)

doi: 10.1242/dev.051805

- ⑥ Inoue A & Aoki F: Role of the nucleoplasmin 2 C-terminal domain in the formation of nucleolus-like bodies in mouse oocytes. *FASEB J.*, 24: 485-494, 2010. (査読有)
doi: 10.1096/fj.09-143370
- ⑦ Abe K, Inoue A, Suzuki MG & Aoki F: Global gene silencing is caused by the dissociation of RNA polymerase II from DNA in mouse oocytes. *J. Reprod. Dev.*, 56, 502-507, 2010. (査読有)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/56/5/56_10-068A/_article
- ⑧ Suzuki T, Abe K, Inoue A, & Aoki F: Expression of c-MYC in nuclear speckles during mouse oocyte growth and preimplantation development. *J. Reprod. Dev.*, 55: 491-495, 2009. (査読有)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/55/5/55_09-069A/_article
- ⑨ Inoue A, Nakajima R, Nagata M, & Aoki F: Contribution of the oocyte nucleus and cytoplasm to the determination of meiotic and developmental competence in mice. *Hum. Reprod.*, 23: 1377-1384, 2008. (査読有)
doi: 10.1093/humrep/den096
- ⑩ Ooga M, Inoue A, Kageyama S, Akiyama T, Nagata M & Aoki F: Changes in H3K79 methylation during preimplantation development in mice. *Biol. Reprod.*, 78: 413-424, 2008. (査読有)
<http://www.bioreprod.org/content/78/3/413.long>

[学会発表] (計 15 件)

- ① 大我政敏、青木不学: マウス着床前初期胚におけるヒストン H2B ユビキチン化. 第 116 回日本畜産学会、広島、2013 年 3 月 30 日.
- ② Abe K, Yamamoto R, Oka G, Franke V, Vlahovicek K, Suzuki Y & Aoki F: Characterization of the gene

expression in the 1-cell stage embryos. The American Society for Cell Biology, San Francisco, USA, December 18, 2012.

- ③ Ooga M & Aoki F: Histone H2B ubiquitination in the mouse preimplantation embryos. The American Society for Cell Biology, San Francisco, USA, December 18, 2012.
- ④ Yamamoto R, Abe K, Franke V, Vlahovicek K, Suzuki Y & Aoki F: The profile of the genes transcribed at the onset of gene expression after fertilization. The American Society for Cell Biology, San Francisco, USA, December 18, 2012.
- ⑤ 青木不学: マウス ES 細胞におけるヒストン H2A および H3 変異体のゲノムワイド解析、第 85 回日本生化学会大会、福岡、2012 年 12 月 15 日.
- ⑥ Aoki F: Genome-scale profiling of the chromatin composition of histone H2A and H3 variants in mouse embryonic stem cells. The 24th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology. Seoul, Korea, October 10-12, 2012.
- ⑦ 大我政敏、青木不学: マウス着床前初期胚における Histone H3 lysine 79 メチル化の調節機構について. 第 115 回日本畜産学会、名古屋、2012 年 3 月 28 日.
- ⑧ 河村真愛、秋山智彦、塚本智史、青木不学: 発生過程におけるゲノムリモデリングへの H3 変異体の関与について. 第 115 回日本畜産学会、名古屋、2012 年 3 月 28 日.
- ⑨ 秋山智彦、那順布和、青木不学: 核移植胚におけるコアヒストン置換によるクロマチンの再構築. 第 52 回 哺乳動物卵子学会、那須塩原、2011 年 5 月 21 日.
- ⑩ Aoki F: Genome-wide analysis of the chromatin composition of histone H2A and H3 variants in mouse embryonic stem cells. EMBO workshop, "Histone Variants & Genome Regulation", Strasbourg, France, October 14, 2011.
- ⑪ Yukawa M, Akiyama T, Aburatani, H, Abe, K & Aoki F: Genome wide analysis of the histone variant MacroH2A in mouse embryonic stem cell. EMBO workshop, "Histone Variants & Genome

Regulation”, Strasbourg, France, October 13, 2011.

- ⑫ Kawamura M, Akiyama T, Tsukamoto S & Aoki F: The dynamics of H3.1 during oogenesis and pre-implantation development in mice. EMBO workshop, “Histone Variants & Genome Regulation”, Strasbourg, France, October 13, 2011.
- ⑬ Aoki F: Involvement of histone variants replacement in the genome remodeling after fertilization. International Symposium on “Epigenome Network Development and Reprogramming of Germ Cells, Fukuoka, November 24, 2010.
- ⑭ Nashun B & Aoki F: The preferential incorporation of H2A.X into chromatin in early preimplantation embryos involves its C-terminal domain. 69th Annual Meeting of Society for Developmental Biology. Albuquerque, USA, August 8, 2010.
- ⑮ 青木不学: 受精前後におけるゲノム再プログラム化機構ーヒストン修飾および変異体置換の関与ー. 第56回日本実験動物学会、大宮、2009年5月14日.

[図書] (計2件)

- ① 青木不学: 受精前後の遺伝子発現プログラム、「卵子学」、森崇英編、京都大学出版会、727-735, 2011.
- ② 青木不学: 受精とリプログラミング. Medical Bio, 9: 40-45, 2009.

[その他]

青木不学: 卵のクオリティーについて. 第19回セント・ルカセミナー、大分、2012年6月3日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 不学 (AOKI FUGAKU)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号: 20175160