

令和元年6月21日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15716

研究課題名(和文)クロマチンダイナミクスから捉える卵子インプリンティング型X染色体不活化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of imprinting type X chromosome inactivation mechanism of oocytes grasped from chromatin dynamics

研究代表者

阿久津 英憲 (Akutsu, Hidenori)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・生殖医療研究部・部長

研究者番号：50347225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の2つあるX染色体では遺伝子発現量の補正機構が働き、片方のX染色体が抑制される。X染色体不活性化といわれるこの現象は受精直後からみられ、正常な胎盤及び胚の発育には必須である。X染色体不活化は胚盤胞期までに確立されるため、卵子発生過程のX染色体不活化制御機構解明することは発生学のみならず医・薬学応用への展開も大いに期待される。本研究では、X染色体不活化を担う責任遺伝子(Xist)の制御機構と一つの染色体が不活化するというクロマチンのダイナミクスに着目し、卵子成熟過程特異のおこるX染色体クロマチン動態を明らかにする挑戦的研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトおよびマウスにおける卵子ではX染色体関連遺伝子が不均等に発現することを見出した。未成熟/成熟卵子における転写産物の特性を明らかにし卵子成熟過程でX染色体関連遺伝子が特異的に低発現状態になることを初めて報告した。本研究から得られる成果は、X染色体不活化の乱れと関連が指摘されている卵巣疾患、習慣性流産、原発性卵巣機能不全(POI)や女性悪性腫瘍など多くの病態解明の一助となりうる。

研究成果の概要(英文)：One of the two mammalian X chromosomes is repressed by a mechanism that corrects gene expression. This phenomenon, referred to as X chromosome inactivation, occurs immediately after fertilization and is essential for normal placental and embryonic development. Since X chromosome inactivation is established by the blastocyst stage, elucidation of the control mechanism of X chromosome inactivation in the oocyte development process is highly expected not only in embryology but also in medical and pharmaceutical applications. In this study, we focused on the regulatory mechanism of X-chromosome inactivation responsible gene (Xist) and chromatin dynamics, in which one chromosome is inactivated

研究分野：産婦人科学

キーワード：卵 全能性 クロマチン 卵子成熟過程

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

発生に伴う細胞の分化は、遺伝的要因を伴わないエピジェネティック修飾に付随したダイナミックな遺伝子発現変化により完遂される。着床前期では雌雄ゲノムのエピジェネティック修飾の非対称性が確認され、胚の全能性獲得へのリプログラミングに必須である。X染色体に関しては、遺伝子の発現量がオスと同じであることが生存には必須であり、遺伝子発現量の補正機構が種を超えて存在している。この機構はX染色体不活性化とも言われ、中心的役割を担う分子としてXist遺伝子が知られている。申請者はこれまで、卵子の全能性獲得に関する分子メカニズム解明に向け微量生体試料である卵子および初期胚に対するエピゲノム解析系を構築してきた(文科科研・研究課題番号: #22659304, #26293364, #25670710)。この研究基盤から、遺伝子発現量の補正を担う卵子X染色体に特異的に存在する「しるし」(ヒストン修飾; H3K9me3)を世界で初めて同定した(Fukuda A, and Akutsu H. Nature Communications 2014)。さらに、マウスおよびヒト卵子でもその成熟過程で卵子発生特異的にX染色体関連遺伝子が特異的に低発現状態になることを発見した(Fukuda A, and Akutsu H. Scientific Reports 2015)。哺乳類の2つあるX染色体では遺伝子発現量の補正機構が働き、片方のX染色体が抑制される。X染色体不活性化といわれるこの現象は受精直後からみられ、正常な胎盤及び胚の発育には必須であり、その乱れは習慣性流産、原発性卵巣機能不全(POI)や女性悪性腫瘍などとの関連性が報告されている。X染色体不活性化は胚盤胞期までに確立されるため、卵子発生過程のX染色体不活性化制御機構解明することは発生学のみならず医・薬学応用への展開も大いに期待される。本研究では、X染色体不活性化を担う責任遺伝子(Xist)の制御機構と一つの染色体が不活性化するというクロマチンのダイナミクスに着目し、卵子成熟過程特異的おこるX染色体クロマチン動態を明らかにする挑戦的研究を行う。これまで、マウス初期胚における三次元蛍光免疫染色(IF-FISH)法を確立してきた。これにより、単一細胞レベルでクロマチン動態を解析し、単一細胞トランスクリプトーム解析を組み合わせることで、卵子成熟過程の転写・クロマチンダイナミクスを連動し捉えるアプローチが可能となる。本研究によって疾患と深く関連する卵子X染色体不活性化機構の分子メカニズム解明へ向けこれまでにない貴重な知見が得られる。X染色体不活性化の歪み(Skewed X-chromosome inactivation)は不育症やPOIなどの生殖器疾患との関連が示唆されている。

2. 研究の目的

X染色体不活性化の破綻は、胚の致死につながるということが実験動物で示されている。ヒトでは、X染色体不活性化の乱れが生殖系疾患のみならず女性悪性腫瘍病態と密接に関連すると報告されている(Jager N, et al. Cell 2013; Chalighe, et al. review in FEBS letter 2014)。X染色体不活性化状態が発生運命的に確立するのは着床期までの期間である。特に申請者らの研究成果から、ダイナミックな卵子成熟過程特異的X染色体不活性化機構が存在することが示唆された。本研究では、これまで構築したエピゲノム解析系(IF-FISH法やembryo-ChIP法)を用い卵子特異的インプリンティング型X染色体不活性化制御機構をクロマチンレベルで明らかにする。

3. 研究の方法

卵子成熟過程での核タンパク質ヒストン修飾解析

実験動物マウスの卵子成熟段階に合わせた卵子取得方法をすでに構築している。X染色

体不活化制御のマスター遺伝子である Xist 遺伝子の発現制御領域を選定し、H3K9me3 抗体を用いて embryo-ChIP 法を行う。これにより卵子成熟過程での Xist 遺伝子抑制「しるし」の修飾動態を明らかにする。同時に、Xist 遺伝子発現と Xist 遺伝子発現を上位で制御する Rnf12 遺伝子の発現量を定量 PCR 法および蛍光免疫染色法により Xist および Rnf12 遺伝子発現動態を明らかにしていく。申請者らは、精子細胞での Xist 遺伝子領域の H3K9me3 解析を行い、ヒストン H3 の領域は常に低メチル化であることを確認している。卵子成熟過程での同部位の卵子特異的メチル化変動を明らかにすることは極めて重要である。

卵子クロマチン凝集解析

卵子成熟過程で X 染色体関連遺伝子が他の常染色体と比較し特異的に低発現状態になることを初めて報告した (Fukuda A, and Akutsu H. *Scientific Reports* 2015)。卵子成熟には X 染色体全体が関与する遺伝子発現制御が重要であることが示唆される。そこで、卵子クロマチン凝集解析を行う。しかし、本研究課題ではこの項目が最もチャレンジングであると想定される。対象を卵子単体で行わなければならない。X 染色体クロマチン動態を解析する一方で、X 染色体上の複数遺伝子の発現動態およびエピジェネティック動態と連動させ機能的役割を解析していく。

卵子内クロマチンの脱凝縮解析

インプリンティング遺伝子発現制御領域の DNA メチル化修飾は、生殖発生過程で付加されていく。卵子成熟過程でおきる X 染色体不活化に関連するクロマチンの動態変化が卵子特異的に記憶されるかどうか解析を行う。これまで DNA メチル化のようなエピジェネティック修飾以外に卵子成熟特異的なクロマチン凝縮が存在するとこれまでのエピジェネティック制御と疾患病態を繋げる新たな科学的知見となりうる。本解析には、体細胞核移植技術を応用し卵子内での脱凝縮挙動を解析する。卵子によるリプログラミング能でも初期化の有無を検証する。

4. 研究成果

本研究において、卵子の本質的な機能である全能性の獲得に関し、初期発生特異的にインプリント型 X 染色体不活化が起こることを改めて確認した。また、マウスでは、受精後精子由来ゲノムでは Xist 遺伝子が発現し X 染色体が不活化される一方で、卵子由来ゲノムでは Xist 遺伝子発現が抑制され優先的に卵子由来 X 染色体が活性化された。この制御機構は、DNA メチル化制御からは独立したものであることが知られていたが詳細は未解明のままであった。これまで卵子のリプログラミング能や発生能に関わる分子機序解明を進めるなかで、受精後の着床前期発生における雌雄ゲノムのエピジェネティック修飾の非対称性に着目し初期胚の X 染色体不活化には卵子ゲノムでヒストン H3 の 9 番目リジンのメチル化 (H3K9me3) が重要な「しるし」であることを発見した。「しるし」(H3K9me3) がいつ構築されていくのかを探った。さらに、申請者らは、ヒトおよびマウスにおける卵子では X 染色体関連遺伝子が不均等に発現することを見出した (右図)。未成熟/成熟卵子における転写産物の特性を明らかにし卵子成熟過程で X 染色体関連遺伝子が特異的に低発現状態になることを初めて報告した。これらより、卵子成熟の本質として、DNA メチル化と独立したエピジェネティック修飾が存在している一方で、卵子成熟過程では X 染色体

全体の転写活性を抑制するダイナミックなクロマチン動態変動が存在することが示唆された。

5 . 主な発表論文等

1. Mitani A, Fukuda A, Miyashita T, Umezawa A, Akutsu H. The serine 106 residue within the N-terminal transactivation domain is crucial for Oct4 function in mice. *Zygote*. 2017; 25(2): 197-204.
2. Fukuda A, Mitani A, Miyashita T, Sado T, Umezawa A, Akutsu H. Maintenance of Xist Imprinting Depends on Chromatin Condensation State and Rnf12 Dosage in Mice. *PLoS Genet* 2016; 12(10): e1006375.
3. Fukuda A, Mitani A, Miyashita T, Kobayashi H, Umezawa A, Akutsu H. Spatiotemporal dynamics of OCT4 protein localization during preimplantation development in mice. *Reproduction*. 2016; 152(5): 417-430.

〔雑誌論文〕(計 6 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

なし