

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19318

研究課題名(和文)受精後の新世代における遺伝子発現プログラムの実態とその調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of gene expression program during preimplantation development

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：受精後に始まる遺伝子発現プログラムの調節に関わる因子として、(1)発生イベント、(2)Zygotic Clock、(3)段階的变化、の3つを想定し、これらの実際の関与を調べた。まず、1細胞期の転写を可逆的阻害剤により一過的に抑制し、2細胞になった時期に阻害剤を除いて転写パターンを調べたところ、1細胞期のパターンが見られた。したがって、この時期の遺伝子発現プログラムは、(3)段階的变化によって調節されていることが明らかとなった。また、2細胞前期から後期に起こる大規模な遺伝子発現パターンの変化がおこるが、DNA複製を阻害する実験によって、DNA複製が関わっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、クローン動物やiPS細胞の作成効率が極めて低く、その原因としてリプログラミングがうまく成されていないことが考えられており、その改善に向けた研究が数多く行われている。しかし、リプログラミングを理解するためには、その元となるプログラムを理解することが必須であるが、これが解明されていないのが現状である。そこで、本研究の成果が端緒となり、プログラムの全容が解明されたら、その情報に基づいてリプログラミングが達成されない原因を究明し、その改善に向かうという新たなスキームが生まれるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：To understand the mechanism underlying gene expression program after fertilization, I hypothesized that there are three factors involved in this mechanism, 1) developmental events, 2) zygotic clock, 3) step by step fashion. First, I treated 1-cell stage embryos with a reversible inhibitor of transcription and then liberated them from the drug at the 2-cell stage. Although all of those embryos developed to the 2-cell stage, the pattern of transcription was similar to that of the 1-cell stage, suggesting that the progression of gene expression program from 1-cell to 2-cell stage occurs in a step by step fashion. Second, a vast change of gene expression occurs between the early and late 2-cell stage. When DNA synthesis was inhibited, some of genes kept their expression patterns of the early 2-cell stage even at the late 2-cell stage. This result suggested that DNA replication (developmental events) is in part involved in the regulation of gene expression program during the 2-cell stage.

研究分野：動物育種繁殖学

キーワード：遺伝子発現プログラム 初期胚 zygotic gene activation マウス胚

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

1. 研究開始当初の背景

受精後に新たにスタートする遺伝子発現プログラムの実態、更にはその調節機構についてはそれまでにほとんど明らかにされていなかった。発生が正しく進行するためには、定められた順序で正確に遺伝子発現を変化させるシステム(すなわち遺伝子発現プログラム)が必要であると理論上考えられていたが、実際にそれを解明するための端緒すら見いだせていなかった。

その原因の1つとして、プログラムの開始時点で転写される遺伝子がまったく明らかにされていなかったことがある。マウスは哺乳類の中で最も詳細に受精後の遺伝子発現について調べられており、精子由来のトランスジーン発現や BrU の取り込み実験などにより1細胞期中期に最初の転写が起こることが20年以上前に明らかにされている。しかし、1細胞期胚では受精前の卵から持ち越した大量の母性 mRNA が残存しており、それに比較して受精後に新しく転写された mRNA 量は非常に少ないため、受精後に転写される遺伝子を同定することができなかった。このようにプログラムの最初に発現する遺伝子がまったく分からない状況では、プログラムの実態および調整機構を解明することは困難であった。ところが当時、応募者らが RNAseq を行い、1細胞期胚ではスプライシングがなされていないことを発見し、イントロンを検出することで受精後の1細胞期胚で新たに転写される遺伝子を同定することができた(母性 mRNA はスプライシングされているのでイントロンをほとんど有していない)。そしてこの成果により、初めて遺伝子発現プログラムの解明に向けた基盤が整った状態となっていた。

2. 研究の目的

受精直後の1細胞期胚では遺伝子発現が停止した状態にあるが、その後一定時間経過した後最初の遺伝子発現が起こる。そしてその後、発現パターンを大きく変化させながら発生が進行していく。この発現パターンの変化は発生を順調に進行させるために厳密にプログラムされているもの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。そこで本研究では、受精後の遺伝子発現プログラムの実態、更にはその調節機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

これまでの知見などから、プログラムを規定する要素として次の3つが考えられる。

(1)発生イベント: 1細胞期から2細胞期、4細胞期と発生する段階、さらにはこれらのステージにおける DNA 合成、有糸分裂などのイベントによって遺伝子の発現パターンを変化させていくというものである。これまでに、1細胞期の分裂期、あるいは2細胞期の DNA 複製を介して遺伝子発現パターンが大きく変化することが報告されている。

(2)Zygotic Clock: 発生イベントとは関係なく、受精後又はある発生時期からの経過時間が遺伝子発現プログラムの進行に関わっているという考えである。その根拠となっている実験は次のようなものである。8~16細胞期には、コンパクションと呼ばれる細胞同士の接着現象が起こるが、4細胞期胚の DNA 複製を阻害して発生を4細胞期で止めたのにも関わらず、一定時間経過後に(コントロール胚が16細胞期に到達した時間に)コンパクション様の変化が観察された。

(3)段階的变化: 最初に発現した遺伝子産物が次の発現を引き起こし、これが順次続くことでプログラムが進行していくという概念である。このようなプログラムの進行が最も蓋然性があると考えられるが、実際には、この可能性を示す研究結果はこれまで報告されていない。

以上、本研究計画では(1)~(3)の要因について解析を行い、各遺伝子が各発生時期でこれらのどの要因によって発現調節されているのかを明らかにする。

以下に具体的な実験計画・方法を示す。

実験材料としては、マウスの着床前初期胚を用いる。発生時期としては、受精直後の1細胞期から胚盤胞期までを対象とする。上記のプログラムを規定する3つの要素について、それぞれを抑制することで遺伝子発現パターンがどのように変化するのかを RNA シーケンス(RNAseq)で解析することで、その遺伝子発現プログラムへの関与を明らかにする。以下に各要素の抑制について具体的な実験方法の概要を記す。

(1)発生イベント

DNA polymerase の阻害剤である aphidicolin 及び M 期促進因子の阻害剤である roscovitine を1、2あるいは4細胞期に作用させ、その後の遺伝子発現の経時的変化を RNAseq により調べる。

(2)Zygotic Clock

1、2および4細胞期胚に M 期促進因子の構成要素である cyclin B の siRNA を顕微注入し発生

の進行を止めて、その後の遺伝子発現の経時的变化を RNAseq により調べる。発生が停止しているにもかかわらず、遺伝子発現の変化が通常通りに起これば、プログラムに Zygotic Clock が関与していることが強く示唆される。

(3)段階的变化

RNA polymerase IIの可逆的阻害剤を各ステージの胚に一過的に作用させることで転写を一時停止させる。その後試薬を除いて転写を再開させた後の遺伝子発現パターンを調べる。

4. 研究成果

全体の研究計画は、まず、プログラムを規定する要素として、(1)発生イベント、(2)Zygotic Clock、(3)段階的变化、の3つを想定し、これらを抑制することで遺伝子発現パターンがどのように変化するのかを RNA シーケンスで解析し、次いで、その変化の様相を解析することで、遺伝子発現プログラムの全貌解明へのマイルストーンとするというものである。以下に年度ごとの研究成果を記す。

(1)平成 29 年度においては、まず蓋然性は高いがこれまでその可能性を示す研究結果が報告されていない、(3)段階的变化について調べた。すなわち、1細胞期から2細胞初期まで一過的に RNA polymerase II の可逆的阻害剤である DRB で処理し、受精後の最初に起こる遺伝子の活性化、minor zygotic gene activation (minor ZGA)を抑制する実験を行った。この間、minor ZGA は抑制されるが、発生後の時間は経過し(2)zygotic clock は進行)、また母性 mRNA の調節による発生も進行する(1)発生イベントも進行)。したがって、この実験は純粋に遺伝子発現プログラムが「(3)段階的变化」によるものであるかを調べるために有効なものであると言える。その結果、DRB を含む培地からこれを含まない培地に戻された2細胞期胚は転写を開始したが、本来 minor ZGA に続く major ZGA が見られる2細胞後期において、minor ZGA が起こることが明らかとなった。この結果により、遺伝子発現プログラムの開始時期においては、minor ZGA から major ZGA へと段階的に遺伝子発現を変化させていくことが明らかとなった。

(2)平成 30 年度には、(1)発生イベント、特に DNA 複製による遺伝子発現調節についての検討を行うことにした。これまでの報告で、特に2細胞期の DNA 複製によりクロマチン構造が緩んだものから締まったものへと変化し、それが minor ZGA から major ZGA への変化に関わっているということが示唆されている。そこで、2細胞期の DNA 複製に着目して、その遺伝子発現の調節への関与を調べることにした。すなわち、2細胞期胚を DNA 合成酵素の阻害剤である aphidicolin で処理した胚とコントロール胚における遺伝子発現を RNAseq により網羅的に解析した。その結果、aphidicolin 処理により、2細胞期に発現が上昇する数千の遺伝子の発現が抑制され、一方で1細胞期で発現が一過的に上昇し2細胞期で発現が減少する数百の遺伝子の発現が2細胞期でも確認された。以上の結果より、2細胞期の DNA 複製が minor ZGA から major ZGA への変化に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- Abe, K.-I., Funaya, S., Tsukioka, D., Kawamura, M., Suzuki, Y., Suzuki, M.G., Schultz, R.M. and Aoki, F. (2018) Minor zygotic gene activation is essential for mouse preimplantation development, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 115, E6780-E6788. (査読有)
- Funaya, S. and Aoki, F. (2017) Regulation of zygotic gene activation by chromatin structure and epigenetic factors. J. Reprod. Dev., 63, 359-363. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

- 青木不学：受精前後における遺伝子発現とヒストン変異体の変化について。第41回分子生物学会年会、横浜、2018年11月30日(招待講演)
- 青木不学：卵の Quality (成熟能・発生能)に関わる因子について。A-PART 学術講演会、東京、2018年3月25日(招待講演)
- 青木不学：1細胞期胚の雌雄前核におけるヒストン H3 変異体の非対称的局在について。第40回分子生物学会年会、神戸、2017年12月8日(招待講演)
- Funaya S & Aoki F.: The involvement of linker histone variant H1foo in the chromatin remodeling during the 1 and 2-cell stages in mouse embryos. Fourth World Congress of Reproductive Biology, Naha September 28, 2017.

〔図書〕(計 1件)

青木不学 (2019) 卵割と胞胚形成、「発生生物学」、pp48-55、塩尻信義、弥益恭、加藤容子、中尾啓子編、培風館

〔その他〕

ホームページ等

http://www.k.u-tokyo.ac.jp/info/entry/22_entry657/

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。