

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05226

研究課題名（和文）DNAメチローム改変によるニワトリのエピゲノム育種

研究課題名（英文）DNA methylome analysis of chicken primordial germ cells for epigenetic breeding

研究代表者

金岡 英徳（Kaneoka, Hidenori）

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：30631973

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではニワトリ始原生殖細胞のエピジェネティクスの状態を蛍光イメージングにより解析するために、環境ストレス（DNA損傷）を検出するプローブを新たに開発した。本研究で開発した新規プローブのシグナルはDNA損傷マーカーと高い局在を示した。このプローブを改変しシグナル部位をラベル化すれば、外部環境の変化に影響を受けやすいゲノム領域を同定でき、育種に有用なエピゲノム領域の同定につながると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA損傷を検出するために修復因子RAP80と翻訳後修飾因子SUMOを利用したBiFCプローブを開発し解析を行った。BiFCプローブは外部から薬剤によるDNA損傷を与えなくても蛍光シグナルを発しており、内在的に起こる微弱なDNA損傷を検出していることがわかった。これまで免疫染色等の手法を用いなければ検出できなかった損傷を本研究で開発したBiFCプローブを用いることで、より明確に検出することができた。また、BiFCプローブの局在はDNA損傷によりダイナミックに変化していることがわかり、DNA修復の基礎的解析に利用できる可能性もある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop new probes to detect environmental stress (DNA damage) to analyze the epigenetic status of chicken primordial germ cells (PGCs) by fluorescence imaging.

We designed BiFC (Bimolecular fluorescence complementation) probes utilizing repair factor RAP80 and post-translational modification factor SUMO and analyzed to detect DNA damage foci. The BiFC probe signal showed high localization with the DNA damage marker H2AX, successfully detecting DNA repair foci. If we could label the BiFC signal sites with this probe, it is expected to identify genomic regions that are more susceptible to environmental changes, leading to the identification of epigenomic regions that are useful for breeding.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：蛍光イメージング DNA修復

1. 研究開始当初の背景

CRISPR/Cas9 を代表とするゲノム編集技術が進歩し、今では栄養価の高いトマトや褐変しにくいマッシュルームなど様々な食料品への応用が始まっている。しかし、家禽としてのニワトリにおける重要な経済形質(成長率、産卵数、病気に対する抵抗性等)は量的形質で複数の遺伝子座により支配され、単一の遺伝子を変異させるだけで改変することは難しい。そこで本研究ではエピジェネティクスに着目した。エピジェネティクスとは DNA 塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御機構であり、複数の遺伝子座を同時に制御し得る。

これまでの生物学ではエピジェネティックに獲得した形質は、子孫に継承されないと考えられてきた。遺伝子に書き込まれたエピジェネティックな情報は生殖細胞の分化過程でリプログラミングを受けるためである。しかし、近年になってその通説を覆すような事象がいくつも報告されている。生活習慣や環境ストレスにより変化したエピジェネティックな形質は、生殖細胞を通じて子孫へ継承される可能性が示されている [Lempradl A. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2019]。しかし、鳥類の生殖細胞におけるリプログラミングやエピジェネティクスの遺伝に関する研究は、哺乳類と比較して大きく遅れている。

2. 研究の目的

ニワトリの始原生殖細胞 (Primordial germ cell: PGC) は長期培養が可能で、移植実験により生殖巣への移動・定着や分化の関する解析を行うことができ、最終的には子孫を得て解析できる点が非常に特徴的である。この特徴を最大限に活かして、ラベル化した PGC を移植し、その後の分化を追跡、エピゲノム (DNA メチローム) の変化を観察することにより、鳥類において「エピジェネティクスの遺伝やリプログラミングがあるのか?」また「環境変化の影響を後代に継承することができるエピジェネティックマークにはどのようなものがあるのか?」を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ニワトリ PGC の DNA メチル化解析

細胞での DNA メチロームの全体像を捉える手法として、メチル化 DNA 結合タンパク質の MBD (methyl-CpG-binding domain) と蛍光タンパク質を融合し、可視化する方法が開発されている [Ueda et al. *Stem Cell Reports* 2014]。この技術をニワトリ PGC に応用し、DNA メチル化のイメージングを行う。さらに蛍光ラベルした PGC を移植・再分離を行い、マーカー遺伝子の DNA メチル化を詳細に解析して、鳥類におけるエピジェネティクスのリプログラミング機構の検証を行うこととした。

(2) 環境ストレスによるニワトリ PGC の DNA メチル化への影響

母体が受けた環境ストレスはその子孫のエピゲノムに様々な影響をもたらす。その影響は子供世代(F1)だけではなく、時として生殖細胞を通じて孫世代(F2)へ伝播する。ニワトリの場合、胚は卵殻により母体から独立しているため、環境ストレスの影響は主に卵黄に含まれる母体成分(卵黄ホルモンなど)により、胚へと伝わる。そこで卵中で起こるエピゲノム変化をニワトリ PGC 培養下で再現する。さらに、そのような培養条件で培養した PGC を移植し、DNA メチル化の変化を経時的に追跡することで環境変化の影響を後代へ伝えることができるエピジェネティックマークにはどのようなものが存在するのかを解析するために、環境ストレスを検出するタンパク質プローブの作製を行うこととした。DNA 二本鎖切断 (DNA double-strand break: DSB) の修復の際に形成される DNA 修復 foci を標的とし、この foci を感度高く可視化する蛍光プローブの開発をおこなった。

4. 研究成果

(1) ニワトリ PGC の DNA メチル化解析

DNA メチル化を検出するレポーターとして、MBD と蛍光タンパク質 mCherry を融合したコンストラクト (mCherry-MBP) を作製した。ニワトリ細胞株 DF-1、LMH に導入後、DNA メチル化阻害剤 5-Azacytidine で処理すると蛍光の減弱が観察されたが、バックグラウンドが高かったため、より検出感度を向上させるために融合させる位置やリンカー長などを検討したが改善には至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kojima Yusuke, Okuzaki Yuya, Nishijima Ken-ichi, Moriwaki Shuichiro, Asai Seiya, Kaneoka Hidenori, Iijima Shinji	4. 巻 131
2. 論文標題 Regulatory mechanism of chicken lysozyme gene expression in oviducts examined using transgenic technology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 453 ~ 459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.11.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horie Masanobu, Yamano-Adachi Noriko, Kawabe Yoshinori, Kaneoka Hidenori, Fujita Hideaki, Nagamori Eiji, Iwai Ryosuke, Sato Yasushi, Kanie Kei, Ohta Seiichi, Somiya Masaharu, Ino Kosuke	4. 巻 133
2. 論文標題 Recent advances in animal cell technologies for industrial and medical applications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 509 ~ 514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2022.03.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金岡 英徳、渡邊 愛梨、深田 梨沙子、田代 佑輝、清中 茂樹
2. 発表標題 DNA損傷応答を可視化する分割蛍光タンパク質レポーターの開発
3. 学会等名 第35回日本動物細胞工学会2022年度大会 (JAAC2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊 愛梨、深田 梨沙子、田代 有輝、金岡 英徳、清中 茂樹
2. 発表標題 DNA修復機構における核内相分離構造体を可視化可能な新規蛍光プローブの開発
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金岡 英徳、渡邊 愛梨、田代 有輝、深田 梨沙子、清中 茂樹
2. 発表標題 分割蛍光タンパク質プローブによるDNA損傷応答イメージング
3. 学会等名 第53回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深田梨沙子、渡邊愛梨、金岡英徳、清中茂樹
2. 発表標題 RAP80-SUMO相互作用が制御するDNA修復fociの動態解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金岡英徳、深田梨沙子、渡邊愛梨、清中茂樹
2. 発表標題 核内相分離構造形成メカニズムの解明(1):新規タンパク質プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊愛梨、深田梨沙子、金岡英徳、清中茂樹
2. 発表標題 核内相分離構造形成メカニズムの解明(2):可視化プローブを用いたDNA修復fociの解析
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金岡英徳
2. 発表標題 生体機能を調節するタンパク質翻訳修飾の解析
3. 学会等名 動物細胞工学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 深田梨沙子、小川大輝、神谷凌、金岡英徳、清中茂樹
2. 発表標題 DNA二重鎖切断修復でのfoci形成におけるSUMOタンパク質の機能解明
3. 学会等名 第 43 回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 深田梨沙子、小川大輝、神谷凌、金岡英徳、清中茂樹
2. 発表標題 DNA修復機構解明を目指した分割蛍光タンパク質プローブによる細胞内イメージング
3. 学会等名 iACEシンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深田梨沙子、小川大輝、神谷凌、金岡英徳、清中茂樹
2. 発表標題 DNA修復部位の可視化・制御機構解明を目指した蛍光タンパク質プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第101春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	西島 謙一 (Nishijima Ken-ichi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------