

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15700

研究課題名（和文）ラット初期胚を用いたヒトと共通する胚性ゲノム活性化機構の探索

研究課題名（英文）Identification of the common mechanism of zygotic genome activation in humans using early rat embryos

研究代表者

守田 昂太郎 (Morita, Kohtaro)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：80826545

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ラット初期胚のRNA-Seqを行ったところ、2から4細胞期の中に転写転写産物が大きく変わることが分かった。そこで2細胞期における転写機構を調べるために2細胞期において発現量の高い遺伝子を調べた結果、転写活性に関与するH3K27acのシャペロンであるBrdtが上位に検出された。また、H3K27acが転写活性化の時期に大規模に変化していた。そこで、Brdtを過剰発現させた結果、2細胞期で5-EUのシグナルの上昇が認められた。マウスでは、Brdtの発現レベルは受精卵で高くなり、2細胞期で著しく低下するため、マウスとラットの胚性ゲノムの活性化のタイミングにも重要な働きをしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスの胚性ゲノム活性化機構は2細胞期で生じ、ラットやヒトなどと異なる。胚性ゲノムの活性化は全能性獲得に必須とされ、このタイミングを制御する分子機構の解明は重要である。本研究では、胚性ゲノム活性化のタイミングの制御に関与していると考えられるBrdtの同定に成功した。本研究は、マウス以外の4～8細胞期で胚性ゲノムが活性化する分子機構とそのタイミングが異なる生物学的意義を解明する糸口になると考えられる。今後の発展として、胚の初期化機構の解明や繁殖技術の向上に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：RNA-Seq of early rat embryos showed that transcriptional transcripts change significantly between the 2- and 4-cell stages. Therefore, to investigate the transcription mechanism at the 2-cell stage, genes with high expression levels at the 2-cell stage were examined, and Brdt, a chaperone of H3K27ac involved in transcriptional activity, was detected at the top rank of the list. In addition, H3K27ac was massively altered at the time of transcriptional activation. Therefore, overexpression of Brdt resulted in an increase in 5-EU signalling at the 2-cell stage. As Brdt is transiently up-regulated in fertilised eggs and markedly down-regulated at the 2-cell stage in mice, the expression pattern of Brdt is different in mice and rats, suggesting that it may also play an important role in the timing of embryonic genome activation.

研究分野：実験動物学

キーワード：胚性ゲノム活性化 ラット マウス エピゲノム

### 1. 研究開始当初の背景

我々を含む有性生殖動物は、分化を終えて成熟した精子と卵子の受精から生じるが、受精卵は、全ての細胞へ分化する能力(全能性)を有した状態へ変化する。その間、DNAのメチル化やヒストンのメチル化・アセチル化などのエピゲノムが変化し、胚由来の遺伝子がゲノム上の至る所で発現することが知られており、この現象は胚性ゲノムの活性化(Zygotic Genome Activation: ZGA)と呼ばれる。ZGAは全能性獲得の過程で必須とされ、このZGAを引き起こす機構の研究がマウスを中心として現在も盛んに行われている。しかしながら、ヒト、ブタ、ウサギ、ヒツジ、ウシなどでは4~8細胞期でZGAが生じるのに対し、マウスでは2細胞期から主に生じるため、マウス特異的なZGA開始機構の存在が知られている(Jukam et al., 2017, Schulz and Harrison, 2018)。そのため、ZGAに関してはマウスで得られた知見をそのままヒトに外挿できないと考えられる。したがって、ヒトのZGAを解析するためには、ヒトと同様のタイミングでZGAが起こる汎用性の高い動物種が望まれる。最近我々は、生殖工学技術が遅れていたラットで安定した発情期の同期化・過剰排卵の誘起及び体外受精技術の確立に成功し(Honda et al., 2019)、ラット体内及び体外受精胚のZGAがヒトのように4~8細胞期で生じていることを明らかにした。以上のように、ヒト胚を用いた全能性獲得機構に関する研究は倫理上困難であるが、ラット胚を用いることで、ヒト胚に共通したZGA開始機構を明らかにできる可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究では、4~8細胞期で活性化されるラット及びヒトのZGAに共通した開始機構が存在するかどうかを明らかにすることを目的とする。将来的に、ヒトのZGA開始機構の解明に繋がり、ヒトの不妊治療や家畜動物等の繁殖効率の改善へ貢献するだけでなく、リプログラミング機構の解明による、ヒトiPS細胞等の多能性細胞の作出効率の改善が期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) RNA-Seq解析による胚性ゲノム活性化時に発現する遺伝子の同定

胚性ゲノムの活性化時に発現している遺伝子を同定するために、ラット初期胚(未受精卵、受精卵、2細胞期胚、4細胞期胚、8細胞期胚、桑実胚)を用いてRNA-Seq解析を行った。

#### (2) 胚性ゲノム活性化時に機能するヒストン修飾の同定

転写活性に関与するヒストン修飾を調べ、そのヒストン修飾が制御する転写機構に関与するタンパク質の機能を抑制することで胚発生に及ぼす影響を調べた。また、そのタンパク質を過剰発現させることで転写活性を促進するかどうかを調べた。

### 4. 研究成果

ラット初期胚のRNA-Seqを行ったところ、未受精卵、受精卵、2細胞期胚の3つのステージの時期は発現する遺伝子の相関が高く、4細胞期以降とは異なっていた(図1)。また、4細胞期胚、8細胞期胚、桑実胚の3つのステージで発現する遺伝子の相関が高かった(図1)。このことから、2細胞期から4細胞期の間に転写転写産物が大きく変わることが分かった。

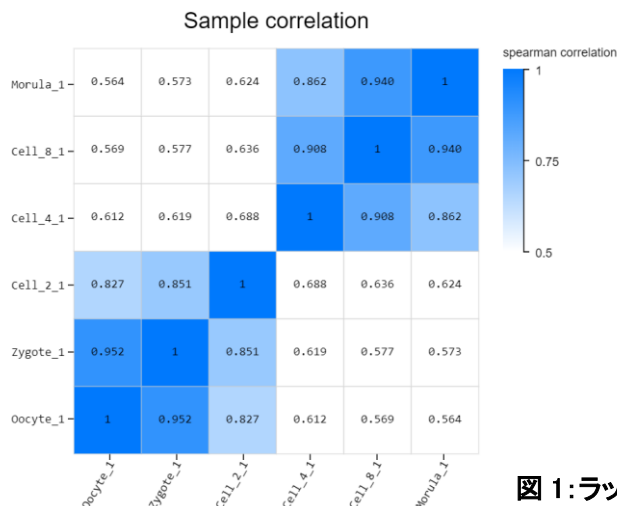


図1:ラット初期胚における転写産物の相関図

そこでまず、転写産物が大きく変化する直前の 2 細胞期胚に着目し、2 細胞期において発現量の高い遺伝子を調べた結果、転写活性に関与する H3K27ac のシャペロンである BET ファミリータンパク質のひとつである Brdt が上位に検出された。また、H3K27ac の局在プロファイル調べたところ、H3K27ac のシグナルはラットの受精卵と 2 細胞期胚で検出され、胚性ゲノムの活性化が積極的に起こる 4 細胞期、8 細胞期、桑実胚ではほとんど検出されなくなった (図 2)。マウス胚において H3K27ac のシグナルは、受精卵でわずかに検出され、2 細胞期胚ではほとんど検出されなくなった (図 2)。これらの結果は胚性ゲノムの活性化が起こるタイミングとそれぞれ逆相関の関係にあることがわかった。

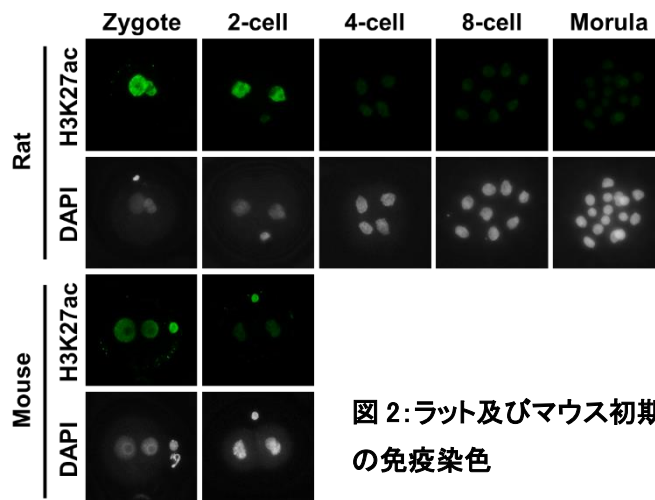


図 2: ラット及びマウス初期胚における H3K27ac の免疫染色

H3K27ac はこれまで転写活性に関与することが一般的に知られているが、転写活性時には活性化領域で検出されなくなる特徴があるが、詳しいことは明らかになっていない。そこで、ヒストンシャペロンである BET ファミリータンパク質が H3K27ac を認識して転写活性ユニットを活性領域へ導く仮説を立て、BET ファミリータンパク質の阻害剤である JQ-1 を培地に添加してラット受精卵を体外培養した結果、ラット受精卵は 2 細胞期で発生が停止することが明らかになった (図 3)。さらに、BET ファミリータンパク質の阻害を行うため、BET ファミリー遺伝子である Brd2、Brd3、Brd4、Brdt mRNA に対する siRNA を受精卵に顕微注入して胚発生を観察したところ、それぞれ単独のノックダウンでは胚発生の阻害は認められなかったが、4 種類全てを顕微注入したところ胚発生が阻害された (図 4)。このことからラットの初期発生において BET ファミリータンパク質の機能は重要であり、BET ファミリータンパク質がそれぞれの機能を補完し合う可能性が示唆された。

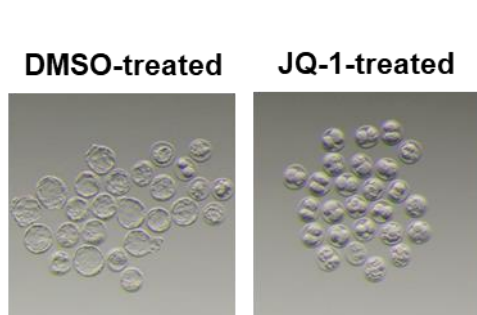


図 3: JQ-1 処理がラット初期胚の発生に及ぼす影響

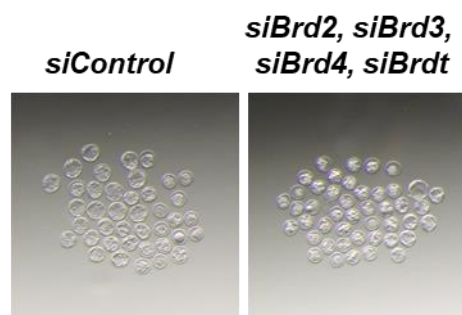
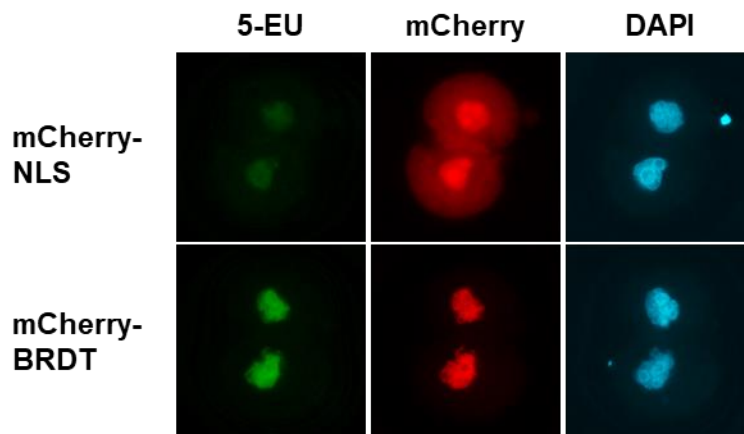


図 4: BET ファミリー遺伝子のノックダウンがラット初期胚の発生に及ぼす影響

次に、BET ファミリータンパク質が胚性ゲノムの活性化に関与しているかどうかを調べるために mCherry-Brdt mRNA を合成し、受精卵に顕微注入して過剰発現させた結果、2 細胞期で 5-EU のシグナルの上昇が認められた (図 5)。マウスでは、Brdt の発現レベルは受精卵で高くなり、2 細胞期で著しく低下するため、マウスとラットの胚性ゲノムの活性化のタイミングにも重要な働きをしている可能性が示唆された。



**図 5:mCherry-BRDT の過剰発現による  
胚性ゲノム活性化へ及ぼす影響**

マウスでは、Brdt は 1 細胞期に一過性に発現し、2 細胞期以降は減少する。一方で、ラット胚は 2 細胞期で Brdt の発現がピークとなり、マウスと発現する時期が異なる。以上のことから、Brdt の発現上昇のタイミングが胚性ゲノムの活性化の時期を決める上で重要な働きをしている可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morita Kohtarō, Hatanaka Yuki, Ihashi Shunya, Asano Masahide, Miyamoto Kei, Matsumoto Kazuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Symmetrically dimethylated histone H3R2 promotes global transcription during minor zygotic genome activation in mouse pronuclei	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-89334-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Morita Kohtarō, Honda Arata, Asano Masahide	4. 巻 2637
2. 論文標題 A Simple and Efficient Method for Generating KO Rats Using In Vitro Fertilized Oocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genome Editing in Animals. Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 233 ~ 246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-3016-7_18	査読の有無 無
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11件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 守田昂太郎
2. 発表標題 5.H3R2me2sはH3K4のメチル化と共にマウス受精卵の胚性ゲノム活性化に関与する
3. 学会等名 医薬系研究交流サロン
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 PRMT5及び7によって修飾されるH3R2me2sはマウス受精卵のminor ZGAに重要である
2. 発表標題 守田昂太郎、畑中勇輝、井橋俊哉、浅野雅秀、宮本圭、松本和也
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 守田昂太郎、畑中勇輝、井橋俊哉、浅野雅秀、宮本圭、松本和也
2. 発表標題 PRMT5及びPRMT7によって修飾されたH3R2me2sはマウス受精卵の胚性ゲノム活性化に関与する
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 守田昂太郎、本多新、森田健斗、笹岡佳生、浅野雅秀
2. 発表標題 ラット初期胚の転写活性化時期におけるエピゲノムの動態
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 守田昂太郎
2. 発表標題 ラット生殖工学基盤技術開発によるリソース保存の効率化と新規利用者の拡大
3. 学会等名 ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) : 基盤技術整備プログラム成果発表 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 守田昂太郎
2. 発表標題 ラットリソース業務の効率化と利用者拡大に向けた生殖工学技術の開発
3. 学会等名 第15回ラットリソースリサーチ研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 守田昂太郎
2. 発表標題 Growth hormone receptorを欠損させたマイクロミニラットの開発
3. 学会等名 第14回ラットリソースリサーチ研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 守田昂太郎、本多新、森田健斗、笹岡佳生、浅野雅秀
2. 発表標題 H3K27acはラットの初期発生に重要である
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 守田昂太郎
2. 発表標題 ラットの体外受精を利用した業務の効率化と利用者拡大
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 守田昂太郎
2. 発表標題 NBRP-Ratにおける凍結保存精子からの個体復元法
3. 学会等名 第16回ラットリソースリサーチ研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 守田昂太郎、本多新、森田健斗、笹岡佳生、浅野雅秀
2. 発表標題 ラット初期胚における転写機構の探索
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」  
[http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/nbr/Default\\_jp.aspx](http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/nbr/Default_jp.aspx)  
 京都大学大学院医学研究科 実験動物学分野研究室  
<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/research/index.html>  
 受精卵の発生に重要な因子を発見 - ヒストンのアルギニンメチル化が重要 -  
<https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2021-05-13>  
 受精卵の発生に重要な因子を発見 ヒストンのアルギニンメチル化が重要  
<https://newscast.jp/news/5871537>  
 researchmap  
<https://researchmap.jp/kohtaro.morita>

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

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
---------	---------