

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2010～2014

課題番号：22228004

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた生殖系列のエピゲノム修飾とトランスクリプトーム解析

研究課題名(英文)Analysis of Epigenome Marks and Transcriptome in the Germ Line by the Next Generation Sequencer

研究代表者

河野 友宏 (Kono, Tomohiro)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：80153485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 167,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウス生殖系列におけるDNAメチル化リプログラミングの全容解明に向け、次世代シーケンサーを用いて全シトシンの包括的メチル化解析およびトランスクリプトーム解析を実施した。卵子・精子では30%および80%であったDNAメチル化は、受精後脱メチル化を受け胚盤胞では18%に減少した。着床後E7.5エピブラストでは73%に急上昇したが、その後始原生殖細胞では急速に減少しE13.5では5%以下となった。トランスクリプトーム解析は、生殖系列におけるDNAメチロームを反映した遺伝子発現調節の実態を明らかにした。本研究は生殖系列全体のDNAメチロームおよびトランスクリプトームの全貌を初めて提示した。

研究成果の概要(英文)：To clarify DNA methylation reprogramming and transcriptome in the whole female and male germline lineage in mice, a comprehensive DNA methylation analysis for all cytosine was conducted using a next-generation sequencer. DNA methylation was 30% and 80% in the oocytes and sperm, respectively. After fertilization the level decreased and reached to 18% at the blastocysts, however, in the E7.5 epiblast, the DNA methylation was quickly increased to 73%. In the primordial germ cells, which are differentiated at this stage, demethylation occurred rapidly, and the methylation level decreased to less than 5% in both sexes at E13.5. Subsequently, female- and male-specific DNA methylomes were established independently in the spermatogonium before birth and during oocyte growth period, respectively. Transcriptome analysis revealed that DNA methylation is a critical regulator of gene expression in germline cells. This is the first report of a complete DNA methylome map of the whole germline in mice.

研究分野：生殖科学

キーワード：DNA メチローム 生殖系列 次世代シーケンサー トランスクリプトーム 始原生殖細胞 生殖細胞
リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

(1) 生殖細胞における機能獲得機構の解明は、動物生産学、生殖医科学あるいは発生生物学の根幹をなす普遍的な重要研究課題に位置づけられる。基礎および応用面から、生殖細胞の機能解析、高度利用ならびに生殖医療を目標とした膨大な研究が行われていた。さらに分子生物学を基盤とした研究成果は、生殖細胞の機能解析にエピジェネティクス概念を導入し、全く新しいパラダイムの創成が始まった。生殖細胞科学における新たな研究の展開が大いに期待されていた。

(2) 我々は、雌雄生殖細胞である精子および卵子のゲノムが正常に機能して個体形成を達成するには、卵子および精子に特異的なDNAメチル化修飾の獲得が不可欠であることを実証していた (Hiura et al., FEBS letters 2006; Kono et al., Nature genetics 1996; Nature 2004; Kawahara et al., Nature Biotechnology 2007)。しかしながら、研究構想時点における研究成果は生殖系列におけるエピゲノム研究の端緒に過ぎず、生殖系列におけるエピゲノム修飾機構の全貌解明が強く望まれていた。

(3) 一方、ゲノム解析機器および技術の進歩は目覚ましく、特に次世代シーケンサーの出現は革命的展開をもたらし、全ゲノムを対象としたDNAメチル化解析を可能とした。すでに世界的な競争が始まっており、さらに熾烈化することは明白であった。したがって、全ゲノムを対象としたエピゲノム研究を早急に展開し、生殖系列におけるリプログラミングと生殖細胞機能獲得の解明に貢献することが強く望まれていた。

2. 研究の目的

(1) 本研究は哺乳類の生殖細胞ゲノム機能制御に必須のエピゲノム情報、特にDNAメチル化修飾の生殖系列(初期胚および胎仔を含む)における成立過程の全容解明と転写制御の解明を目的とし、マウス生殖系列細胞におけるゲノムDNAメチル化情報の全貌解明を提案した。マウスゲノムには遺伝子発現調節領域を中心に存在している 2100×10^4 のCpGサイトのDNAメチル化状態を明らかにすることを意味している。

(2) そこで、雌雄生殖系列細胞ゲノムDNAの非メチル化シトシンをウラシルへ変換処理し、次世代シーケンサーを用いた大量シーケンセスを行い、リード配列のマッピングおよび集計、解読情報のデータベース化を推

進する。

(3) また、生殖系列細胞および胚で転写される全 mRNA のシーケンスにより遺伝子の発現レベルを定量解析し、DNAメチル化による遺伝子発現制御について検討する。

(4) 次世代シーケンサーを用いた解析結果を統合的に整理し、生殖細胞ゲノム機能を制御するDNAメチル化確立と遺伝子発現制御の相関を俯瞰しようとした。哺乳類の雌雄生殖系列におけるDNAメチル化のリプログラミングとエピゲノムの役割の理解が可能となる。

3. 研究の方法

(1) 生殖系列細胞(卵子、精子、始原生殖細胞、初期発生胚およびES細胞)はすべてC57BL/6N系統マウスから採取した。なお、始原生殖細胞(PGC)は、GFP-Oct4遺伝子を導入した遺伝子改変マウスから、セルソーター(BD FACS Aria™, ベクトン・ディッキンソン社)を用いて分取して供試した。

(2) DNAメチル化解析には、研究当初はMethylC-seq法を、また後半では改良されたPBAT法(Post Bisulfite Adaptor Tagging)を用いた。DNAサンプルはバイサルファイト処理し、イルミナ社が提供するキットを用いてライブラリー作製した。トランスクリプトーム解析は、卵子、精子、始原生殖細胞およびES細胞からRNAを回収し、cDNA合成後断片化してシーケンス用ライブラリーを作製した。

(3) シーケンスはGenome AnalyzerおよびHiSeq2500(イルミナ社)を用いて実施し、必要十分なシーケンスデータを取得した。シーケンスデータは、マッピングツール“Bismark”を使用してマウスゲノムにマッピングした。また、イルミナのRNA-seq調整キットを使用して得られたトランスクリプトームデータは、独自のスクリプトによりマウスゲノムにマッピングしたのち、アノテーションされた遺伝子の各発現量RPKM値を測定した。

4. 研究成果

(1) 卵子および精子のDNAメチロームおよびトランスクリプトーム解析結果

精子、卵子、DnmtL-KO卵子、さらにES細胞のメチロームマップの作成に成功した(図1

)。卵子と精子のDNAメチロームデータの比較から、卵子型メチル化差異領域 (DMR) 329ヶ所および精子型DMR349ヶ所を同定した (図2)。さらにmRNA-seqによるトランスクリプトーム解析を実施し、マウス卵子においてmRNA転写量と遺伝子内のメチル化 (Gene-bodyメチル化) に強い正の相関性を見出した (図3) (PLoS Genetics, 2012)。この他、卵子では低率ではあるがnon-CpGサイトのメチル化が存在すること、およびレトロトランスポゾンが高メチル化されていることを明らかにした (PLoS Genetics, 2013)。

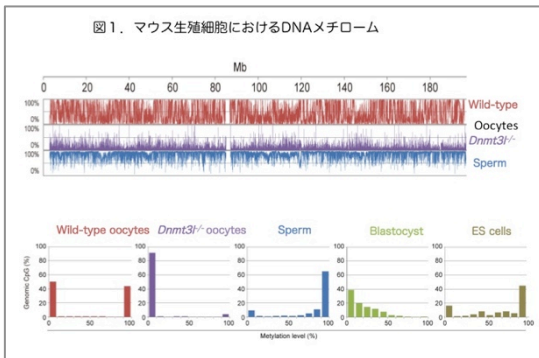


図1. マウス生殖細胞におけるDNAメチローム

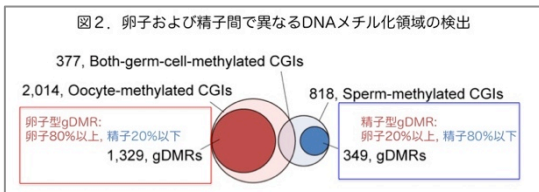


図2. 卵子および精子間で異なるDNAメチル化領域の検出

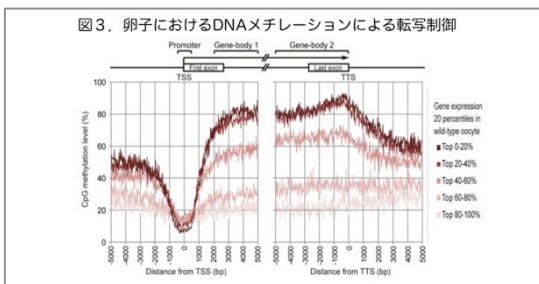


図3. 卵子におけるDNAメチレーションによる転写制御

(2) 始原生殖細胞におけるDNAメチロームおよびトランスクリプトーム解析結果

胎仔始原生殖細胞におけるメチローム解析では、胎齢10.5日、13.5日および16.5日の雌雄始原生殖細胞 (PGC) を用いて解析を実施した。これまでに、胎齢10.5日のPGCでは16-17%のCpGがメチル化されていたが、胎齢13.5日のPGCでは、2-3%にまで低下していることが判明した (図4) (Genome Res, 2013)。また、雌雄PGCはほぼ同様のメチル化状態を示していた。しかし、胎齢16.5日の雄PGCでは新規のメチル

化が生じ始め、31%にまで上昇した。一方、雌PGCでは変化は認められず、明確な雌雄差が形成されていた。また、E13.5PGCのトランスクリプトームでは雌雄間で異なる発現を示す遺伝子群を特定し、その機能解析から性分化のプロセスを明らかにした (図5) (投稿準備中1)。

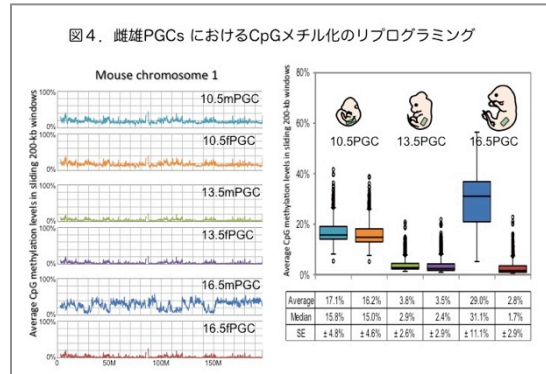


図4. 雌雄PGCsにおけるCpGメチル化のリプログラミング

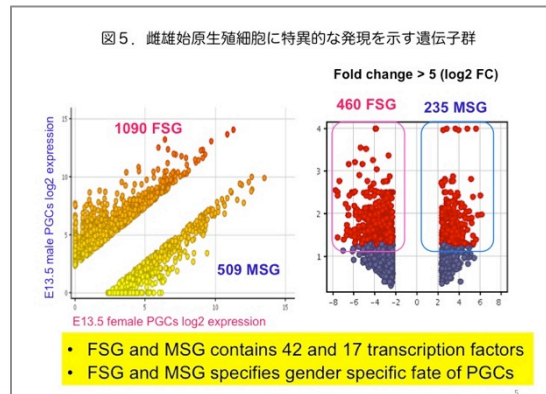


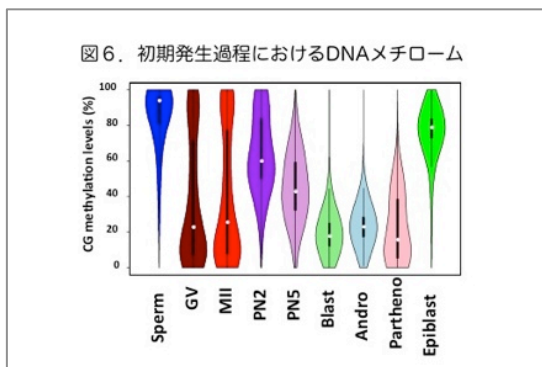
図5. 雌雄始原生殖細胞に特異的な発現を示す遺伝子群

- FSG and MSG contains 42 and 17 transcription factors
- FSG and MSG specifies gender specific fate of PGCs

(3) 初期発生過程におけるDNAメチローム解析結果

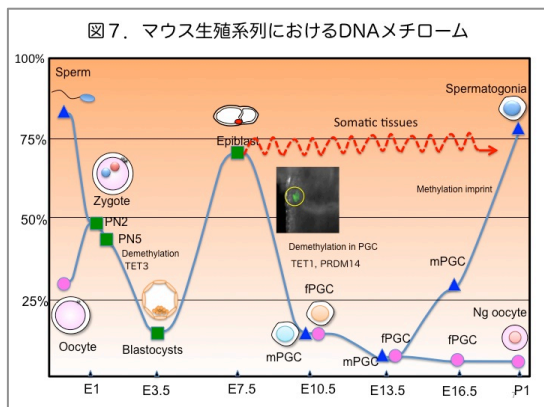
受精後の脱メチル化についても検証をすすめ、受精卵および初期胚のDNAメチロームマップの作成に着手した。また、脱メチル化に重要なDNA 5-hydroxymethylated cytosine (5hmC) を免疫染色法により検出し、成長卵子に至るまでに5hmCが生成されることを明らかにした (Genes to Cells, 2014)。受精直後から (主に父性ゲノムと考えられる) 脱メチル化は開始しており、DNAメチル化率は受精4時間後では45%、10時間後には34%にまで低下していた。その後さらに胚ゲノムの脱メチル化は進行し、胚盤胞では最低の18%にまで減少していた。しかし、着床後の発生・分化に伴いE7.5のエピブラストではDNAメチル化レベルは急速に上昇し73%にまで達した (図6)。一方、精子と卵子間で特定されたDMR (differentially methylated region) 数は、父性特異的メチル化領域が18ヶ所および母性特異的メチル

化領域が385ヶ所であった。興味深いことに、これらのDMRは胚盤胞においても維持される傾向があり、特にインプリント制御領域では30%程度のDNAメチル化が脱メチル化を免れ維持されていた（投稿準備中2）。



(4) 新しいDNAメチル解析法の開発
より正確で再現性が高いDNAメチル解析としてPBAT (post bisulfite adaptor tagging) 法の検証を実施した。この方法では、bisulfite 処理によるDNAの損耗が少ないこと、PCRによる増幅を行わないことの利点があり、より精度が高く、かつ少量(1000細胞)のDNA量で解析が可能であることを実証した (Methods Mol Biol, 2012)。また、より効率的かつ経済的にDNAメチル解析情報の取得が可能であるSureSelect (Agilent Technology社)を用いたターゲットメチル解析で精子ゲノムの解析を実施し、PBAT法と高い相関が得られるデータの取得が可能であることを示した。また、ターゲットメチル解析法を用いて体細胞クローン個体の精子のDNAメチル解析にも着手し、一部にDNAメチル化異常を確認する興味深い結果を得ることができた（投稿準備中3）。

(5) 総括



本研究の成果により、マウス生殖系列全体のDNAメチル解析の全貌を初めて把握することに成功した(図7)。今後、生殖科学領域をはじめとする生殖系列におけるエピゲノム研究の基盤情報として貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計17件)

① Takahashi N, Yamaguchi E, Kawabata Y, **Kono T**. Deleting maternal Gtl2 leads to growth enhancement and decreased expression of stem cell markers in teratoma. *J Reprod Dev*, 2015, 61(1): 7-12.

doi: 10.1262/jrd.2014-089.

② Sakashita A, **Kobayashi H**, Wakai T, **Sotomaru Y**, Hata K, **Kono T**. Dynamics of genomic 5-hydroxymethylcytosine during mouse oocyte growth. *Genes Cells*, 2014, 19(8): 629-636.

doi: 10.1111/gtc.12164.

③ **Kobayashi H**, Yanagisawa E, Sakashita A, Sugawara N, Kumakura S, Ogawa H, Akutsu H, Hata K, Nakabayashi K, **Kono T**. Epigenetic and transcriptional features of the novel human imprinted lncRNA GPR1AS suggest it is a functional ortholog to mouse Zdbf2linc.

Epigenetics, 2013, 8(6): 635-645.

doi:10.4161/epi.24887.

④ Shirane K, Toh H, **Kobayashi H**, Miura F, Chiba H, Ito T, **Kono T**, Sasaki H. Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases. *PLoS Genet*, 2013, 9(4): e1003439.

doi: 10.1371/journal.pgen.1003439.

⑤ **Kobayashi H**, Sakurai T, Miura F, Imai M, Mochiduki K, Yanagisawa E, Sakashita A, Wakai T, **Suzuki Y**, Ito T, Matsui Y, **Kono T**. High-resolution DNA methylome analysis of primordial germ cells identifies gender-specific reprogramming in mice. *Genome Res*, 2013 23(4): 616-627.

doi: 10.1101/gr.148023.112.

⑥ **Kobayashi H**, Sakurai T, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, **Kono T**. Imprinted DNA methylation reprogramming during early mouse embryogenesis at the Gpr1-Zdbf2 locus is linked

to long cis-intergenic transcription. FEBS Lett. 2012, 586(6): 827-833.

doi:10.1016/j.febslet.2012.01.059.

⑦ Kobayashi H, Kono, T. DNA methylation analysis of germ cells by using bisulfite-based sequencing methods. Methods Mol Biol, 2012, 825: 223-235.

doi: 10.1007/978-1-61779-436-0_17.

⑧ Kobayashi H, Sakurai T, Imai M, Takahashi N, Fukuda A, Obata Y, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Sotomaru Y, Suzuki Y, Kono T.

Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks. PLoS Genet, 2012, 8(1): e1002440.

doi: 10.1371/journal.pgen.1002440.

⑨ Takahashi N, Kobayashi R, Kono T.

Restoration of Dlk1 and Rtl1 is necessary but insufficient to rescue lethality in intergenic differentially methylated region (IG-DMR)-deficient mice. J Biol Chem, 2010, 285(34): 26121-26125.

doi: 10.1074/jbc.M109.075325.

⑩ 河野 友宏、DNAメチル化情報として生殖細胞に記憶される性差、科学、岩波出版、2014年7月号: 0773-0778.

[学会発表] (計 47件)

- ① 小林 久人、坂下 陽彦、若井 拓哉、小池 佐、佐野 賢、河野 友宏、マウス生殖細胞・初期胚のDNAメチローム解析、第37回日本分子生物学会大会、横浜、2014年11月26日
- ② 坂下 陽彦、中島 芽生、若井 拓哉、小林 久人、井関 陽介、河野 友宏、マウス初期胚における5hmCおよびH3K9me2の挙動とDNA脱メチル化制御機構、日本哺乳動物卵子学会、神戸ポートピアホテル、2014年5月17日
- ③ Hisato KOBATASHI, High-resolution DNA methylome analysis of mouse germ cells、International Symposium on “Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells”、World Congress of Reproductive Biology, Edinburgh (UK), 2014,9.3
- ④ Akihiko SAKASHITA, Yosuke ISEKI, Mei NAKAJIMA, Takuya WAKAI, Hisato KOBAYASHI, Tomohiro KONO, Genome-wide reprogramming by DNA demethylation during mouse oocyte growth and early development,

World Congress of Reproductive Biology, Edinburgh (UK), 2014,9.3

⑤ 河野 友宏、若井 拓也、水谷 英二、小林 久人、若山 清香、坂下 陽彦、三浦史仁、伊藤 隆司、体細胞クローンマウス精子のDNAメチレーションエラー、日本繁殖生物学会、帯広畜産大学、2014年9月22日

⑥ 小林 久人、坂下 陽彦、若井 拓哉、小池 佐、佐野 賢、河野 友宏、マウス生殖細胞・初期胚のDNAメチローム解析、第37回日本分子生物学会大会、横浜、2014年11月26日

⑦ 若井 拓哉、水谷 英二、小林 久人、若山 清香、坂下 陽彦、伊藤 隆司、三浦 史仁、河野 友宏、体細胞クローンマウス精子のDNAメチル化リプログラミング、日本分子生物学会、横浜国際展示場、2014年11月27日
その他 40件

[図書] (計 2件)

- ①河野 友宏 他、インターズー出版、性の分化、p122-133、2013
- ②河野 友宏 他、朝倉書店、哺乳動物の発生工学、p184-194、2014

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 友宏 (KONO, Tomohiro)
東京農業大学・応用生物科学部・教授
研究者番号: 80153485

(2) 研究分担者

外丸 祐介 (SOTOMARU, Yusuke)
広島大学・自然科学研究支援センター・教授、研究者番号: 90309352
鈴木 穰 (SUZUKI, Yutaka)
東京大学
新領域形成研究科・教授
研究者番号: 40323646

(3) 研究協力者

小林 久人 (KOBAYASHI Hisato)
東京農業大学・応用生物科学部・生物資源ゲノム解析センター・准教授
研究者番号: 70632727