

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22800084

研究課題名（和文） 着床に伴うダイナミックなエピジェネティック変化の包括的解析

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of epigenetic dynamics during the peri-implantation period in mouse

研究代表者

的場 章悟 (MATOBA SHOGO)

独立行政法人理化学研究所・遺伝工学基盤技術室・基礎科学特別研究員

研究者番号：20585202

研究成果の概要（和文）：

本研究では、着床時に起こるエピジェネティックな変化を理解することを目的とした。着床前後のマウス胚で、ヒストン修飾と遺伝子発現の変化を網羅的に解析した結果、胚領域・胚体外領域でのエピジェネティックな変化を包括的に捉えることに成功した。さらに、着床時に抑制性ヒストン修飾（H3K9me2）が大規模に低下することを見出し、この機構により体細胞クローン胚のエピジェネティック異常が一部正常化することを示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

Implantation is critical for the embryonic development in mammals. This study aimed to understand the dynamic change of the epigenetic status during implantation. Analyses of histone modifications and global gene expression in mouse pre- and post-implantation embryos successfully revealed the epigenetic dynamics during implantation. Specifically, we found that H3K9me2, suppressive histone modification, dramatically decreases during implantation and this decrease seems to normalize the epigenetic abnormalities in cloned mice generated by somatic cell nuclear transfer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：着床、エピジェネティクス、リプログラミング、ヒストン修飾、体細胞クローン

## 1. 研究開始当初の背景

着床は哺乳類独特の現象であり、母体組織である子宮と胚のダイナミックな相互作用を伴って胎盤形成へと向かう。これまでの着床研究からこの過程では、母体子宮内膜上皮と胚との異個体間の接着、さらに子宮内膜間

質層への浸潤、最終的には胚の免疫的受容、など非常に興味深い現象を伴うことが知られている。マウスの場合、着床時の胚は胚盤胞期にあり、細胞系譜はトロフォブラストとエピブラストに分かれている。着床に伴ってトロフォブラストは主に胎盤形成に向かう

一方で、エピブラストは胚体そのものの形成に向かう。

このようなダイナミックな形態変化の一方で、エピジェネティックな変化が起きていることが最近の研究から明らかになりつつある。XX 雌個体で起こる X 染色体のランダムな不活性化が着床のタイミングで起きており (Okamoto et al., 2004, Science; Mak et al., 2004, Science)、また、DNA メチル化酵素の 1 つである Dnmt3b の発現パターンが着床に伴ってダイナミックに変化することも最近報告された (Hirasawa et al., 2009, GEP)。このような事実から、着床に伴ってエピゲノムが大規模に変化することが示唆されるが、着床に伴うエピジェネティックな変化の詳細はほとんど明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

以上のような背景から、本研究の目的を哺乳類の着床に伴って起こるエピジェネティックな変化とその意義を包括的に理解することと設定した。

具体的には、マウスをモデルとして、着床前後胚の細胞系譜ごとのヒストン修飾の変化を免疫染色により確認し、グローバルなエピジェネティック変化を捉える。そして、エピゲノムの変化はすなわち遺伝子発現の変化へとつながると考えられるので、着床に伴った遺伝子発現の変化をマイクロアレイによって解析する。最終的にはこれらの情報をエピジェネティックな異常モデルである体細胞クローン胚と比較することで、着床前後のエピジェネティックな変化の生物学的意義にも迫りたい。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒストン修飾の免疫染色

マウス胚をモデルとし、着床前後でのグローバルなエピジェネティック変化を免疫染色によって解析する。具体的には抑制性ヒストン修飾として、H3K9 のメチル化、H3K27 のメチル化、活性化に働くヒストン修飾として H3K4 のメチル化を着床前の胚盤胞 (胎齢 3.5 日) と、着床後の胚 (胎齢 4.5、5.5、6.5 日) について解析する。

### (2) マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析

ヒストン修飾は遺伝子発現にダイレクトに影響を与えることが知られていることから、ダイナミックなヒストン修飾の変化はすなわち遺伝子発現の変化を引き起こすと考えられる。そこで、マウスの着床前胚 (胎齢 3.5 日) と、着床後胚 (胎齢 6.5 日) の遺伝子発現をマイクロアレイによって網羅的に解析する。特に着床後胚の場合、胚体領域 (エ

ピブラスト) と胚体外領域に大きな差が想定されることから、それぞれの領域を顕微鏡下で単離して解析に用いる。

今回用いるサンプルはいずれも微小であるため、抽出した RNA は *in vitro* transcription 法によって二段階で増幅してからマイクロアレイに供する。

### (3) 体細胞クローン胚でのエピジェネティック異常の変化

体細胞クローン胚ではエピジェネティックな異常が原因で様々な発生異常が起こるため、最終的な産仔率は 5% 以下にとどまる。その致死の最も多い原因は着床期の胚部の脱落である。そこで、着床に伴う大規模な変化が体細胞クローン胚では正常に行われず、これが着床期の脱落の原因になっている、という仮説を立て、上記の (1) (2) で見出した現象が体細胞クローン胚で正常に行われているかを免疫染色およびマイクロアレイにより解析する。

なお、最近申請者らのグループではクローン胚で Xist 遺伝子が活性 X 染色体から過剰発現してしまうという異常が必ず起こることを見出している。このような Xist 遺伝子の過剰発現は X 染色体のみならず常染色体上の遺伝子発現にも大きく影響を与えてしまうため、今回の実験では、この影響を排除するため、Xist 遺伝子座の一つをノックアウトしたマウスをドナーとして用いた。また、クローンに用いた元の体細胞種による影響をできる限り排除するため、ドナー細胞は卵丘細胞・セルトリ細胞・繊維芽細胞の 3 種類を用意し、それぞれからクローン胚を作出した。

## 4. 研究成果

### (1) 着床時に起こるヒストン修飾のグローバルな変動

まず、通常の外受精胚を用いて着床前後のヒストン修飾の変動を免疫染色によって解析した。抑制性ヒストン修飾として、H3K27me3、H3K9me2、活性化に働くヒストン修飾として H3K4me3、さらにコントロールとして H3 を対象とした。着床前胚の細胞では上記全てのヒストンについて核内に局在が認められた。一方、着床後胚では H3 の局在は全ての核内で均一に観察されたのに対し、抑制性ヒストン修飾である H3K9me2 が胚体外領域においてグローバルにシグナルが低下していた。また、同じく抑制性ヒストン修飾である H3K27me3 は、エピブラスト・胚体外領域ともにシグナルが低下していた。

### (2) 着床に伴って起こる遺伝子発現の変化 着床前の単一胚、および着床後の単一胚の

胚領域・胚体外領域をそれぞれ1サンプルとして、マイクロアレイによって遺伝子発現を網羅的に解析した。二段階増幅を経てもそれぞれのステージおよび組織に特徴的な遺伝子が特異的に発現している様子を捉えることに成功した。このデータベースから、着床に伴って起こる遺伝子発現変化を網羅的に理解することが可能になった。

### (3) クローン胚におけるヒストン修飾および遺伝子発現の変化

エピジェネティックな異常のモデルである体細胞クローン胚について、上記(1)・(2)と同じく、ヒストン修飾の免疫染色およびマイクロアレイ解析を行った。その結果、ヒストン修飾のグローバルな変化については、体細胞クローン胚においても通常の体外受精胚と同じ変動パターンを示すことが明らかになった。

一方で、マイクロアレイによる遺伝子発現解析については特徴的な結果が得られた。まず、着床前期のクローン胚の遺伝子発現を体外受精胚のそれと比較すると、X染色体上の一部の遺伝子群(Xlr family および Magea family)の発現がクローン胚において著しく低下していた。これらの遺伝子領域は、抑制性ヒストン修飾であるH3K9me2がクラスターを形成している領域として知られている。一方で、これらのクラスター内の遺伝子群の発現は、着床後の胚体外領域では、クローン胚においても体外受精胚と同じレベルに回復していた。

すなわち、グローバルな免疫染色の結果も合わせると、着床期の胚体外領域ではH3K9me2が大規模に脱メチル化もしくは置換される可能性が示唆された。引き続き、これらの遺伝子領域におけるヒストン修飾の変化をChIPにより解析し、着床期に起こるエピゲノム変動をさらに具体的に捉える予定である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

1. Nakamura T, Liu Y, Nakashima H, Umehara H, Inoue K, Matoba S, Tachibana M, Ogura A, Shinkai Y, Nakano T PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5MeC to 5HmC in early embryos. *Nature*, 査読有り, In press.
2. Hasegawa A, Mochida K, Matoba S, Yonezawa K, Ohta A, Watanabe G, Taya K, Ogura A. Efficient production of offspring from Japanese

wild-derived strains of mice (*Mus musculus molossinus*) by improved assisted reproductive technologies. .

3. 的場 章悟, 井上貴美子, 小倉淳郎. 核移植技術: Xistの機能抑制による体細胞クローン作出効率の改善法. *細胞工学*, 査読無し, Vol.31 No.3 282-287 2012.
4. Matoba S, Inoue K, Kohda T, Sugimimoto M, Mizutani E, Ogonuki N, Nakamura T, Abe K, Nakano T, Ishino F, Ogura A. RNAi-mediated knockdown of *Xist* can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有り, 108:20621-20626. 2011.
5. Sato T, Katagiri K, Yokonishi T, Kubota Y, Inoue K, Ogonuki N, Matoba S, Ogura A, Ogawa T. In vitro production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nat Commun*, 査読有り, 2:472. 2011.
6. Fulka H, Hirose M, Inoue K, Ogonuki N, Wakisaka N, Matoba S, Ogura A, Mosko T, Kott T, Fulka J Jr. Production of mouse embryonic stem cell lines from maturing oocytes by direct conversion of meiosis into mitosis. *Stem Cells*, 査読有り, 29:517-527 2011.
7. Matoba S, Ogura A. Generation of functional oocytes and spermatids from fetal primordial germ cells after ectopic transplantation in adult mice. *Biol Reprod*, 査読有り, 84:631-638. 2011.
8. Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Sado T, Ogonuki N, Matoba S, Shiura H, Ikeda R, Mochida K, Fujii T, Sawai K, Otte AP, Tian XC, Yang X, Ishino F, Abe K, Ogura A. Impeding *Xist* expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science*, 査読有り, 330:496-499. 2010.
9. Honda A, Hirose M, Hatori M, Matoba S, Miyoshi H, Inoue K, Ogura A. Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. *J Biol Chem*, 査読有り, 285:31362-31369. 2010.

[学会発表] (計5件)

1. 的場章悟. RNAi ノックダウンシステムを利用した Xist 発現抑制による体細胞クローン胚の発生能改善. 第 104 回日本繁殖生物学会大会. 2011 年 9 月 15 日. 盛岡.
2. 的場章悟. RNAi ノックダウンシステムを用いた核移植クローン技術の改善. 特定領域生殖サイクル若手勉強会. 2011 年 7 月 13 日. 大阪.
3. Shogo MATOBA. Generation of Functional Oocytes and Spermatids from Fetal Primordial Germ Cells after Ectopic Transplantation in Adult Animals. 特定領域研究「生殖細胞の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」国際シンポジウム. 2010 年 11 月 22 日. 福岡.
4. Shogo MATOBA. Generation of functional mouse oocytes and spermatids from isolated primordial germ cells following ectopic transplantation in adult animals. Czech - Japan Joint Symposium for Animal Reproduction "From Gametes to Stem Cells" 2010 年 9 月 22 日. Prague, Czech
5. 的場 章悟. マウス雌雄 PGC からの産仔獲得可能な配偶子作出系の樹立. 第 103 回日本繁殖生物学会大会. 2010 年 9 月 3 日. 十和田

[その他]

ホームページ等

<http://www.brc.riken.go.jp/lab/kougaku/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

的場 章悟 (MATOBA SHOGO)

独立行政法人理化学研究所・遺伝工学基盤技術室・基礎科学特別研究員

研究者番号：20585202