

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15125

研究課題名（和文）卵子特異的因子によるエピゲノム雄性化抑制機構の解明

研究課題名（英文）Characterizing the roles of oocyte-specific factors in inhibiting unique features of the sperm epigenome

研究代表者

白根 健次郎（SHIRANE, Kenjiro）

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：50855004

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、卵母細胞において精子型のエピゲノム獲得を抑制する新規因子の同定とその因子の発現制御機構の解明を目的とした。胚性幹細胞を起点として体外で卵巣を再構築する実験系を用いた。因子を欠損する胚性幹細胞から誘導した卵母細胞におけるゲノム網羅的なDNAメチル化解析から、この因子は卵母細胞型のDNAメチル化パターンの形成には直接寄与しないことを明らかにした。一方で、この因子は細胞質に局在することを見出した。これは、核内で機能するエピゲノム制御因子とは異なる機能をもつ可能性を示唆する興味深い発見である。加えて、卵母細胞に特異的に発現する転写因子の結合により、この因子が活性化されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵子と精子の持つ異なるエピゲノムパターンは個体の発生に必須であり、その分子基盤の解明は生物学的・医学的に大きな意義を持つ。本研究では、卵母細胞において精子型エピゲノム獲得を抑制する候補因子の一つに着目した。体外で卵母細胞の発生を再構築する実験系から、その発現制御機構の一端やその因子が直接的に卵母細胞のDNAメチル化パターンの形成に寄与しないことを明らかにした。加えて、この因子が細胞質に局在するという予想外の結果を得た。これは、卵母細胞が精子型のエピゲノム制御因子の機能を変化させる新たな機構の一つを示唆する。この因子の更なる解析は配偶子間の異なるゲノム機能の使い分けの理解につながると期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the mechanism that prevents sperm-type epigenome in oocytes. To this end, we generated embryonic stem cells depleted of a candidate factor for this mechanism and reconstructed ovaries using these cells. Genome-wide DNA methylation analysis of mutant oocytes revealed that this factor is not involved in preventing sperm-type DNA methylation patterns in oocytes. Intriguingly, however, this factor is localized to the cytoplasm rather than the nucleus. This observation is particularly interesting, as typical epigenetic modifiers are active in the nucleus, suggesting a novel role for this factor in the cytoplasm of oocytes. In addition, we identified key transcription factors that activate this cytoplasmic factor in oocytes. In summary, we revealed transcriptional regulation of this factor and the role on the epigenetic regulation in oocytes. However, the role in the cytoplasm of oocytes warrants further investigation.

研究分野：エピゲノム

キーワード：卵母細胞 エピゲノム性差 DNAメチル化

### 1. 研究開始当初の背景

配偶子は雌雄で異なるゲノム機能をもち、接合により相互補完されることにより発生能を獲得する。DNAメチル化によるゲノムインプリンティングは配偶子によるゲノム機能制御の代表例である。配偶子形成過程に導入されるインプリント遺伝子のDNAメチル化状態は受精後も維持され、身体を構成する全ての細胞において、それらの片親性発現が保証される。インプリント遺伝子のDNAメチル化異常による片親性発現の破綻は、胚の発生停止を招く。したがって、生殖細胞におけるDNAメチル化制御の理解は、発生生物学のみならず、不妊症の原因究明にも貢献する医学的に重要な課題である。

インプリント遺伝子のDNAメチル化制御に加えて、卵子と精子では、ゲノムのDNAメチル化分布も大きく異なる。精子では、特定の遺伝子プロモーター領域を除いたゲノムの大部分、精子では、転写活性の高い遺伝子内部のDNAが主にメチル化される(図1)。我々はこれまでに、マウスの配偶子間のDNAメチル化分布の違いが、異なるヒストン修飾酵素により先導されることを明らかにしている(Shirane et al., 2020)。さらに、我々は卵母細胞で特異的に発現する因子(以下、卵母細胞因子)が精子型のDNAメチル化獲得を阻害するモデルを提唱している。

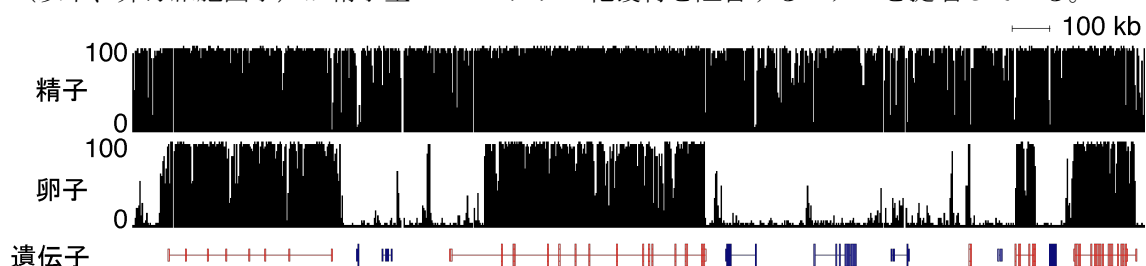


図1. マウス精子と卵子のDNAメチル化分布

常染色体上のある領域(約2.5 Mb)における精子と卵子のDNAメチル化率を黒棒で示す。赤: 卵子で転写活性のある遺伝子、青: 卵子で不活性の遺伝子。これらのDNAメチル化データは公開データ(精子: Kubo et al., 2015; 卵子: Shirane et al., 2013)を再解析したものである。

### 2. 研究の目的

本研究では、卵母細胞において精子型のDNAメチル化獲得が阻害される仕組みを明らかにすることを目的とする。我々は、この過程に関わる候補因子を複数同定している。本研究では、その中の一つの因子に着目し、その因子が卵母細胞において実際にその機能を担うかを検証する。さらに、その因子の発現制御機構を解明し、卵母細胞において精子型のDNAメチル化獲得阻害の基盤となる分子ネットワークの特定を目指す。

### 3. 研究の方法

所属研究室では、マウス胚性幹細胞を起点として体外で卵巣を構築する実験系を確立している(Hikabe et al., 2016; Hamazaki et al., 2021)。この培養系を基盤として本研究を遂行する。まずCRISPR/Cas9法により卵母細胞因子の発現制御領域を欠損させた胚性幹細胞(卵母細胞の分化を追跡するためのレポーター遺伝子STELLA-CFPを持つ)を作成する。この細胞からエピプラスト様細胞を経て始原生殖細胞様細胞を誘導し、胎齢12.5日胚由来の卵巣体細胞と凝集培養させる。凝集塊を培養膜上へと移したのちに気相-液相条件下で21日間培養し、体外で卵巣を再構築(再構築卵巣)する(図2)。卵巣内から二次卵母細胞を採取し、全ゲノムDNAメチル化解析により、因子欠損型の卵母細胞において精子型のDNAメチル化分布が獲得されるかを検証する。

次に、卵母細胞因子の発現制御機構を明らかにするため、CUT&RUN(Cleavage Under Targets & Release Using Nuclease)法(Skene et al., 2017)により卵母細胞において特異的に発現する複数の転写因子に焦点を当て、これらが卵母細胞因子の転写開始点付近に結合するかを検証する。

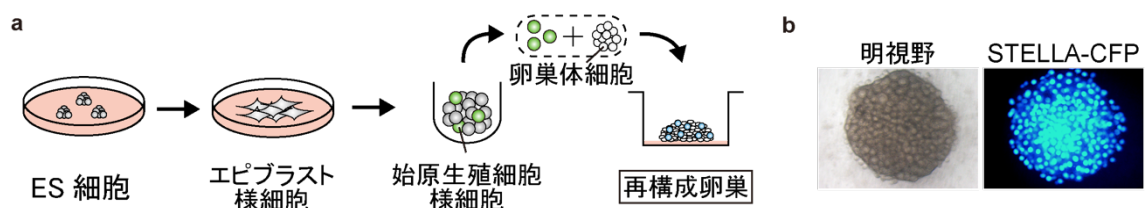


図2. 体外培養系による卵巣の再構築

a. 胚性幹細胞を起点として、エピプラスト様細胞を経て誘導された始原生殖細胞様細胞と胎齢12.5日胚由来の卵巣体細胞を凝集培養したのちに、培養膜上で卵巣を再構築する一連の実験を模式的に示す。

b. 培養膜上で21日間培養して構築した卵巣の明視野画像(左)とCFP蛍光画像(右)を示す。

#### 4. 研究成果

##### (1) 卵母細胞因子を欠損する ES 細胞の作出

CRISPR/Cas9 法により、卵母細胞因子の転写開始点を含む領域を欠損する胚性幹細胞を作出した。この細胞を起点として、上述の方法にて体外で卵巣を再構築した。卵母細胞レポーター STELLA-CFP の蛍光を指標に卵巣内の二次卵母細胞を採取し、標的とする卵母細胞因子の発現を定量的 RT-PCR 法により調べた。その結果、欠損型由来の卵母細胞では、その発現が消失していた (図 3)。

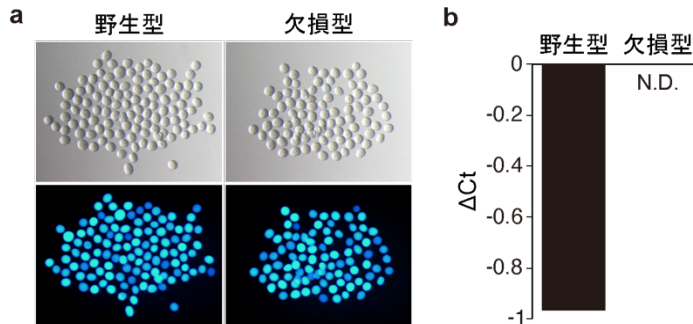


図 3. 卵母細胞因子の発現消失

a. 胚性幹細胞を起点として、体外で再構築した卵巣から採取した二次卵母細胞を示す (上: 明視野画像、下: CFP 蛍光画像)。b. 二次卵母細胞における卵母細胞因子の発現量を示す。Ppia を内在性コントロールとして用いた log2 ΔCt 値を示す。欠損型はその発現は検出限界以下である。

##### (2) 全ゲノム DNA メチル化解析

体外で構築した卵巣から採取した卵母細胞数百個から効率よく全ゲノムレベルでの DNA メチル化を定量するため、微量細胞へのメチル化解析へ適用可能な EM (Enzymatic Methyl) -seq 法 (Vaisvila et al., 2021) の最適化を行った。まず、細胞 1000 個からゲノムを粗精製し、8 サイクルのライブラリー増幅により高速シーケンサーでの配列決定に十分なライブラリーを得ることに成功した。次に、体外で再構築した野生型と欠損型のそれぞれの卵巣から 400 個ずつの二次卵母細胞を採取し、EM-seq 法により同様にライブラリーを調製し、NovoSeq6000 で配列を決定した。卵母細胞由来のゲノムに混合して反応させた外来性コントロール DNA から計算した酵素反応効率も良好であった。以上から、卵母細胞 400 個から得られたこれらのデータは詳細な解析に耐え得ると判断した。解析の結果、予想に反して、この因子を欠損しても卵母細胞の DNA メチル化は正常なパターンを保持していた。この結果は、この因子が直接的に卵母細胞の DNA メチル化分布形成に寄与しないことを示す。一方で、他の卵母細胞因子が卵母細胞における精子型の DNA メチル化獲得を阻害する可能性も新たに提示した。

##### (3) 卵母細胞因子の発現を制御する転写因子群の同定

卵母細胞因子の発現を制御する転写因子を探索するため、卵母細胞に特異的に発現する複数の転写因子の CUT&RUN を行った。その結果、卵母細胞因子の転写開始点付近に結合する因子の同定に成功した。また、この結合部位を欠損する二次卵母細胞では卵母細胞因子の発現が消失したことから、この転写因子は卵母細胞因子の発現を促進することを明らかにした。

##### (4) 卵母細胞因子の細胞内局在解析

卵母細胞因子の細胞内での発現部位を特定するために、タグ配列を付加した卵母細胞因子を HEK293T 細胞へと導入し、免疫蛍光染色法により、その局在部位を調べた。その結果、この因子は予想していた核内ではなく、細胞質に局在することを新たに見出した。

#### 【引用文献】

- [1] Shirane K, Miura F, Ito T, Lorincz MC. NSD1-deposited H3K36me2 directs de novo methylation in the mouse male germline and counteracts Polycomb-associated silencing. Nat Genet. 2020 Oct;52(10):1088-1098. doi: 10.1038/s41588-020-0689-z. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32929285.
- [2] Kubo N, Toh H, Shirane K, Shirakawa T, Kobayashi H, Sato T, Sone H, Sato Y, Tomizawa S, Tsurusaki Y, Shibata H, Saitsu H, Suzuki Y, Matsumoto N, Suyama M, Kono T, Ohbo K, Sasaki H. DNA methylation and gene expression dynamics during spermatogonial stem cell differentiation in the early postnatal mouse testis. BMC Genomics. 2015 Aug 20;16(1):624. doi: 10.1186/s12864-015-1833-5. PMID: 26290333; PMCID: PMC4546090.
- [3] 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 Apr;9(4):e1003439. doi: 10.1371/journal.pgen.1003439. Epub 2013 Apr 18. PMID: 23637617; PMCID: PMC3630097.
- [4] Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G, Obata Y, Hirao Y, Hamada N, Shimamoto S, Imamura T, Nakashima K, Saitou M, Hayashi K. Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. Nature. 2016 Nov 10;539(7628):299-303. doi: 10.1038/nature20104. Epub 2016 Oct 17. PMID: 27750280.

- [5] Hamazaki N, Kyogoku H, Araki H, Miura F, Horikawa C, Hamada N, Shimamoto S, Hikabe O, Nakashima K, Kitajima TS, Ito T, Leitch HG, Hayashi K. Reconstitution of the oocyte transcriptional network with transcription factors. *Nature*. 2021 Jan;589(7841):264-269. doi: 10.1038/s41586-020-3027-9. Epub 2020 Dec 16. PMID: 33328630.
- [6] Skene PJ, Henikoff S. An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites. *Elife*. 2017 Jan 16;6:e21856. doi: 10.7554/eLife.21856. PMID: 28079019; PMCID: PMC5310842.
- [7] Vaisvila R, Ponnaluri VKC, Sun Z, Langhorst BW, Saleh L, Guan S, Dai N, Campbell MA, Sexton BS, Marks K, Samaranayake M, Samuelson JC, Church HE, Tamanaha E, Corrêa IR Jr, Pradhan S, Dimalanta ET, Evans TC Jr, Williams L, Davis TB. Enzymatic methyl sequencing detects DNA methylation at single-base resolution from picograms of DNA. *Genome Res*. 2021 Jul;31(7):1280-1289. doi: 10.1101/gr.266551.120. Epub 2021 Jun 17. PMID: 34140313; PMCID: PMC8256858.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shirane K and Lorincz M.	4. 巻 16
2. 論文標題 Epigenetic Mechanisms Governing Female and Male Germline Development in Mammals	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sexual Development	6. 最初と最後の頁 365 ~ 387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000529336	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 Lu Y, Nagamori I, Kobayashi H, Kojima-Kita K, Shirane K, Chang HY, Nishimura T, Koyano T, Yu Z, Castaneda JM, Matsuyama M, Kuramochi-Miyagawa S, Matzuk MM, Ikawa M.	4. 巻 11
2. 論文標題 ADAD2 functions in spermiogenesis and piRNA biogenesis in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 698 ~ 709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.13400	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 Uehara R, Au Yeung WK, Toriyama K, Ohishi H, Kubo N, Toh H, Suetake I, Shirane K, Sasaki H.	4. 巻 19
2. 論文標題 The DNMT3A ADD domain is required for efficient de novo DNA methylation and maternal imprinting in mouse oocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1010855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1010855	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 -
1. 著者名 Yuki Naitou, Go Nagamatsu, Nobuhiko Hamazaki, Kenjiro Shirane, Masafumi Hayashi, Makoto Hayashi, Satoru Kobayashi, Katsuhiko Hayashi	4. 巻 149
2. 論文標題 Dual role of Ovol2 on the germ cell lineage segregation during gastrulation in mouse embryogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev200319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.200319	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 -

1. 著者名 Kenjiro Shirane	4. 巻 97
2. 論文標題 The dynamic chromatin landscape and mechanisms of DNA methylation during mouse germ cell development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 3-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1266/ggs.21-00069	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kenjiro Shirane
2. 発表標題 Defining the role of oocyte-inducing factors and their connective networks in oogenesis
3. 学会等名 2023 Germinal Stem Cell Biology, Gordon Research Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023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

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		
米国	Baylor College of Medicine		
カナダ	University of British Columbia		