

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25252054

研究課題名(和文) 母性mRNAの動員によるゲノムリプログラミングの調節機構について

研究課題名(英文) Regulation of genome reprogramming by the mobilization of maternal mRNA

研究代表者

青木 不学 (Aoki, Fugaku)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20175160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,100,000円

研究成果の概要(和文)：成長卵では翻訳されていないが、減数分裂の再開あるいは受精後にポリA鎖が伸長して翻訳が開始される母性mRNAが存在する。リプログラミング因子はこのような種類の母性mRNAから翻訳されるものと考え、ポリA鎖が伸長するmRNAを同定し、そのリプログラミングへの関与を明らかにすることを計画した。研究の成果として、まず、ポリA鎖が伸長した母性mRNAを高い精度で分別するシステムを構築した。次いで、分別したmRNAについてRNAシーケンスを行い、リプログラミング因子の候補を絞り込んだ。その後、CRISPER/Cas9システムを用いて候補因子のノックアウトを行うことでリプログラミングへの関与を調べた。

研究成果の概要(英文)： There are the maternal mRNA species which are not translated in immature oocytes but become being translated by elongation of their poly-A tails after the resumption of meiosis and fertilization. I hypothesized that the protein(s) regulating the reprogramming of gene expression is (are) translated from this type of maternal mRNAs. In this project, I planned to identify them and clarify their involvement in the reprogramming of gene expression. First, we developed the system by which the maternal mRNAs elongating their poly-A tails were efficiently sorted. The selected mRNAs by using this system were subjected to RNA sequencing to determine the candidates for the factors involved in the reprogramming. The involvement of those candidates in the reprogramming has been examined by CRISPER/Cas9 system.

研究分野：動物育種繁殖学

キーワード：リプログラミング 母性mRNA 1細胞期胚 卵 初期胚

1. 研究開始当初の背景

受精前の卵は分化した細胞であるが、受精後の1細胞期胚は全能性を獲得し、あらゆる種類の細胞へと分化できる能力を有するようになる。この受精前後における分化・全能性の変化を調節する機構には、クロマチン構造のダイナミックな変化によるゲノムのリプログラミングが関与していると考えられるが、その分子機構は明らかとなっていない。また、このリプログラミングは、未受精卵あるいは受精直後の1細胞期胚に移植された体細胞核でも起こることが、クローン動物作成の成功によって明らかにされた。この結果は、分化した体細胞のゲノムを全能性のある状態に変化させるリプログラミング因子が受精直後の1細胞期胚中に存在することを示している。しかしながら、その因子が何であるのか、そしてそれがどのような機構で作用するのかなどについては、ほとんど明らかにされていない。

それまでに私はマウスの胚を用いて、クロマチン構造や遺伝子発現の調節に重要な役割を果たしている様々なエピジェネティック因子が受精前後で大きく変化していることを明らかにしてきた。まず、活性化遺伝子のマーカーである H3K79 および H3K36 のメチル化が受精直後に消失することを見出した。またクロマチンを構成するヒストン H2A および H3 の変異体である H2A.Z および H3.3 が、受精直後にクロマチンからすべて抜け落ちることを明らかにした。さらに未受精卵に移植された体細胞核においても、卵の活性化直後にほとんどの H2A および H3 変異体が核のクロマチンから抜け落ち、卵細胞質中に蓄積されたものに置き換えられていることがわかった。以上のように、クロマチン構造および遺伝子発現の調節に関わるエピジェネティックな情報が受精後に刷新されることが明らかとなり、これがゲノムのリプログラミングに関わっていることが強く示唆された。しかしながら、これらの変化がどのようなメカニズムで、そしてどのような因子によって調節されているのかは未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

成長中の卵母細胞は活発に遺伝子を発現しているが、成長期の終盤になって一旦遺伝子発現を停止し、そのまま減数分裂を進行させて未受精卵となる。そして、受精後もしばらくは遺伝子発現が停止した状態にあるが、一定時間が経過した後、胚(接合子)として遺伝子発現が開始される。その時期は動物種によって異なるが、マウスでは1細胞中期頃である。したがって、遺伝子発現が停止する成長卵の時期から1細胞期中期までの期間、新しい mRNA の合成は起こらない。一般に mRNA の半減期は数時間とされているが、卵成長期に合成された mRNA は特別な機構により安定に保持されており、受精後まで多く

の量が残存している。このような卵成長中に蓄積された mRNA を母性 mRNA と呼ぶ。したがって、成長卵と受精直後の1細胞期胚では、基本的に蓄えられている mRNA は共に同じ母性 mRNA であり、そこから合成されるタンパク質も同じ組成となることから、この両者の性質は同じものとなるはずであるが、実際は大きく異なっている。その理由は、成長卵では母性 mRNA のすべてが翻訳されているわけではなく、一部翻訳されていないものが存在することが原因であると考えられる。これまでに、成長卵においては poly-A 鎖が短くて翻訳されていないが、減数分裂の再開、あるいは受精を機に poly-A 鎖が伸長してポリゾームに動員されることによりタンパク質の合成がスタートする母性 mRNA が多数存在することが報告されている。

ところで、リプログラミング因子がこのようなタイプの mRNA から合成されると仮定したら、リプログラミングのタイミングについての疑問に合理的な解答を与えることができる。すなわち、成長卵と受精直後の1細胞期胚では、蓄えられている mRNA は同じ母性 mRNA であるのにもかかわらず、リプログラミングは何故成長卵では起こらず、受精後の1細胞期胚で起こるのかという疑問についてである。その解答として、リプログラミング因子の mRNA は成長卵では翻訳されず、受精直後に動員され、新たに合成されたタンパク質がリプログラミングを引き起こすと仮定すると、矛盾なくリプログラミングのメカニズムを説明できるものと考えられる。

以上より、本研究では受精後に動員される母性 mRNA という点に着目してリプログラミング因子を同定し、遺伝子発現のリプログラミングを調節する機構の解明を目指したい。そこで、本研究計画では、(1)受精後に動員される母性 mRNA の網羅的探索を行い、リプログラミング因子の候補を探す。(2)候補遺伝子の過剰発現および発現抑制により、リプログラミング因子を同定する。(3)同定された因子がどのようなメカニズムでクロマチン構造の変化や遺伝子発現の変化を引き起こすのかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究の全体計画は次の3つのステップから成っている。

(1)受精後に動員される母性 mRNA の網羅的探索を行い、リプログラミング因子の候補を探す。

(2)候補遺伝子の過剰発現および発現抑制により、リプログラミング因子を同定する。

(3)同定された因子がどのようなメカニズムでクロマチン構造の変化あるいは遺伝子発現の変化を引き起こすのかを明らかにする。

以上のステップにより、受精前後のゲノムリプログラミングのメカニズムを明らかにしていく。

4. 研究成果

まず、ポリ A 鎖の長さにより、mRNA を分画するシステムの確立を行った。未成熟卵において翻訳されていない母性 mRNA のポリ A 鎖の長さは 20 nt 前後、そして減数分裂際再開時にポリ A 鎖が伸長して翻訳されるようになる時のポリ A 鎖の長さが 120 nt 以上ということが報告されているため、この 2 つの長さのポリ A 鎖を分画できるシステムの開発を行い、これに成功した。すなわち、ポリ A 長が 20 および 120 nt となるベクターを構築し、これを用いて cRNA を合成してその分画を試みたところ、20 nt と 120 nt のポリ A 鎖を持つ cRNA をきれいに分けることができた。さらに、減数分裂再開後にポリ A 鎖が伸長することが知られている遺伝子の mRNA についても、減数分裂再開前後で分画の移動が観察できた。

次いで、このシステムを用いて未成熟卵、成熟卵および 1 細胞期胚から得られた mRNA を分画し、それぞれについて RNA シーケンスを行った。その結果、減数分裂再開時、あるいは受精後に mRNA のポリ A 長が短分画から長分画に移動する遺伝子を発見することができ、これらの中で卵特異的に発現しているものをリプログラミング因子の候補とした。

一方、これらの候補をノックアウトして、実際にそれがリプログラミング因子であると確定するためには、リプログラミングの異常を確認できなければならない。何故なら、リプログラミングが起こったことを客観的に評価する方法がなければ、それを調節する候補因子をノックアウトしても何を評価して良いかわからず、結局リプログラミング因子を同定できないということになるからである。しかし、それまでにリプログラミングが起こった際に起こる現象を客観的に評価する方法は確立されていなかった。そこで、リプログラミングについて、遺伝子発現の変化とクロマチン構造の変化から評価することを試みた。まず、遺伝子発現の変化についてであるが、受精前の成熟卵についてはその遺伝子発現パターンはすでに解析されていたが、リプログラミングが起こった後の受精後の 1 細胞期についてはそこで新たに転写される遺伝子がそれまで明らかにされていなかった。そこで、1 細胞期で転写される遺伝子を RNA シーケンスを行って同定した。これによって、受精前後に発現パターンが変化する遺伝子が明らかとなり、これをリプログラミングの客観的指標とすることが可能となった。一方、クロマチン構造に関しては、リプログラミングの際にクロマチン構造が緩むことが示唆されていたが、これを客観的に評価する方法がなかった。そこで、クロマチン構造の緩みを計測する手法として fluorescent recovery after photobleaching (FRAP) 法をマウス卵および初期胚に適用することを考え、そのためのシステムの確立を行った。すなわち、GFP タグを付加したヒストン H2B を卵、あるいは

初期胚に強制発現させ、FRAP を行たところ、全能性を有する 1 細胞期胚では、他のステージの着生前初期胚あるいは ES 細胞に比べて極端にクロマチン構造が緩くなっていることが確認できた。さらに体細胞核を移植した胚を用いて FLAP 解析を行ったところ、移植後に著しくクロマチン構造が緩むことが明らかとなった。

最後に、ポリ A 鎖長が変動し、かつ卵特異的に発現している遺伝子をリプログラム因子の候補として複数選定し、それらのノックアウトマウスを CRISPR/Cas9 システムで作成した。現在、これらのマウスから得られた卵について遺伝子発現およびクロマチン構造を解析している。

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 11 件)

Franke V, Ganesh S, Karlic R, Malik R, Pasulka J, Horvat F, Fabijanac M, Fulka H, Cernohorska M, Urbanova J, Svobodova E, Ma J, Suzuki Y, Aoki F, Schultz RM, Vlahovicek K & Svoboda P: Long terminal repeats power evolution of genes and expression programs in mammalian oocytes and zygotes. *Genome Res*, in press. (査読有)

Funaya S & Aoki F: Regulation of zygotic gene activation by chromatin structure and epigenetic factors. *J Reprod Dev*, in press. (査読有)

Karlic R, Ganesh S, Franke V, Svobodova E, Nejeplinska J, Suzuki Y, Aoki F, Vlahovicek K & Svoboda P: Long non-coding RNA exchange during oocyte-to-embryo transition in mice. *DNA Res*. 24:129-141, 2017. (査読有)
doi: 10.1093/dnares/dsx008

Yamamoto R & Aoki F: A unique mechanism regulating gene expression in 1-cell embryos. *J. Reprod. Dev.* 63: 9-11, 2017. (査読有)
doi: 10.1262/jrd.2016-133

Fulka H & Aoki F: Nucleolus precursor

bodies and ribosome biogenesis in early mammalian embryos – Old theories and new discoveries. *Biol. Reprod.* 94 (6) 143: 1-8, 2016. (査読有)

doi: 10.1080/15592294.2015

Ooga M, Fulka H, Hashimoto S, Suzuki MG & Aoki F: Analysis of chromatin structure in mouse preimplantation embryos by fluorescent recovery after photobleaching. *Epigenetics*, 11: 85-94, 2016. (査読有)

doi: 10.1080/15592294.2015.1136774

Yamamoto R, Abe K, Suzuki Y, Suzuki MG & Aoki F: Characterization of gene expression in mouse embryos at the 1-cell stage. *J. Reprod. Dev.* 62: 87-92, 2016. (査読有)

doi: 10.1262/jrd.2015-131

Abe K, Yamamoto R, Franke V, Cao M, Suzuki Y, Suzuki MG, Vlahovicek K, Svoboda P, Schultz RM & Aoki F: The first murine zygotic transcription is promiscuous and uncoupled from splicing and 3' processing. *EMBO J.* 34: 1523-1537, 2015. (査読有)

doi: 10.15252/embj.201490648

Ooga M, Suzuki MG & Aoki F: Involvement of histone H2B mono-ubiquitination in the regulation of mouse preimplantation development. *J. Reprod. Dev.* 61: 179-184, 2015 (査読有)

doi: 10.1262/jrd.2014-137

Hamamoto G, Suzuki T, Suzuki MG & Aoki F: Regulation of Transketolase Like 1 Gene Expression in the Murine One-Cell Stage Embryos. *PLoS ONE* 9: e82087.

doi: 10.1371/journal.pone.0082087

Yukawa M, Akiyama T, Franke V, Mise N, Isagawa T, Suzuki Y, Suzuki MG,

Vlahovicek K, Abe K, Aburatani H & Aoki F: Genome-wide analysis of the chromatin composition of histone H2A and H3 variants in mouse embryonic stem cells. *PLoS ONE*, 9(3): e92689, 2014. (査読有)

doi: 10.1371/journal.pone.0092689

〔学会発表〕(計 14 件)

青木不学、河村真愛：マウス 1 細胞期胚における雌雄前核の差異にヒストン H3 変異体が関与する .公開シンポジウム「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」, 2016 年 11 月 16 日、三島文化会館 (静岡県・三島市)

青木不学：受精前後におけるゲノム再プログラム化の分子機構 .第 57 回組織細胞化学会、2016 年 9 月 4 日、杏林大学 (東京都・三鷹市)

Aoki F: Involvement of histone variants replacement in the genome remodeling after fertilization. Joint Symposium on Integrated Biosciences between Zhejiang University and The University of Tokyo, March 15, 2016 , Hangzhou (China)

青木不学: 全能性とは? 第 38 回分子生物学会年会、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

Aoki F: Characterization of gene expression in one-cell stage embryos. World Congress of Reproductive Biology, September 3, 2014 , Edinburgh (England)

青木不学：受精前後におけるエピジェネティック・リプログラミングについて . 第 20 回 ART FORUM、2014 年 7 月 31 日、ハイアットリージェンシー (東京都・新宿区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
URL
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/seigyo/publication.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 不学 (AOKI Fugaku)
(東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授)

研究者番号：20175160

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()