

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670710

研究課題名(和文) リプログラミング分子機序から受精卵の全能性機能を解明する研究

研究課題名(英文) Study for defining totipotency mechanism of oocytes

## 研究代表者

阿久津 英憲 (Akutsu, Hidenori)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・生殖医療研究部・部長

研究者番号：50347225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：受精卵は細胞核リプログラミング現象に関して2つの非常に興味深い事象を提示している。これまで受精卵の全能性で重要である遺伝子発現量補正に関わるX染色体の不活化機序に着目し卵子細胞における刷込み型X染色体不活化が卵子細胞核タンパク質の特定の化学的修飾(H3K9me3)により制御されることを見出した。これを受け、X染色体不活化を制御することで全能性獲得に寄与する転写因子を探索し、Pou5f1(Oct4)がこのエピジェネティックリプログラミングに関与することを見出した(本成果は国際誌へ投稿中)。卵子のリプログラミング分子機序から受精卵の全能性機能を解明するキー因子の働きを明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：Spatiotemporal expression of transcription factors is crucial for genomic reprogramming processes in both in vivo and in vitro. Cellular reprogramming and differentiation are accompanied by dynamic transcriptional changes and transcription factors play central roles in both processes. Dramatic alterations of cellular fates occur during preimplantation embryo development. In mice, after fertilization, an important transcription factor responsible for sustaining pluripotency is the Pou5f1 protein (also known as Oct4). Our deep expression analysis and dose-dependent functional analyses in the preimplantation stages were conducted to address the in vivo Oct4 potential for developmental reprogramming. Our recent findings provide new insight into a role for Oct4 in epigenetic reprogramming toward totipotency in vivo. The spatiotemporal regulation and fine tuning of Oct4 is essential for cellular reprogramming and integrity.

研究分野：生殖発生学

キーワード：発生 卵子 全能性

### 1. 研究開始当初の背景

発生過程で運命付けされた細胞に未分化性を再獲得させるリプログラミングは近年、体細胞クローン、ヒトES細胞樹立、そしてiPS細胞の誕生により基礎研究のみならず再生医学や癌研究への応用による医科学分野での大幅な進歩が社会全体から期待されている。iPS細胞の生みの親であり京都大・山中伸弥教授は“体細胞のリプログラミング”により、2012年ノーベル医学生理学賞を受賞した。しかし、リプログラミングによる有用性はより明らかになりつつもその機序はいまだ多くが謎である。受精卵は細胞核リプログラミング現象に関して2つの非常に興味深い事象を提示している。卵子と精子が融合(受精)後雌性及び雄性由来の前核を形成する。同一細胞内でありながら前核内では劇的に異なるエピジェネティック変化が起こる。雄性前核内では受精後能動的脱DNAメチル化が雄ゲノム全体でおこるのに対し、雌性前核ではDNAメチル化が維持され、細胞分裂に依存する受動的な脱DNAメチル化が引き起こされる。申請者はこれまでリプログラミングやエンブリオゲノミクスに関して、数々の論文を報告している(Sugawara T, and Akutsu H. Stem Cell Res Ther 2012; Stadtfeld M, Akutsu H, et al. Nature 2010; Eggan K, Akutsu H, et al. Science 2000)。

### 2. 研究の目的

これまで、微量生体試料である受精卵の雌雄前核に含まれる遺伝子転写産物を網羅的遺伝子発現解析する系を構築した(文科科研・研究課題番号:22659304)。これによりこれまで捉えることが不可能であったリプログラミング関連因子を捉えることができた。本研究では、ユニークな発現動態を示すこれらの因子を機能的に分類し、機能解析からリプログラミング分子機序の全貌解明を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動的DNA脱メチル化候補因子抽出

これまでの研究成果を有効かつ継続的に応用する(文科科研・研究課題番号:22659304)。実験動物マウスを用いて、的確に受精卵前核を抽出する系を構築した。前核は系20µm(卵子は80µm)であるが、新たに構築したRNAリニアアンプリフィケーション法を用いて、20個でマイクロアレイ解析に供する質のゲノムを抽出することが可能となった。生物学的試験有効回数数の解析を行った結果非常に特異的に発現が特化した因子を抽出することができた。想定より多数の遺伝子が獲得されたため、本研究では、まずリプログラミング機能に不可欠なクロマチンモデリング等の生物学的機能と関連する因子を選択していく。

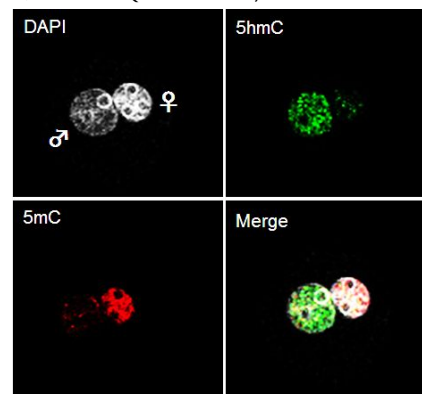
#### (2) 受精卵雌雄前核採取

雌雄前核が明瞭になる時期が受精後6-8時間でありその時期の受精卵から雌性・雄性前核

をそれぞれ除去できる系を確立した。前実験において、雌雄特異的のマーカで除去した前核を免疫染色することで採取したサンプルが確実に性差の下に採取されていることを確認した。本研究では、雌雄前核を採取し、網羅的遺伝子発現解析をすることで、リプログラミングのみならず、ダイナミックなエピジェネティック動態を反映する貴重な試料の採取を目的とする。申請者は体細胞核移植法をはじめとした生殖発生工学手技に長けており十分な技術と知見が備わっている(Humpherys D, Akutsu H, et al. Science 2001; Stadtfeld M, Akutsu H, et al. Nature 2010)。

#### (3) 網羅的遺伝子発現解析-雌雄差関連因子抽出

受精後雌雄前核形成期にDNA脱メチル化現象がダイナミックに引き起こされる。雄性前核では細胞分裂に依存せず動的脱メチル化がおこる。本研究では雌雄それぞれの前核を対象に解析することでこれまで未解明であった脱メチル化制御機構解明へ向け貴重な知見を得る。最近、5-メチルシトシン(5mC)はメチルシトシンデオキシナーゼTetにより5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)へ変換され、ゲノムにおける5hmCと5mCとのバランスが多能性や発生分化の運命決定と密接に関係していることが報告された(Nakamura T, et al. Nature 2012)。本研究でさらに一網打尽に関連因子を捉えることが可能となる。抽出した遺伝子を雄性前核形成期の発現時期と局在を免疫組織抗体染色法などにより明らかにしていく。申請者らは体細胞クローン法やiPS細胞樹立法に関してリプログラミング機構の解明に寄与する成果を報告している(Akutsu H, et al. Science 2000; Chen A, Akutsu H, et al. Cell Stem Cell 2009)。これまでの知見を背景にしたデータマイニングを行うことで、リプログラミングに關与する候補因子抽出が可能である。更に研究協力者らも幹細胞未分化性に関する遺伝子発現データマイニングに長けている(Matoba R, et al. PLoS One 2006;



#### 雌雄前核 DNA メチル化

本研究が対象とする受精卵内雌雄前核はダイナミックなメチル化変動を示す。受精後雄は脱メチル化(ヒドロキシメチル化5hmC陽性)、一方雌前核はメチル化状態(5mC)を保つ。本研究は生命の始まりのエピジェネティックメカニズムにも重要な知見が得られる(Akutsu, et al. unpublished data.)。

Fukuda A, et al. PLoS One 2010 ). 抽出した遺伝子を受精卵によりその発現時期と局在を免疫組織抗体染色法等などにより明らかにしていく。

#### (4) リプログラミング機能解析

受精後雌雄前核形成期に DNA 脱メチル化現象がダイナミックに引き起こされる。申請者はこれまで卵の質に DNA メチル化酵素群が関与する可能性について報告している (Hamatani T, Akutsu H, et al. Hum Mol Genet 2004)。さらに、研究協力者とともに、雌雄前核形成期のヒストンメチル化局在を免疫組織抗体染色法等などにより解析する系を構築している。本研究では、リプログラミング及び動的 DNA 脱メチル化のそれぞれに関してノックダウン法による機能解析を行う。受精卵を対象に RNA 干渉法による遺伝子機能解析を行う。siRNA マイクロインジェクション法により機能解析を構築して生きている (Hamatani T, Akutsu H, et al. Hum Mol Genet 2004; Fukuda A, Akutsu H, et al. in preparation)。

#### 4. 研究成果

受精卵は細胞核リプログラミング現象に関して2つの非常に興味深い事象を提示している。卵子と精子が融合(受精)後雌性及び雄性由来の前核を形成する。同一細胞内でありながら前核内では劇的に異なるエピジェネティック変化が起こる。雄性前核内では受精後能動的脱 DNA メチル化が雄ゲノム全体でおこるのに対し、雌性前核では DNA メチル化が維持され、細胞分裂に依存する受動的な脱 DNA メチル化が引き起こされる。これまで受精卵雌雄細胞核で引き起こされる核タンパク質ヒストン化学的修飾の非対称性に注目し、受精卵の全能性との関連性を解析してきた。雌性受精卵の全能性で重要である遺伝子発現量補正に関わる X 染色体の不活化機序に着目した。着床前期胚発生でおこる X 染色体の不活化では刷込み型の X 染色体不活化が全能性獲得に必須であり、その分子機序は不明であった。受精卵及び卵子細胞核タンパク質ヒストンの網羅的免疫染色法からヒストン H3 リジン (K) 9 のトリメチル化 (H3K9me3) が X 染色体不活化を引き起こす Xist 遺伝子発現を制御することを見出した。免疫組織染色では、H3K9me3 の修飾は精子由来核タンパク質には全く付されておらず非対称性を示した。H3K9me3 の脱メチル化を促す mRNA (Kdm4b) の注入実験では、卵子細胞の H3K9me3 脱メチル化により刷込み型の X 染色体不活化が行われないことが判明した。卵子細胞における刷込み型 X 染色体不活化が卵子細胞核タンパク質の H3K9me3 により制御されることを国際専門誌に報告することができた。

#### 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4件)

1. Fukuda A, Tanino M, Matoba R, Umezawa A, Akutsu H. Imbalance between the expression dosages of X-chromosome and autosomal genes in mammalian oocytes. Scientific Reports, 2015; 5: 14101. doi: 10.1038/srep14101.

2. Miura T, Sugawara T, Fukuda A, Tamoto R, Kawasaki T, Umezawa A, Akutsu H. Generation of primitive neural stem cells from human fibroblasts using a defined set of factors. Biology Open, 2015; 4: 1595-1607. doi: 10.1242/bio.013151.

3. Mizuno H, Akutsu H, Kato K. Ethical acceptability of research on human-animal chimeric embryos: summary of opinions by the Japanese Expert Panel on Bioethics. Life Sci Soc Policy. 2015; 11: 15. doi: 10.1186/s40504-015-0033-z.

4. Fukuda A, Mitani A, Miyashita T, Umezawa A, Akutsu H. Chromatin condensation of Xist genomic loci during oogenesis in mice. Development. 2015; 142: 4049-4055. doi: 10.1242/dev.127308.

〔学会発表〕(計1件)

1. Hidenori Akutsu. "The role of asymmetric histone modification in embryo development" IFFS/JSRM International Meeting 2015 (招待講演) 2015年4月26~29日. Yokohama, Japan.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿久津英憲 (AKUTSU, Hidenori)

国立成育医療研究センター・研究所・部長

研究者番号：50347225

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：