

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861350

研究課題名(和文)着床前期のエピゲノム変異による胚発生障害機構の解明-不育症の原因究明に迫る-

研究課題名(英文)Effect of epigenomic mutation on preimplantation development

研究代表者

福田 篤 (Fukuda, Atsushi)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・研究員

研究者番号：00638091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス初期胚をモデルに初期発生過程におけるエピゲノム変異が、発生に及ぼす影響を検討した。受精後の1細胞期胚に対し、ヒストン修飾を改変するmRNAや低分子化合物を導入した。その結果、母方ゲノム由来のX染色体を不活化することに成功した。さらに、母方ゲノムの不活化は胚性致死につながるXist遺伝子父方欠損メス胚を完全なる個体までレスキューすることに成功した。これらの結果より、初期胚でのエピゲノム状態を一過性に改変することが、不育症の改善につながる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Using mouse embryos as model for studying the effect of epigenomic mutations on embryonic development, the embryos with alteration of epigenetic states were produced using mRNA overexpression and treatment of small molecule. These treatments caused maternal Xist derepression in preimplantation stages. Moreover, using these system, we demonstrated that the female lethality in Xist paternal deleted embryos could be rescued. These results provide new insight into reproductive medicine.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：初期胚 生殖細胞 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

不育症は、着床はするものの繰り返す流産・死産によって生児が得られない状態であり、その病因の約 60% は不明である (原因不明不育症)。

原因不明不育症では、胚側に発育不全の原因があることが示唆されているが、モデル生物を用いて科学的に証明されたケースは少ない。着床前期の胚は母方・父方のエピゲノムの非対称性が確認されているが、正常な発生に対し、どのような意義があるのかは不明である。

2. 研究の目的

マウスを用いた逆遺伝学的アプローチ研究から、着床前期における遺伝子発現異常は着床後の発生に著しく影響することが明らかとなった。従って、胚発生最初期に生じるエピゲノム遷移とそれに連動する遺伝子を明らかにすることは、原因不明不育症の原因を着床前期に分子レベルで突き止めることにつながる。

本研究では、着床前期胚の質をエピジェネティクス修飾の非対称性に注目し、原因不明不育症における原因究明に迫る。

3. 研究の方法

マウスをモデルに、着床前期胚においてエピゲノム修飾を破綻させた胚を構築することで、遺伝子発現や個体発生能を評価する。また、エピゲノム制御下にあり、発生に極めて重要な *Xist* 遺伝子 (X 染色体不活化の確立に必須な遺伝子) を欠損した胚を用いることで、着床前期に確立する X 染色体不活化 (XCI) の分子機構解明を目指す。

代表的な転写抑制修飾であるヒストン H3 リシン 9 番目のトリメチル化 (H3K9me3) は母方ゲノム特異的な修飾が確認されている。そこで、受精卵に H3K9me3 の脱メチル化酵素である *Kdm4b* の mRNA を導入する。また、ヒストン脱アセチル化の阻害剤である低分子化合物であるトリコスタチン A (TSA) も使用し、更なるヒストン修飾の改変胚の構築を目指す。エピゲノム修飾の破綻評価は、免疫蛍光染色法により評価する。遺伝子発現解析においては、定量 PCR 法やマイクロアレイ、次世代シーケンサーなどを利用する。さらに、転写産物の核内局在等を明らかにするために、3 次元免疫染色- fluorescence in situ hybridization (3D-immuno-FISH) 解析を行う。

個体発生の検討では、胚盤胞まで *in vitro* 培養にて発生能を評価する。次に、子宮へ胚盤胞を移植することで *in vivo* における発生能を評価する。

4. 研究成果

1) H3K9me3 はインプリント型 XCI に必須

母方ゲノム特異的な遺伝子発現解析を簡易的にするために、単為発生胚を構築して

H3K9me3 の影響を調べた。その結果、H3K9me3 欠損単為発生胚は、本来確立しない XCI (インプリント型 XCI) が観察された。(図 1)

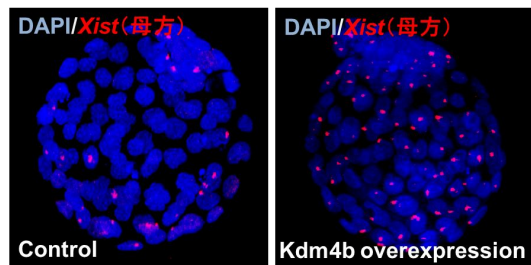
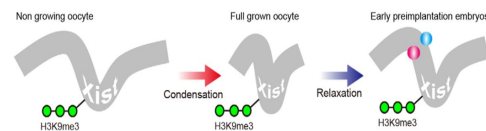


図 1. 母方 XCI の確立

2) 卵形成過程における H3K9me3 修飾状態

卵子ゲノム特異的に観察された H3K9me3 は、インプリント型 XCI の確立に必須であることから、その確立が卵形成過程のどの時期にあるか探査した。その結果、*Xist* 遺伝子領域では、卵成熟前から確立していることが明らかとなった (図 2)。しかし、卵形成過程では *Xist* 遺伝子領域のクロマチン凝縮が観察され、ヒストン修飾のゲノムワイドな制御が示唆された (図 2)。



3) ヒストン修飾はクロマチン凝縮に関与する

卵形成過程で確立する *Xist* 遺伝子領域のクロマチン凝縮にヒストン修飾が関与するか検討した。DNA-FISH 解析から H3K9me3 とヒストン脱アセチル化は、着床期でのクロマチン凝集に関与することが明らかとなった (図 3)。

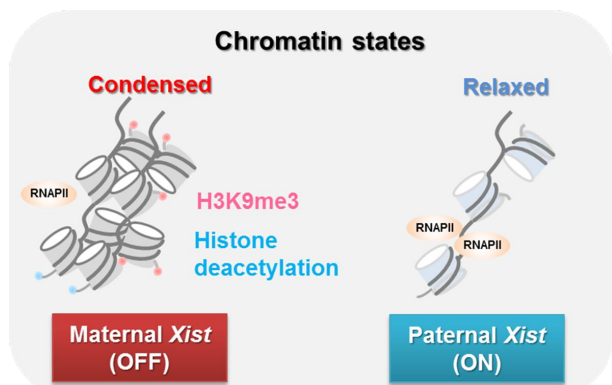


図 3. ヒストン修飾によるクロマチン凝縮

4) 多能性因子 Oct4 はクロマチン構造の変化に関与する

クロマチン構造に関して更なる洞察を深めるために、多能性転写因子である Oct4 の発現と機能に着目した。マウスの初期胚では Oct4 がダイナミックな局在変化することが明らかとなった。さらに、Oct4 の異所性発現はクロマチン構造に変化することが明らか

となった(図4)。さらに、Oct4抑制胚でXist領域のクロマチンの凝縮に關与することを突き止めた(図4)。

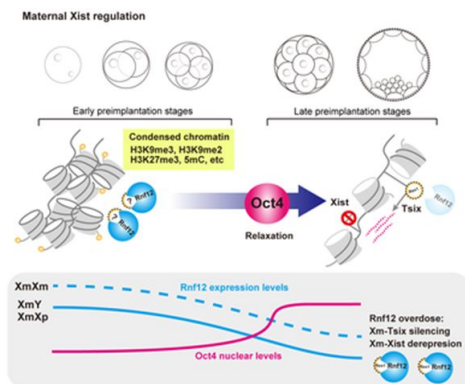


図4 .Oct4によるクロマチン弛縮

5) 初期胚でのエピゲノム改変は致死性胚を救う
ヒストン修飾の改変は母方ゲノムのXCI確立を可能にしたことから、Xist父方欠損胚の父性を回避できるか検討した。その結果、着床期でのH3K9me3除去およびヒストンアセチル化は、Xist欠損致死性胚をレスキューすることが可能となった(図5)。

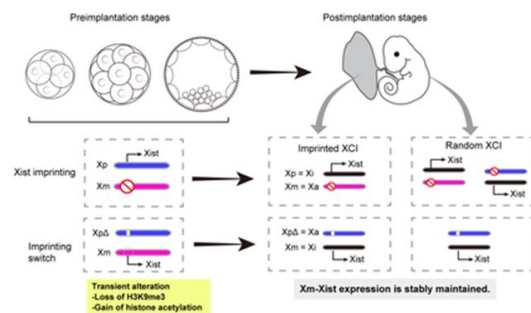


図5 .一過性のエピゲノム改変によるXist欠損致死性胚のレスキュー

<考察>

本研究から、着床前期胚におけるヒストン修飾の非対称性破綻は、X染色体不活化に著しい影響を与えることが明らかとなった。これらの結果は、胚のエピゲノム変異は、原因不明不育症の原因となり得ることを実験的に示した。さらに、着床期で一過性にエピゲノム修飾改変することは、抑制された遺伝子を恒久的に発現させることが可能であり、新たな生殖医療への可能性を示した。

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 6件)

- 1) Mitani A*, Fukuda A*, Miyashita T, Umezawa A, Akutsu H. The serine 106 residue within the N-terminal transactivation domain is crucial for Oct4 function in mice. *Zygote* 2017 Apr;25(2):197-204.
- 2) Fukuda A, Mitani A, Miyashita T, Kobayashi H, Umezawa A, Akutsu H. Spatiotemporal dynamics of OCT4 protein localization during preimplantation development in mice. *Reproduction*. 2016 Nov;152(5):417-30.
- 3) Fukuda A, Mitani A, Miyashita T, Sado T, Umezawa A, Akutsu H. Maintenance of Xist Imprinting Depends on Chromatin Condensation State and Rnf12 Dosage in Mice. *PLoS Genetics*. 2016 Oct 27;12(10):e1006375.
- 4) Fukuda A, Mitani A, Miyashita T, Umezawa A, Akutsu H. Chromatin condensation of Xist genomic loci during oogenesis in mice. *Development*. 2015. 10.1242/dev.127308.
- 5) 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*. 5:14101, 2015.
- 6) Fukuda A, Tomikawa J, Miura T, Hata K, Nakabayashi K, Eggan K, Akutsu H, Umezawa A. The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome inactivation and embryogenesis in mice. *Nature Communications*. 5:5464, 2014

[学会発表](計 1 件)

X-chromosome inactivation: a tribute to Mary Lyon (oral presentation)
The Royal Society, London, 6-9 Carlton House Terrace, London, SW1Y 5AG
October.3-5.2016

[図書](計 件)

[産業財産権]
出願状況(計 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 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

福田 篤 (FUKUDA, Atsushi)
国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・研究員
研究者番号：00638091

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：