

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07779

研究課題名(和文) 哺乳動物の初期胚におけるニュートリエピジェネティクス

研究課題名(英文) Nutriepigenetics in mammalian preimplantation embryos

研究代表者

池田 俊太郎 (Ikeda, Shuntaro)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：50447893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：初期胚を取り巻く栄養素の利用可能性はエピジェネティクスを変化させ得る環境要因の一つである。本研究では、メチオニンをS-アデノシルメチオニンに変換する酵素、メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ(MAT)の哺乳動物の着床前発生、特に胚盤胞発生における必須性を明らかにするとともに、ウシ初期胚においてMATが相互作用するゲノム領域の探索、メチオニン代謝およびそれと関連する栄養素であるビタミンB群の初期胚の発生と特定の遺伝子のエピジェネティック修飾における役割の解析から、栄養素によるエピジェネティクスの制御・変化すなわちニュートリエピジェネティクスの基盤の一部を解明した。

研究成果の概要(英文)：Availability of nutrients surrounding early embryos is one of the environmental factors that can change their epigenetics. In the present study, we demonstrated the indispensability of methionine adenosyltransferase (MAT), which converts methionine to S-adenosylmethionine, in mammalian preimplantation development, particularly in blastocyst development. Furthermore, we revealed a part of the basis of nutriepigenetics (control and/or changes of epigenetics by nutrients) by the exploration of MAT2A-associated genomic regions in bovine early embryos and the investigation of the roles of methionine metabolism and related nutrients i.e., B vitamins in development and epigenetic modifications of specific genes in early embryos.

研究分野：動物生殖生理学

キーワード：エピジェネティクス ニュートリエピジェネティクス 初期胚 着床前胚 ウシ One-carbon metabolism

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスは、DNAの配列変化を伴わない遺伝子発現情報の伝達であり、その発現情報は、主としてDNAのメチル化やDNAに付随するヒストンタンパク質のメチル化等の修飾によって決定される。哺乳動物の受精直後の初期胚発生は、エピジェネティクスの主要な機構の一つであるDNAやヒストンのメチル化がダイナミックに変化する時期であり、環境要因によるメチル化の擾乱に対し脆弱な時期でもある。

一方、エピジェネティック機構に影響を与える環境要因として栄養がある。中でも、アミノ酸の一つであるメチオニンは、DNAやヒストンのメチル化の際の唯一のメチル基源、S-アデノシルメチオニン(SAM)の前駆物質であり、エピジェネティック機構への密接な関与が考えられる。研究代表者らは、本課題に至るまでの科研費研究課題により、ウシ初期胚におけるメチオニン代謝経路関連酵素の遺伝子発現動態を明らかにし、初期胚におけるメチオニン代謝の異常がDNAのメチル化の変化を引き起こし、さらに特定の遺伝子の発現異常を伴うことを見出した。また近年、妊娠の初期に、メチオニンやその代謝経路(図1)を構成するビタミンB群等の栄養素の不足に曝された母体に由来する産子では、組織におけるDNAのメチル化の変化が起こっており、成長や脂質代謝、糖代謝が変化することが報告されている。これらの知見は、初期胚発生期における栄養環境が、出生後の形質にまで影響を与え、その背景にはエピジェネティクスが関与していることを示唆している。しかし、栄養環境の変化によってエピジェネティクスが変化する遺伝子と形質との間に因果関係があるのか、その変化は初期胚においてすでに起きているのか、なぜ胚全体を覆う栄養環境の変化が、全ての遺伝子ではなく特定の遺伝子に発現の変化をもたらすのか不明であり、これらの疑問に対して答えを見出すことは、栄養素(Nutrients)によるエピジェネティクス(Epigenetics)の制御あるいは変化を示す概念であるニュートリエピジェネティクス(Nutriepigenetics)の基盤を解明することに資すると考えられる。

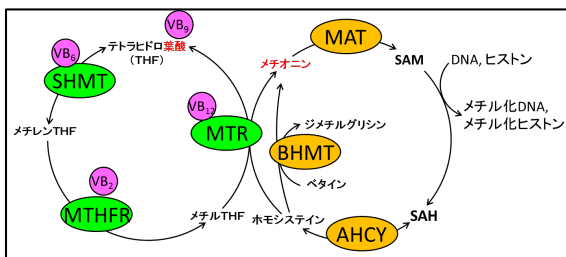


図1. この代謝経路におけるメチオニンの代謝産物、S-アデノシルメチオニン(SAM)は重要なエピジェネティック機構であるDNAやヒストンのメチル化の際の唯一のメチル基源である。また、メチオニンの代謝は葉酸(ビタミン B9)の代謝と共役しておりその代謝経路には補酵素

として他のビタミンB群も関与する。楕円は各代謝反応を触媒する酵素を表す。

2. 研究の目的

上述の通り、DNAやヒストンのメチル化においては、SAMが唯一のメチル基源であることから、メチオニンのSAMへの変換は、ニュートリエピジェネティクスの根幹に関わっていると予想される。そこで本研究では、メチオニンをSAMに変換する酵素、メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ(methionine adenosyltransferase; MAT)に着目した。MATの内、MATはヒストンメチル化酵素と複合体を形成し、特定の遺伝子領域のクロマチンに結合することが報告されている。本研究ではウシ初期胚においてMATが相互作用する遺伝子やMATの触媒するメチオニンの代謝、あるいはそれと共役する代謝経路を構成するビタミンB群の機能を切り口にして、ニュートリエピジェネティクスの基盤メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ2Aのウシ初期胚における機能解析

MATを構成する触媒サブユニットであるMAT2Aについて、免疫蛍光染色およびウェスタンブロットを用いてウシの卵母細胞および受精後の初期胚におけるタンパク質発現を調べた。また体外受精で作出したウシ初期胚の体外培養において、MAT2Aの低分子阻害剤(FIDAS)処理、あるいはsiRNAを用いたMAT2AのRNAiによる遺伝子発現阻害が胚盤胞までの発生に及ぼす影響を調べた。

(2)メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ2Aが相互作用するウシゲノムDNA領域の探索

体外受精によって作出したウシ胚盤胞から抽出したクロマチンを断片化後、Input、MAT2A抗体によるChIP(MAT2A-ChIP)、ネガティブコントロール抗体によるChIP(IgG control)に供した。2回のChIPで得られたInput、MAT2A-ChIP、IgG controlのそれぞれのDNA合計6サンプルについて、インデックス配列を付加したライブラリを調製し、マルチプレックスシーケンスに供した。リードをリファレンスゲノム(bosTau8)に対してマッピング後、ピークコールを行い、ピーク近傍(<100kb)の遺伝子についてAgriGO(<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>)ツールを用いてジーンオントロジー(GO)解析を行った。

(3)メチオニン代謝の阻害がマウス初期胚の細胞分化関連遺伝子の発現とエピジェネティック修飾に及ぼす影響の解析

過排卵処理後の交配により得たマウス1

細胞期胚を、メチオニンを含まない培養液(対照区)、メチオニンの代謝拮抗物質(エチオニン、10 μM)を含む培養液、エチオニンおよび過剰量のメチオニンを含む培養液で培養し、胚盤胞の発生率を評価した。得られた胚盤胞について RT-qPCR により細胞分化関連遺伝子の発現量を比較するとともに、それぞれのプロモーター領域について、DNA のメチル化の程度をバイサルファイトシーケンス法を用いて、またヒストン H3K9 のトリメチル化(H3K9me3)の程度を ChIP-qPCR を用いて比較した。

(4) ウシ初期胚の発生と長期影響遺伝子のエピジェネティクスに及ぼすビタミンB群の影響の解析

体外受精により作出し5細胞期以上に発生した胚を通常の培養液(対照区)あるいはビタミンB群ミックスを添加した培養液で培養し、胚盤胞までの発生に及ぼす影響を調べるとともに、体外培養によるストレスマーカーであり、エピジェネティック機構を介して長期にわたり成長や代謝に影響をおよぼす可能性が指摘されている TXNIP 遺伝子について、その発現とヒストン H3K27 のトリメチル化(H3K27me3)を(3)と同様の方法で解析した。

4. 研究成果

(1) メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ2Aはウシ胚の胚盤胞発生に必須である

免疫蛍光染色およびウェスタンブロッティングの結果、MAT2A がウシ卵子および胚盤胞までの初期胚発生を通じて発現していることが明らかとなった(雑誌論文)。ウシ体外受精胚の体外培養液に MAT2A 阻害剤 FIDAS を添加すると5-8細胞期までの初期分割に影響は見られなかったが、胚盤胞発生が著しく抑制された(雑誌論文)。さらに MAT2A が胚盤胞発生において必須であることは、RNAi による MAT2A ノックダウンにより胚盤胞発生が停止したことから確認された(図2、雑誌論文)。

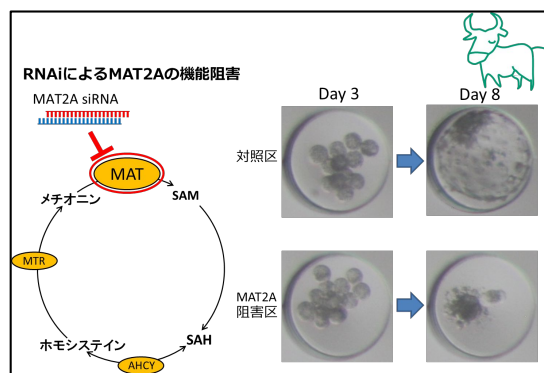


図2. メチオニンというたった一つのアミノ酸の、しかも S-アデノシルメチオニン(SAM)への変換というたった一つの代謝を阻害するだけでウシの胚盤胞発生が起らなくなる。Day 3 は体外受精後3日目(RNAi 処理前)、

Day 8 は8日目を(RNAi 処理から5日後)を表す。対照区の Day8 で見られる風船状に膨らんだ胚が胚盤胞。胚盤胞の中の黒く見える細胞の塊が将来胎仔を形成する内部細胞塊。胚を覆う透明帯は siRNA を導入するために除去してある。

(2) メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ2Aが相互作用するウシゲノムDNA領域

MAT2A 抗体を用いた ChIP-seq 解析の結果、Input あるいは IgG control に対して有意な76ピークを同定し、その内いくつかのピークについて ChIP-qPCR によるバリデーションを行った。これらのピークの近傍にある遺伝子についてジーンオントロジー(GO)解析を行ったところ、胚盤胞発生のみならず成長・代謝・免疫機能に関連する GO タームが有意となり、MAT2A がこれらの遺伝子と相互作用することにより、初期胚発生のみならず長期にわたって個体の形質に関与することが示唆された(図3・表1、雑誌論文)。

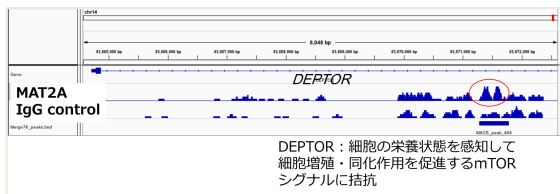


図3. ChIP-seq によって得られたピークの例。DEPTOR 遺伝子の第1イントロンに IgG control に対して有意とされたピーク(赤丸部分)が存在する。図はIGV(<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>)を使用して作画した。

表1. MAT2A との相互作用が示唆された遺伝子によって代表される主な生物学的プロセス

GO番号	GO	遺伝子
GO:0048869	細胞増殖プロセス	PPARD BEX5 TIMP1 RAB3B KIRREL3 MAEA B3GNT8
GO:0030154	細胞分化	ELMO2 SPON2 PEAR1 HDAC8
GO:0042981	アポトーシス制御	BEX5 TNFRSF10D ARAF TIMP1 WRN
GO:0000003	繁殖	
GO:0022414	繁殖プロセス	PPARD ELMO2 RAB3B HDAC8 DY5F
GO:0048856	解剖学的構造発生	PPARD BEX5 HDAC8 TIMP1 RAB3B KIRREL3 CXCR3 DEF6 ARAF MAEA B3GNT8 SPON2 PEAR1 DY5F
GO:0007275	多細胞性組織発生	PPARD BEX5 ZNF280B TIMP1 RAB3B NXF3 KIRREL3 CXCR3 DEF6 ARAF MAEA B3GNT8 HDAC8 SPON2 PEAR1 DY5F WRN
GO:0008152	代謝プロセス	PPARD PIK3R4 LRRC71 ZNF280B LOXL2 AOA4 ABCA1 RAB3B DEPTOR KIRREL3 DEF6 ARAF HDAC8 B3GNT8 ZNF674 PEAR1 BHM1 OSBP19 BCKDHA WRN TIMP1
GO:0006629	脂質代謝プロセス	PPARD AOA4 ABCA1 BCKDHA OSBP19
GO:0002376	免疫系プロセス	KIR2DL1 LRRC71 TIMP1 KIRREL3 CXCR3 DEF6 MAEA SPON2 VAMP7 HDAC8
GO:0006955	免疫反応	KIR2DL1 LRRC71 DEF6 SPON2 VAMP7 HDAC8

(3) メチオニン代謝の阻害がマウス初期胚の細胞分化関連遺伝子の発現とエピジェネティック修飾に及ぼす影響

マウス初期胚の体外培養において、対照区に比べ、メチオニンの代謝をエチオニンによって阻害した区(Et 区)では胚盤胞発生率および細胞数(総・栄養膜細胞・内部細胞塊)が低下し、細胞分化関連遺伝子 Oct4、Nanog、Tead4 の高発現が見られたが、エチオニンとともにメチオニンを過剰量添加した区ではそれらが回復した。これら3つの遺伝子のプロモーター領域について、H3K9me3 は Et 区に

において低下し、この低下はやはり過剰量のメチオニン添加によって回復した。一方、DNAのメチル化の程度(NanogとTead4について解析した)には変化がなかった。これらの結果から、マウスの初期胚において、メチオニン依存的なヒストンのメチル化が存在することが示され、メチオニンはこの機構を介して胚盤胞の発生と分化において重要な特定の遺伝子の発現制御に関わっていることが示唆された(雑誌論文)。

(4) ウシ初期胚の発生と長期影響遺伝子のエピジェネティクスに及ぼすビタミンB群の影響

体外受精胚をビタミンB群ミックスを添加した培養液で培養すると胚盤胞発生率および透明帯からの脱出率が有意に増加した。また、体外培養に起因するストレスによる長期影響遺伝子の候補であるTXNIPの発現を半分程度に抑制することができた。ビタミンB群添加条件下で発生した胚盤胞ではH3K27me3のヒストン修飾の全体量が増加しており、その増加はTXNIPのプロモーター領域に限定して解析した場合でも検出された。これらの結果から、ビタミンB群は、初期胚の発生する環境において胚のストレスを抑え、長期にわたる成長・代謝をプログラミングする可能性が示唆された(図4、雑誌論文)。

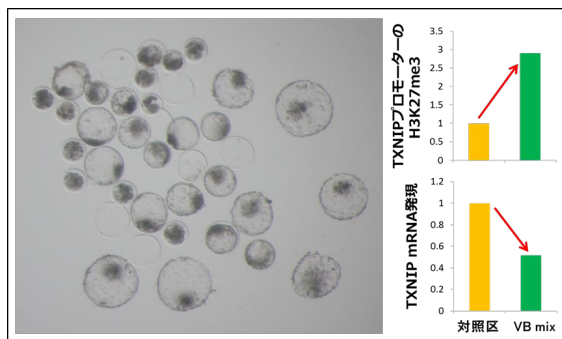


図4. 写真はビタミンB群添加培養液で発生した体外受精後8日目のウシ胚。グラフはTXNIPプロモーターのH3K27me3とmRNA発現のレベルを対照区に対する相対値で示している。ビタミンB群の添加により胚盤胞発生が促進されるだけでなく、胚の内部ではTXNIPの発現がエピジェネティック修飾とともに抑制されている。

以上の研究を通じて、MATの機能およびそれと関連するビタミンB群が初期胚における発生上重要な遺伝子のエピジェネティック機構に関与することを明らかにし、哺乳動物の初期胚におけるニュートリエピジェネティクスの基盤の一部を解明した。

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5件)

Methionine-dependent histone methylation at developmentally important

gene loci in mouse preimplantation embryos.

Kudo M・Ikeda S・Sugimoto M・Kume S
J Nutr Biochem. 2015;26(12):1664-9. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.08.009. (査読有)

家畜初期胚におけるニュートリエピジェネティクス-One-carbon metabolismの初期胚発生における役割-

池田俊太郎
栄養生理研究会報 2016;60(1):1-11.
www.agri.tohoku.ac.jp/ruminol/eiyoseiri/JSANM-Journal60(1)/60(1)-1.pdf (査読有)

Role of methionine adenosyltransferase 2A in bovine preimplantation development and its associated genomic regions.

Ikeda S・Kawahara-Miki R・Iwata H・Sugimoto M・Kume S
Sci Rep. 2017;7(1):3800. doi: 10.1038/s41598-017-04003-1. (査読有)

The RPMI-1640 vitamin mixture promotes bovine blastocyst development in vitro and downregulates gene expression of TXNIP with epigenetic modification of associated histones.

Ikeda S・Sugimoto M・Kume S
J Dev Orig Health Dis. 2018;9(1):87-94. doi: 10.1017/S2040174417000563. (査読有)

Lipofection of siRNA into bovine 8-16-cell stage embryos using zona removal and the well-of-the-well culture system.

Ikeda S・Sugimoto M・Kume S
J Reprod Dev. 2018;64(2):199-202. doi: 10.1262/jrd.2017-137. (査読有)

[学会発表](計9件)

着床前胚発生におけるone-carbon metabolismの役割(招待講演)

池田俊太郎
第60回日本生殖医学会学術講演会(2015.4.27:パシフィコ横浜)

マウス着床前胚におけるメチオニン依存的なヒストンのメチル化

工藤麻里・池田俊太郎・杉本実紀・久米新一
第108回日本繁殖生物学会大会(2015.9.17~19:宮崎大学)

ウシ着床前胚におけるメチオニンアデノシルトランスフェラーゼの阻害による遺伝子発現の変化

池田俊太郎・工藤麻里・杉本実紀・久米新一
第108回日本繁殖生物学会大会(2015.9.17~19:宮崎大学)

家畜初期胚におけるニュートリエピジェ

ネティクス-One-carbon metabolism の初期
胚発生における役割- (招待講演)

池田俊太郎

平成 28 年度家畜栄養生理研究会春季集談会
(2016.3.26: 日本獣医生命科学大学)

ウシ着床前胚における MAT の阻害が IGFBP3
近傍のヒストン修飾に及ぼす影響

池田俊太郎・杉本実紀・久米新一

日本畜産学会第 121 回大会(2016.3.27~30:
日本獣医生命科学大学)

ウシ胚盤胞において MAT2A と相互作用する
ゲノム領域の探索

池田俊太郎・川原玲香・岩田尚孝・杉本実紀・
久米新一

東京農業大学生物資源ゲノム解析拠点シン
ポジウム・研究発表会(2016.9.6: 東京農業
大学)

簡易かつ高効率なウシ 8-16 細胞期胚への
siRNA 導入法

池田俊太郎・杉本実紀・久米新一

第 1 回日本胚移植技術研究会大会(第 24 回日
本胚移植研究会大会)(2017.9.19~20: 京都
大学)

B vitamin mixture promotes bovine
blastocyst development in vitro and
downregulates gene expression of TXNIP
with epigenetic modification of
associated histones

Ikeda S・Sugimoto M・Kume S

4th World Congress of Reproductive Biology
(2017.9.27~29: Okinawa Convention Center,
Japan)

ウシ初期胚における葉酸サイクル関連酵
素の発現動態と機能の解析

石谷洋希・池田俊太郎・杉本実紀・久米新一
日本畜産学会第 124 回大会(2018.3.28~30:
東京大学)

6. 研究組織

(1)研究代表者

池田 俊太郎(Ikeda Shuntaro)

京都大学大学院・農学研究科・助教

研究者番号: 50447893

(2)研究協力者

岩田 尚孝(Iwata Hisataka)

東京農業大学・農学部・教授

研究者番号: 50385499

杉本 実紀(Sugimoto Miki)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号: 20243074

久米 新一(Kume Shinichi)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 90355454