

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03680

研究課題名(和文) 精子のエピゲノム修飾と経世代変化

研究課題名(英文) Epigenetic modification of sperm and its trans-generational changes.

研究代表者

幸田 尚 (KOHDA, Takashi)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：60211893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではこれまで我々が開発してきたmC、hmCを区別して塩基単位で解析を行う新技術であるEnIGMA(Enzyme-assisted Identification of Genome Modification Assay)法をマウス精子ゲノムのシトシンの修飾解析に適用し、個体の生理的条件下で精子のゲノムのシトシン修飾が変化する条件を探すことを目指した。この目的のため、新たに次世代シーケンサーを用いてゲノムワイドにシトシン修飾の状態を解析する「ゲノムワイドEnIGMA-seq」技術の開発を行い、実際に全ゲノムの網羅的シトシン修飾に有効であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究で新たに開発したゲノムワイドEnIGMA-seq技術は、1塩基解像度でゲノムのシトシン修飾をメチルシトシン、ヒドロキシメチルシトシン、非修飾のシトシンの3つの状態のいずれであるかを同時に1分子上で開発することのできる手法であり、エピゲノム研究の新しい基盤技術として重要な意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：We have been developing a new technique, Enzyme-assisted Identification of Genome Modification Assay (EnIGMA), which allows us to distinguish between mC and hmC at single-base resolution. In the present study, we applied this method to the analysis of cytosine modification in the mouse sperm genome and aim to identify the conditions that would alter the cytosine modification of the sperm genome. To this end, we have successfully developed a new method, genome-wide EnIGMA-seq, that is capable of identification of cytosine modification status in the genome. In fact, we have shown that this new method is effective for comprehensive cytosine modification of the entire genome.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：ヒドロキシメチルシトシン シトシン修飾 精子

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ほ乳類のエピジェネティクス研究における重要なトピックの一つは、世代を経て伝達されるエピジェネティックな情報はどの程度存在し、どのような遺伝子が影響を受けるのかを明らかにすることである。ほ乳類においては受精直後から着床までの初期発生の過程でゲノムワイドに DNA の脱メチル化が引き起こされることが知られており、またヒストン修飾の大規模なリプログラミングも起こることから、配偶子のエピゲノム修飾は受精後の胚発生の過程でごくわずしか保たれないと考えられている。そうした中でもレトロトランスポゾンである IAP が挿入された *Agouti*<sup>vy</sup> の例をはじめとして、親の環境から受けた影響が経世代的に子供に伝わる現象が報告されている (Daxinger L. & Whitelaw E. Nat. Rev. Genet. 2012;13(3):153-162)。

一方、ほ乳類の発生におけるエピジェネティックな遺伝子発現の制御において、受精から着床までの時期は重要な過程である。Zygotic gene activation と呼ばれる最初の遺伝子発現が起こる時期であり、受精直後のゲノムは精子に由来したアレルと卵に由来したアレルでそのエピジェネティックな状態は大きく異なる上に、1 細胞期の胚においては雄性前核でのみゲノムワイドにメチルシトシン(mC)が急速にヒドロキシメチルシトシン(hmC)への酸化されることを契機として脱メチル化されることが最近明らかにされた。さらに、ヒストン修飾も両アレルで大きく異なり、ダイナミックに変化することが知られている(Kohda T & Ishino F. Philos Trans R Soc Lond B 2013;368(1609):20120353.)。また発生初期のこの時期は体外受精や胚の体外培養など胚操作の行われる時期であり、これらの操作がヒトの胚発生やその遺伝子発現制御に及ぼす影響を正確に知ることは重要である。我々は顕微授精(ICSI)によって受精した個体の遺伝子発現調節をマウスを用いたモデル系で解析した。その結果、顕微授精の技術そのものが出生時まで消えることのない遺伝子発現制御の変化を引き起こすことを明らかにした(Kohda T. *et al.* Biochem Biophys Res Commun. 2011;410(2):282-288)。また、ヒトの胚盤胞期胚の遺伝子発現プロファイルを単一胚レベルで RNA-seq 解析したところ、遺伝子発現に最も大きな影響を及ぼす因子は親の年齢であることを明らかにした。これらの結果も、遺伝子発現の変化と配偶子ゲノムのエピジェネティックな修飾との関連を明らかにすることは重要であることを示している。特に、精子に関しては細胞質がほとんどないことから世代間で伝達される情報は限られており、シトシン修飾を mC だけでなく hmC を含めて詳細に解析し、受精後の遺伝子発現との相関を解析することで、経世代的なエピジェネティック情報の伝達について明確な結論が導き出せる可能性が期待される。

これまでシトシン修飾のゲノムワイド解析は、mC と hmC を個別に解析する手段しかなく、シトシン修飾を定量的かつ網羅的に解析することはできなかった。申請者らは mC、hmC と非修飾のシトシンを 1 塩基レベルで同時に定量的に解析する手法が必須であると考え、挑戦的萌芽研究「ヒドロキシメチルシトシンの塩基単位での同定法の確立(2012 年度~2013 年度)」において全く新しい原理による hmC の解析法の開発を開始し、94%以上の高精度での解析に成功して Enzyme-assisted Identification of Genome Modification Analysis (EnIGMA)法と名付けた(Kawasaki Y, Kuroda Y, Suetake I, Tajima S, Ishino F, Kohda T. Nucleic Acids Res. 2017;45(4):e24)。

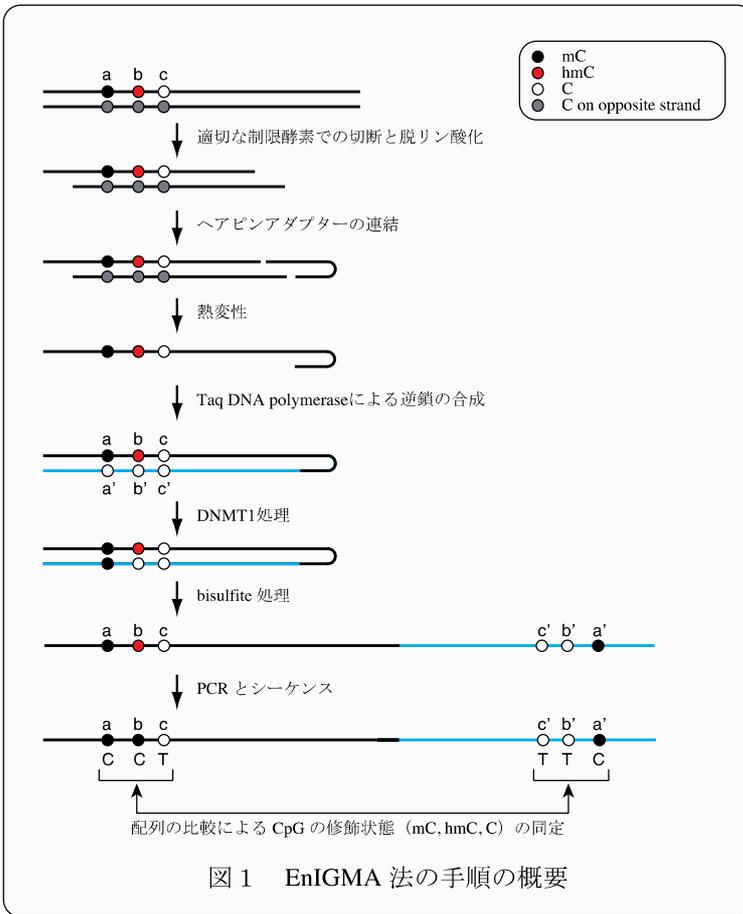
### 2. 研究の目的

本研究では、EnIGMA 法を用いてマウス精子ゲノムのシトシンの修飾を網羅的に解析するとともに受精後の胚を解析することで、受精直後の雄性前核特異的なゲノムのヒドロキシメチル化による脱メチル化過程を経ても、父親の配偶子におけるシトシン修飾が次世代に伝達しうるかを明らかにすることを最終的な目的とした。これを明らかにすることができれば基礎生物学的に重要であるだけでなく、顕微授精をはじめとした受精過程や体外培養による初期発生の過程への介入、親の生理的条件が配偶子に及ぼした影響が次世代の遺伝子発現調節に影響を及ぼすかどうかなど、ヒトの生殖補助医療において重要な課題への基礎的知見になると期待できる。そこで、本研究ではマウスの完成精子のゲノムのシトシン修飾を hmC も含めて 1 塩基単位でゲノムワイドに解析し、これが変化するような生理的条件を探索することを目的とした。そこで、この目的のため我々が新たに開発した EnIGMA 法を次世代シーケンサーを用いたゲノムワイド解析に適用させるための技術開発を完了する。次にこの手法を用いて精子ゲノムの解析を行い精子ゲノムにおいて hmC が十分測定できる量存在する部位を同定することとした。さらにこのような領域を見出すことができた場合には、mC、hmC のレベルが大きく変動する生理的条件を探索し、実際にその条件下で得られた精子を用いて顕微授精を行って次世代の胚の遺伝子発現に変化を生じるかを確認することを計画した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ゲノムワイド EnIGMA-seq 法の完成

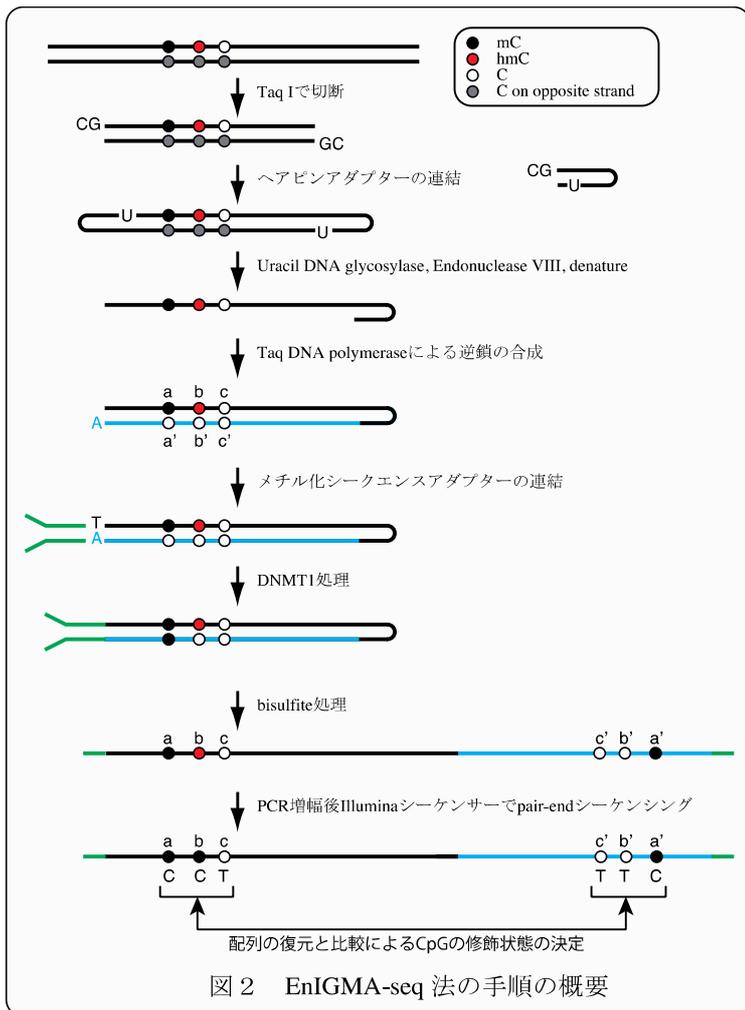
本研究ではこれまで我々が開発してきた mC、hmC を区別して塩基単位で解析を行う新技術である EnIGMA(Enzyme-assisted Identification of Genome Modification Assay)法を、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイド解析に適用するための技術的改良を行った。本法は維持メチル化酵素である DNMT1 が hemi-mC の逆鎖のシトシンをメチル化するが hemi-hmC の逆鎖のシトシンはメチル化しない性質を持つことを利用し、mC と hmC を区別する方法である。図 1 に示すようにゲノムを 5'突出の切断点を持つ制限酵素で切断後、ヘアピンを形成する合成 DNA を末端に結合する。この際、合成 DNA の 5'はリン酸化し、3'端は 1 塩基のギャップを残すように設計を行い、これをプライマーとして nick translation と同様に E. coli DNA polymerase を用いて逆鎖の合成を



行う。その後、この DNA を DNMT1 酵素で処理することによりメチル化を行うと、元の DNA 鎖が mC であれば対応する部分もメチル化されるが、hmC である場合はメチル化されない。処理後の DNA を bisulfite 処理して全体を PCR で増幅し配列を決定することにより、元の配列と連結された逆鎖の対応部分のメチル化状態をあわせて解析することで C、mC、hmC を同定することを可能にする。ゲノムワイド EnIGMA 法へと発展させるため、図2に示すように以下のような改良を行った。まず、ゲノム DNA の切断については二つの手法を用意した。第1は DNA を超音波切断した後に Taq DNA polymerase を用いて末端に 3'突出の A を付加する方法である。この場合は EnIGMA 法に用いるヘアピン状の DNA として 3'に T が1塩基突出したものを用意した。第2はシーケンスの read 数を抑えるために Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) 法

と同様な手法として、CpG を含む認識配列を持つ4塩基認識制限酵素で切断する手法である。通常 RRBS 法では制限酵素としてしばしば *Msp I* が用いられるが、この酵素は hmC 修飾に対する

選択性があるという報告があったため *Taq I* を用いてゲノムを切断した。この場合は EnIGMA 法に用いるヘアピン状の DNA として 5'に CG が2塩基突出したものを用意した。また、いずれの場合でもヘアピンの 3'直前にウラシルを1塩基含むようにアダプターを合成し、DNA ligase によってゲノム DNA 断片の両端にヘアピンアダプターを結合後、Uracil DNA glycosylase および Endonuclease VIII にて U の位置をギャップに変換し、熱変性を行った後続けて Taq DNA polymerase にて逆鎖の合成を行った。逆鎖合成後、末端の 3'突出の A を用いて Illumina 社の次世代シーケンサー用のメチル化アダプターを付加し、以降は同様に DNMT1 処理、bisulfite 反応を行って PCR 増幅後にシーケンスを行った。シーケンスは Illumina 社の MiniSeq または HiSeq を用い pair-end で 100 塩基ずつシーケンスを行った。シーケンスデータは対応する pair-end の配列として二つの fastq ファイルとして得られるが、これを用いて元のゲノムの配列を復元するとともに配列内



に出現する全ての CpG についてシトシンの修飾状態を mC、hmC、C のいずれであるかを判定し、新たな単一の fastq ファイルとして出力する Perl のスクリプトを作成するとともに、集計解析を行うスクリプトも作成した。

#### (2) マウス精子ゲノムにおける hmC の集積を示す部位の探索

完成した *Taq I* を用いた RRBS 版の EnIGMA-seq をマウスの精子ゲノムの解析に適用した。併せて、異なる技術に基づく hmC の解析法である hmDIP 法を用いて同じく精子ゲノム上で hmC が集積している部位の探索を行い、両者が一致する CpG 部位を検索した。候補として挙げられた CpG については単一位位の EnIGMA 法による解析および glucMS-qPCR 法 (Davis, T. and Vaisvila, R. 2011; J. Vis. Exp., 48, e2661.) による解析を行い確認を行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) ゲノムワイド EnIGMA-seq 法の完成

研究開始当初の背景で述べたように、我々は本研究を開始するまでに新しい原理に基づいたゲノム DNA のシトシン修飾を網羅的かつ同時に解析する新手法を開発し、EnIGMA 法と名付け発表してきた。この手法は既報の hmC 解析法である TAB-seq や oxBS-seq では、hmC のみ、あるいは mC のみを解析し、mC と hmC を区別できない旧来の bisulfite-seq によって得られた結果との引き算によって mC と hmC を定量する必要があった。そのため、mC と hmC の存在比について十分な精度を得ることが難しく、ゲノムワイドの解析では定量性を得るためには多くの DNA 分子を用いてリード数を十分に取る必要がある。一方 EnIGMA 法では mC、hmC、非修飾 C を同一分子上で同時に同定可能であるため、1 度の実験で高精度の解析が可能な画期的な新手法である。このため EnIGMA 法は広くエピゲノム解析の基盤的ツールとして強力な手法となることが期待できる。

実際にマウス ES 細胞のゲノムを用いて *Taq I* を切断に用いた RRBS 版の EnIGMA-seq を適用して解析を行った。シーケンスの結果は良好で、pair-end のシーケンスデータを構築した Perl のスクリプトを用いて元のゲノムの配列を復元するとともに配列内に出現する全ての CpG についてシトシンの修飾状態を mC、hmC、C のいずれであるかを判定した。その結果、予想通り欠失等を含まず元のゲノムの配列を復元することができた read の割合は 58% 程度であった。また、同時に配列に含まれる CpG のシトシンの位置、シトシンの修飾状態を mC、hmC、C のいずれであるかの判定した結果を fastq ファイルのコメント行の最後の部分に CIGAR と類似の形式にまとめて出力した。復元された配列データをマウスのリファレンスゲノムに対して bowtie2 を用いてマッピングを行ったところ、99% の配列がマッピングされた。得られた sam ファイルにもそのままシトシンの修飾状態の判定結果は引き継がれることを確認した。これを用いて得られたデータを集計したところ 173,358 個の CpG について判定を行うことができたことが確認された。しかし、読み始めから 20 塩基目まではそれ以降と比べて明らかに hmC のレベルが 1.5 枚程度高く判定されていることが明らかとなった。これは DNMT1 の反応がシーケンス用のアダプター配列の近傍で低くなってしまふことを示唆している。そこで、読み始めから 20 塩基目までを除いて集計を行ったところ mC が 44.0%、hmC が 3.2%、C が 52.8% であった。この結果はゲノムワイド EnIGMA-seq 法の適用結果は良好であることを示していると考えられる。同時に全ての CpG について mC、hmC、C の修飾状態に対して最も近い CpG の修飾状態を集計した。図 3 に

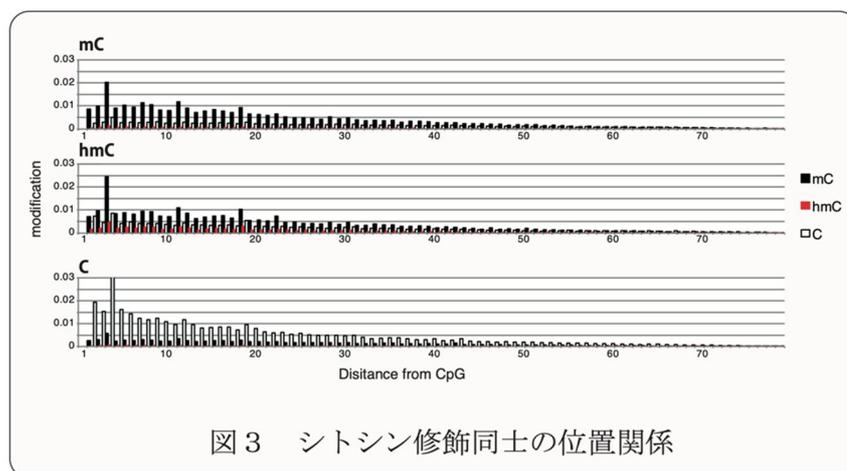


図 3 シトシン修飾同士の位置関係

任意の CpG の修飾状態が mC、hmC あるいは C であった場合に次の CpG までの距離によって mC、hmC、C のいずれであるかをまとめた。mCpG と hmCpG の近傍の mC の割合はほぼ同じで他の修飾状態よりも多く、非修飾 CpG の近傍の CpG は非修飾である場合が多かった。一方 hmCpG の近傍の hmCpG は mC 近傍と比較して

高い傾向が認められた。このように、従来の他の hmC の解析法と異なりゲノムワイド EnIGMA-seq 法の場合は CpG の修飾状態を周囲のコンテキストと照らして同一分子上で同時に解析することが可能となることが示された。

#### (2) マウス精子ゲノムにおける hmC の集積を示す部位の探索

ゲノムワイド EnIGMA-seq 法が実際にシトシン修飾の次世代へ伝達する可能性を示すために生

殖細胞である完成精子のゲノム DNA のシトシン修飾を網羅的に解析することを試みた。ゲノムワイド EnIGMA-seq 法を用いてマウスの精子ゲノムを解析することを試みたが、CpG のほとんどは mC であり、hmC が有意に存在している CpG を見出すことはできなかった。解析の結果、hmC が存在している可能性が考えられた部位に関して、抗 hmC 抗体を用いた hmDIP 法の解析結果や、単一部位の EnIGMA 法による解析、glucMS-qPCR 法などを用いた解析の結果、完成精子において明らかに hmC が集積している部位を見出すことはできなかった。このため、種々の生理条件下で精子ゲノムにおいて hmC の修飾が変動する条件の探索を行うことはできなかった。しかしながら、ゲノムワイド EnIGMA-seq 法を完成させることができ、これを実際のゲノムに適用することが可能になったことは、網羅的シトシン修飾解析に重要な一歩となったと考えられる。また、EnIGMA 法の手順の中で用いている bisulfite 変換法については、処理を行うことによって DNA が切断されるため、極微量の DNA サンプルに適用することは困難であり、このことが EnIGMA 法の微量サンプルへの適用を難しいものになっている。しかしながら、最近酵素を用いて bisulfite 反応と同様の変換を行うことで DNA の切断を回避しつつ解析を行える EM-seq 法が提案された。実際、この変換法をゲノムワイド EnIGMA-seq 法に組み込むことで微量サンプルに対して適用することが可能になると考えられ、同じ生殖細胞でも材料を大量に集めることが困難な卵へもゲノムワイド EnIGMA-seq 法を適用することが可能になると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 幸田尚
2. 発表標題 両親年齢が配偶子形成から受精後の遺伝子発現調節に及ぼす影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018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
研究分担者	川崎 佑季  (Kawasaki Yuki)  (60746890)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教    (12602)	削除：2017年10月20日