

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780209
 研究課題名 (和文)
 飼料性メチル基供与体がウシ胚の発生とエピジェネティクスにおよぼす影響
 研究課題名 (英文)
 Effects of dietary methyl donors on development and epigenetics of bovine preimplantation embryos
 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

研究成果の概要：ウシ着床前胚の発生およびエピジェネティクスにおよぼす飼料性メチル基供与体(DMD)およびその代謝産物の影響を検討した。代表的な DMD であるメチオニンの代謝産物ホモシステインをウシ体外受精胚の培養系に添加すると、胚盤胞への発生が遅れるのみならず、得られた胚盤胞のサテライト I 領域の CpG 配列のメチル化が有意に低下した。DMD の代謝産物がウシ胚の着床前発生に影響をおよぼすこと、さらにその影響は、ゲノム DNA のメチル化という代表的なエピジェネティクス機構への作用を伴うことが明らかにされた。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,800,000 | 0 | 1,800,000 |
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 450,000 | 3,750,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用動物科学

キーワード：栄養と繁殖、メチル基栄養、ウシ、初期胚、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

近年、栄養の過不足、多頭飼育、暑熱ストレス等の環境要因が原因と考えられるウシの人工授精受胎率の低下が世界的に問題となっている。受胎率の低下は、分娩間隔の延長に伴う乳肉生産コストの上昇、子牛の出生数の減少による後継牛不足等の直接的な経済的損失のみならず、育種改良の遅れという長期的な悪影響をももたらす。従って、受胎率の低下を防ぎ、向上させることが重要な課題となっている。

ウシの胚は受精後 6～7 日目に桑実胚から胚盤胞という発育ステージに達し、8～10 日

目で胚の周囲を覆う透明帯からの脱出（孵化）が起こり、引き続き 14～19 日目にかけて子宮内での伸長発育が起こる。ウシにおいて妊娠喪失（受精した胚が出生まで至らないこと）の半数以上がこの胚盤胞期から伸長発育期に集中する。ウシの低下した受胎率の回復を期する上で、この胚盤胞期から伸長発育期の胚の発生の維持機構の解明が望まれる。

一方でウシ胚の発生に関与しうる環境要因の一つに栄養因子がある。種々の栄養因子は、個体による摂取と吸収を介し、胚の発生に直接・間接に影響をおよぼす。例えばウシの要求する栄養因子の一つにビタミン A が

あるが、我々は、ウシ桑実胚に対するレチノイン酸（ビタミンAの活性型）処理が、胚の細胞数を増加させること、レチノイン酸の合成を阻害する薬剤での処理が胚盤胞の孵化率を低下させることを見出している。最近、DNAの配列変化を伴わずに子孫や娘細胞に伝達される遺伝子機能の変化、すなわちエピジェネティクスによる遺伝子発現の制御機構が明らかになるにつれ、上記発生時期におけるエピジェネティクスの関与が考えられる。エピジェネティクスにおいては、ゲノムDNAのメチル化やクロマチンのアセチル化といった核クロマチンの修飾によって、特定の遺伝子の発現が制御され、そしてその修飾は娘細胞に伝達される。エピジェネティクスによる生理機能制御の興味深い点は、同じ遺伝子を持つ胚あるいは個体であっても、環境要因によってその遺伝子が伝達可能な修飾を受け、胚あるいは個体の発育を通じて、その遺伝子発現に差が生じ、結果として胚や個体の生理機能に違いが現れる点である。我々は、ウシの体外培養胚をクロマチンヒストンのアセチル化を亢進させる試薬で処理すると、胚盤胞期での細胞数および内部細胞塊と栄養膜細胞の比率が変化することを見出している。これは、エピジェネティクス制御によって胚の生理機能が変化した例と考えられる。

先に述べたように、エピジェネティクスの主要な機構にゲノムDNAのメチル化がある。精子と卵子のDNAのCpG配列のシトシン残基はともに高いメチル化状態にあるが、受精後一時的な低メチル化状態となり、胚盤胞期以降再びメチル化が始まり、さらに各組織への分化とともにメチル化レベルは急速に増加する。従って、この胚盤胞期以降のゲノムDNAのメチル化反応は、胚盤胞の孵化や伸長発育、各組織への分化、着床に密接に関与していることが考えられる。この時期がウシの妊娠喪失の主要な時期と一致することを考えあわせると、胚盤胞期以降のエピジェネティクス制御が適切に行われることが、受胎のために重要であることが予想される。家畜の飼料中には、メチル化反応に必要なメチル基を供与する因子すなわちメチル基供与体が種々含まれている。これらの物質は家畜による摂取と吸収そして最終的にはDNAのメチル化を介し、生体内のエピジェネティクス機構に直接影響をおよぼすことが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ウシ着床前胚の発生と分化およびエピジェネティクスにおよぼす飼料性メチル基供与体(DMD)およびその代謝産物の影響を検討することを目的とした。また、ウシ初期胚の体外培養は通常受精後8日程度

の胚盤胞期まで行われるが、妊娠喪失の起こりやすい胚盤胞期から伸長発育期におけるDMDの役割を解明するための基礎となる培養系を確立することを目的とし、孵化胚盤胞期以降の胚の体外培養を試みた。

3. 研究の方法

(1) ウシ胚盤胞におけるDMDの代謝経路を構成する酵素の発現を検討した。食肉市場由来のウシ卵巣より卵母細胞を回収し、体外成熟培養後、体外受精によって胚盤胞期胚を得た。得られた胚盤胞よりRNAを抽出し、RT-PCRによりMAT1A、MAT2A、MAT2B、AHCY、MTR、BHMT、SHMT1、SHMT2、MTHFRのmRNA発現を定性的に検討した。

(2) DMDとしてコリンおよびベタインに着目し、ウシ着床前胚の発生およびゲノムDNAのメチル化におよぼす影響を検討した。

(1)と同様の方法で得られたウシ8細胞期胚を、コリンあるいはベタイン(それぞれ100 μ M)を添加した合成卵管培地中で受精後8日目まで培養した(無添加培地を対照とした)。胚盤胞への発生率、細胞数および内部細胞塊と栄養膜細胞の比率を検討した。さらにゲノムDNAのグローバルなメチル化の状態を検出するために、得られた胚盤胞について抗メチル化シトシン抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。

(3)代表的なDMDにメチオニンがあるが、その代謝産物であるホモシステインがウシ着床前胚の発生およびゲノムDNAのメチル化におよぼす影響を検討した。(1)と同様の方法で得られたウシ1細胞期胚を、ホモシステイン(100 μ M)を添加した合成卵管培地中で受精後8日目まで培養した(無添加培地を対照とした)。胚盤胞への発生率を検討するとともに、得られた胚盤胞のゲノムDNAを抽出し、パイサルファイトシークエンスを用いてサテライトI領域の一部のCpG配列のメチル化を検討した。

(4) 孵化胚盤胞期以降の胚の体外培養方法を検討した。体外受精によって得られた受精後9-10日目の孵化胚盤胞を、29mMグルコース、10%(v/v)ウシ胎仔血清、100 μ M β -メルカプトエタノールを含む合成卵管培地中で受精後18日目まで体外培養し(対照区)、胚の発生を観察した。さらに培地添加物としてX(論文準備中のため公表を控える)を添加した同培地の効果も検討した。また、受精後8日目の胚盤胞、対照区における受精後9および12日目の胚盤胞について、内部細胞塊から胚盤葉上層への分化マーカーである中間径フィラメント、ビメンチンの発現を、RT-PCRおよび免疫蛍光染色を用いて検討し

た。

4. 研究成果

(1) ウシ胚盤胞における DMD の代謝経路の酵素の発現を検討したところ、先述の 9 つの酵素のうち MAT1A 以外の全ての mRNA が発現していた。さらに個々の胚盤胞において、MTR と BHMT の発現が見られないものがあった。これらの結果から、ウシ初期胚が DMD を直接代謝しうること、DMD 代謝経路の構成に個々の胚間で差異があることが示唆された。

(2) 体外受精によって得られたウシ 8 細胞期胚を、DMD としてコリンあるいはベタインを添加(それぞれ 100 μ M)した培地中で培養し、胚盤胞への発生率、細胞数および内部細胞塊と栄養膜細胞の比率を検討したところ、実験区間に差は見られなかった。得られた胚盤胞について抗メチル化シトシン抗体を用いた免疫蛍光染色を行ったところ、無添加対照区やコリン添加区に比べ、ベタイン添加区における蛍光強度が強い傾向が見られた。しかし、免疫蛍光染色によるゲノム DNA のメチル化の検出においては定量性に限界があったため、(3) の実験ではサテライト DNA 領域の CpG 配列のメチル化を指標に検出することにした。

(3) 体外受精によって得られたウシ 1 細胞期胚の体外培養系にホモシステインを添加したところ、無添加対照区に比べ、受精後 7 日目の胚盤胞発生率が有意に低下した。8 日目の胚盤胞発生率には差が無かったことから、ホモシステインはウシ胚の着床前発生を遅らせることが示された。さらに、ホモシステインの添加によって、得られた胚盤胞のサテライト I 領域の CpG 配列のメチル化が有意に低下した。これらの結果から、DMD の代謝産物がウシ胚の着床前発生の発生速度に影響をおよぼすこと、さらにその影響は、DNA のメチル化という代表的なエピジェネティクス機構への作用を伴うことが明らかにされた。

(4) 体外受精によって得られた受精後 9-10 日目の孵化胚盤胞を、29mM グルコース、10%(v/v)ウシ胎仔血清、100 μ M β -メルカプトエタノールを含む合成卵管培地中で受精後 18 日目まで体外培養したところ、受精後 12 日目までは、高率に胚の拡張を維持することが可能であった。また、RT-PCR の結果、受精後 8 日目には約半数の胚がビメンチン mRNA を発現していなかったのに対し、9 日目には全ての胚が発現するようになり、12 日目にかけてその発現量は増加した。免疫蛍光染色の結果から、8 日目には検出されなかった

ビメンチンタンパク質が、9 日目から 12 日目にかけて発達したフィラメント状に観察された。この結果から、本培養系において、少なくとも内部細胞塊の胚盤葉上層様の細胞への分化を誘起しうることが示唆された。しかし、受精後 14 日目までに全ての胚が退縮するか、あるいは胞状構造を維持できなかった。そこで、培地に X (論文準備中のため公表を控える) を添加したところ、受精後 18 日目まで胞状構造を維持したまま拡張させることが可能であった。しかしながら、体内での正常発育において見られる胚の著しい伸長は起こらず、内部細胞塊の秩序だった分化も誘起しえなかった。より一層の培養系の改善が必要と考えられた。

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 3 件)

① Shuntaro Ikeda, Miki Sugimoto, Shin-ichi Kume.

Dynamic expression of vimentin in bovine blastocysts in extended in vitro culture. *Reproduction in Domestic Animals*.

印刷中. 査読有.

② Shuntaro Ikeda, Miki Sugimoto, Shin-ichi Kume.

Expression of enzymes related to homocysteine metabolism and homocysteine sensitivity in bovine preimplantation embryos. *Reproduction, Fertility and Development*.

21 巻. 145-145 頁. 2009 年. 査読有

③ Shuntaro Ikeda, Miki Sugimoto, Shin-ichi Kume.

Spatial and temporal formation of vimentin filament in bovine post-hatching blastocyst in vitro. *Biology of Reproduction*.

Special Issue. 95-95 頁. 2008 年. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① Shuntaro Ikeda, Miki Sugimoto, Shin-ichi Kume.

Expression of enzymes related to homocysteine metabolism and homocysteine sensitivity in bovine preimplantation embryos. *35th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society*.

2009 年 1 月 6 日. 米国カリフォルニア州サンディエゴ.

② Shuntaro Ikeda, Miki Sugimoto, Shin-ichi Kume.

Spatial and temporal formation of vimentin

filament in bovine post-hatching
blastocyst in vitro.

41st Annual Meeting of the Society for the
Study of Reproduction.

2008年5月28日. 米国ハワイ州コナ.

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) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

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 SHIN-ICHI)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：90355454