

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780251

研究課題名（和文）

ウシ初期胚のエピジェネティクスにおけるメチル基経路の役割

研究課題名（英文）

The roles of methylation pathway in 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（和文）：

ウシの卵母細胞および胚盤胞期までの着床前胚にメチル基経路の酵素群が発現していることを明らかにした。ウシ着床前胚の発生において、メチル基経路内の代謝産物のうち、ホモシステインはグローバルなDNAのメチル化に影響をおよぼすこと、メチオニン、そのS-アデノシルメチオニンへの代謝を通じて桑実胚から胚盤胞への移行に関与していることを明らかにした。ウシ着床前胚の発生におけるメチル基経路の存在とその重要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrated that (1) bovine oocytes and preimplantation embryos express methylation pathway enzymes; (2) among the metabolites in methylation pathway, homocysteine affects the level of DNA methylation, and methionine, thorough its conversion to S-adenosylmethionine, is involved in morula-to-blastocyst transition during bovine preimplantation development. The existence and importance of methylation pathway in bovine preimplantation development were suggested.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：ウシ・卵母細胞・着床前胚・栄養と繁殖・メチル基経路・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家畜の繁殖成績の低下が世界的に問題となっており、その一つにウシの人工授精受胎率の低下がある。受胎率の低下は、分娩間隔の延長による乳肉生産コストの上昇、子牛の生産頭数の減少による後継牛の不足等の直接的な

経済的損失をもたらすだけでなく、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。

受胎のために必要な、正常な胚発生をつかさどる遺伝子発現の制御には、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ック

スが深く関与している。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。受精直後の哺乳動物初期胚における DNA のメチル化の変化として、グローバルには精子と卵子ゲノムにおける高メチル化とその受精後の脱メチル化、そして胚盤胞期以後の再メチル化があり、局所的にはインプリント遺伝子のメチル化状態の保護と各種非インプリント遺伝子の発現時期特異的なメチル化の変化がある（最近ではインプリント遺伝子においても受精後のメチル化の変化が現れるとする知見が報告されている）。

DNA のメチル化反応の主体は DNA メチル基転移酵素であるが、それがメチル基源として用いる S-アデノシルメチオニンは、アミノ酸の一種であるメチオニンの代謝によって作られ、その生成経路には葉酸・ビタミン B6・B12・ベタイン等の栄養因子の代謝すなわちメチル基経路 (Methylation Pathway) が関与する (図 1)。哺乳動物の摂取する栄養素の中には、メチル基経路に関わるもの (メチル基栄養) が種々含まれている。これらの栄養素は動物による摂取と代謝そして最終的には 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。しかし、着床前胚におけるメチル基栄養代謝からのエピジェネティクスへのアプローチは未開拓の領域である。受胎の成否の重要な分岐点である着床前胚発生におけるエピジェネティクスと飼料性物質によるその制御という新しい視点から、栄養因子による家畜の受胎率改善の新たな方策を探っていきたい。

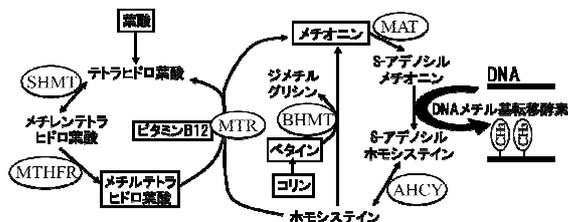


図 1. メチル基経路に関わる酵素・栄養素と DNA のメチル化. 四角で囲ったものは食餌から摂取される栄養素を、また楕円で囲ったものはそれぞれの代謝反応をつかさどる酵素を示す。

## 2. 研究の目的

本研究では、まずウシ卵母細胞および着床前胚の各発生段階におけるメチル基経路酵素群の発現動態を明らかにすることを目的とした。また、メチル基経路を構成する栄養素の過不足やその代謝の阻害が胚の発生・分化とエピジェネティクスにおよぼす影響を検討することによって、着床前胚発生におけるメチル基経路の役割を明らかにすること

を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ウシの卵母細胞および着床前胚におけるメチル基経路酵素群の発現動態を調べた。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 1 細胞期、2 細胞期、8 細胞期、桑実胚期、胚盤胞期の着床前胚を得た。卵母細胞および各発生段階の着床前胚より RNA を抽出し、RT-PCR により MAT1A、MAT2A、MAT2B、AHCY、MTR、BHMT、SHMT1、SHMT2、MTHFR の mRNA 発現を調べた。またげっ歯類では肝臓特異的とされてきた MAT1A の発現に着目し、上記卵母細胞および着床前胚における MAT1A タンパク質 (MAT I / III) の発現を免疫蛍光染色によって調べた。

(2) メチル基経路の代謝産物の一つにホモシステインがある。ホモシステインは、葉酸を含むビタミン B 群摂取の不足や、メチル基経路を構成する酵素の遺伝子欠損や多型などにより血中レベルが上昇し (高ホモシステイン血症)、その上昇は動脈硬化や神経変性疾患のリスクファクターとされている。我々は、ホモシステインを添加した培地でウシ着床前胚を培養した場合、その胚盤胞発生が阻害されることを見出している。そこで今回は、ホモシステインが、グローバルな DNA のメチル化レベルに与える影響を調べた。

(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  $\mu$ M) を添加した合成卵管培地中で培養した (無添加培地を対照とした)。受精後 6 日目の桑実胚を回収し、抗 5-メチルシトシン抗体を用いた免疫蛍光染色を行い、その染色輝度を比較した。

(3) メチル基経路におけるメチオニンの役割を明らかにするために、メチオニンの代謝拮抗物質 (エチオニン) がウシ着床前胚の発生に及ぼす影響を検討した。(1) と同様の方法で得られたウシ 5-8 細胞期胚を無添加対照区、エチオニン (10 mM) 添加区、エチオニンおよび S-アデノシルメチオニン (1  $\mu$ M) 添加区で培養し、受精後 6 日目の収縮桑実胚および 8 日目における胚盤胞発生率を評価した。さらに収縮桑実胚を別に回収し、胚盤胞の細胞系列分化に関わる遺伝子 OCT4、TEAD4 の mRNA 発現を半定量的 RT-PCR により検討した。

## 4. 研究成果

(1) RT-PCR の結果、検討した全てのメチル基経路酵素群の mRNA が、卵母細胞および着床前胚において検出された。MAT1A と BHMT を除く酵素の mRNA は全ての発生段階で検出さ

れた。MAT1A mRNA は 8 細胞期から胚盤胞期には検出されず、また BHMT mRNA は 8 細胞期でのみ検出されなかった (図 2)。免疫蛍光染色により MAT1A タンパク質 (MAT I / III) の発現を調べたところ、8 細胞期までに強い発現が見られ、その後減少した。この結果から、ウシ卵母細胞および着床前胚は、メチル基経路を構成する主要な酵素を発現していることが明らかとなった。この報告は、2010 年に三つの研究グループから報告された、哺乳動物の卵母細胞と着床前胚におけるメチル基経路酵素群の発現に関する報告の一つとなった (着床前胚における報告としては初)。

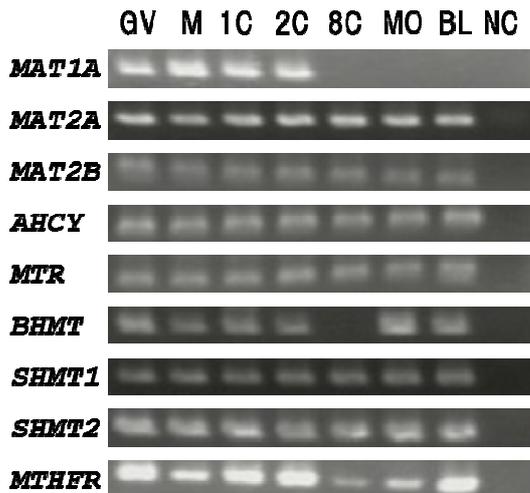


図 2. ウシ卵母細胞および着床前胚におけるメチル基経路酵素群の mRNA 発現。左から未成熟卵母細胞 (GV)、成熟卵母細胞 (M)、1 細胞期 (1C)、2 細胞期 (2C)、8 細胞期 (8C)、桑実胚期 (MO)、胚盤胞期 (BL)、未成熟卵母細胞で逆転写無し (NC)。

(2) ホモシステイン添加あるいは無添加の条件で体外培養した桑実胚を回収し、5-メチルシトシン抗体を用いた免疫蛍光染色により、DNA のメチル化の程度を比較した。その結果、ホモシステイン添加区では無添加対照区に比べ、有意なメチル化の上昇が見られた。この結果より、ウシ着床前胚の発生において、ホモシステイン濃度の上昇が、DNA のメチル化という代表的なエピジェネティクス機構に対し影響をおよぼすことが明らかにされた。

(3) エチオニン添加あるいは無添加の条件で、ウシ 5-8 細胞期胚を培養したところ、収縮桑実胚への発生率は無添加対照区 46%、エチオニン添加区 32%であり、有意な差は見られなかった。しかし胚盤胞発生率は無添加対照区 38%に対しエチオニン添加区 1.5%であり、エチオニンによる著しい発生阻害が見られた。S-アデノシルメチオニンをエチオニンと

ともに加えた区では、低率 (12%) ながら有意な胚盤胞発生回復が見られた。以上の結果から、メチオニン代謝はウシ着床前胚の発生、特に桑実胚から胚盤胞への移行において重要な役割を担っており、その役割は少なくとも部分的には S-アデノシルメチオニンを介したものであることが示唆された。エチオニン処理により、桑実胚から胚盤胞への発生が特異的に阻害されていることが示されたため、胚盤胞における細胞系列分化に関与している遺伝子として OCT4 と TEAD4 に着目し、発生率に差が出る前の収縮桑実胚期における両遺伝子の mRNA 発現量を比較した。その結果、エチオニン処理区では、TEAD4 遺伝子の発現が、無添加対照区に比べて有意に増加した。エチオニン処理によって TEAD4 の発現上昇が見られたことから、胚盤胞の細胞系列分化に関与する遺伝子の発現に異常が生じていることが示唆された。先に述べたように、S-アデノシルメチオニンは DNA のメチル化に利用されるメチル基源であることから、メチオニンの代謝阻害が、エピジェネティクス機構を介してそれらの遺伝子発現に影響をおよぼしている可能性が考えられるが、その証明には更なる研究が必要である。

## 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 1 件)

① Ikeda S, Namekawa T, Sugimoto M, Kume S. Expression of methylation pathway enzymes in bovine oocytes and preimplantation embryos. *J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol.* 313 巻. 129-136 頁. 2010 年. 査読有.

[学会発表] (計 3 件)

① 小山裕之・池田俊太郎・杉本実紀・久米新一.

マウス初期胚に対する葉酸の暑熱ストレス緩解効果.

第 60 回関西畜産学会大会.

2010 年 9 月 15 日. 京都市.

② 池田俊太郎・杉本実紀・久米新一.

マウスとウシの卵母細胞および胚盤胞における Mat1a 遺伝子のメチル化解析.

第 103 回日本繁殖生物学会大会.

2010 年 9 月 2 日. 青森県十和田市.

③ 池田俊太郎・行川貴浩・杉本実紀・久米新一.

ウシ孵化前胚におけるグルコルチコイド受容体の発現.

日本畜産学会第 112 回大会.

2010 年 3 月 29 日. 東京都.

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 SHINICHI)

京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：90355454