

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23380164

研究課題名(和文)母性因子による胚性ゲノム活性化のエピジェネティクス解析

研究課題名(英文)Epigenetic analysis of zygotic gene activation by maternal factor

研究代表者

南 直治郎 (Minami, Naojiro)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30212236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、初期胚の遺伝子発現を制御するメカニズムについてエピジェネティクスの観点から解析を行った。遺伝子発現を正に制御するヒストンのエピジェネティック修飾であるヒストンH3の4番目のリジン残基(H3K4)のメチル化に着目し、H3K4のメチル化酵素であるSmyd3とこのメチル化を認識するクロマチンリモデリング因子であるChd1について解析を行った。胚性ゲノムの活性化前の受精卵にSmyd3あるいはChd1を認識するsiRNAを導入し、これら2つのタンパク質の機能を抑制すると、着床以降の発生が抑制され、受精卵移植による産仔数も大きく低下し、Pou5f1、Nanog、Cdx2の発現が著しく減少した。

研究成果の概要(英文)：Smyd3 is a histone H3 lysine 4 (H3K4) di- and tri-methyltransferase that forms a transcriptional complex with RNA polymerase II and CHD1, which recognizes trimethylated histone H3 lysine 4, is a protein belonging to the family of ATPase-dependent chromatin remodeling factors. In the present study, we investigated the effects of RNA interference (RNAi)-mediated repression on the development of mouse embryos. In Smyd3-, and Chd1-knockdown embryos, the percentage of inner cell mass (ICM)-derived colony formation and trophectoderm (TE)-derived cell attachment was significantly decreased, resulting in a reduction in the number of viable offspring. Furthermore, the expression of Pou5f1, Nanog, and Cdx2, was dramatically decreased in both Smyd3- and Chd1-knockdown embryos. Moreover, in Chd1-knockdown embryos, expression of Hmgpi, which regulate Pou5f1, Nanog, and Cdx2, was also significantly suppressed at zygotic gene activation (ZGA).

研究分野：生殖生物学

キーワード：マウス初期胚 エピジェネティクス 胚性ゲノムの活性化 遺伝子発現 母性因子 siRNA 多能性 分化

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞である精子と卵子は究極に分化した細胞であり、これらの生殖細胞は受精の過程を経るまで、遺伝子発現を完全に停止している。受精によって雌雄2つの生殖細胞から全能性を持つ1つの受精卵が作られる。遺伝子発現を完全に停止していた精子と卵子のDNAは、卵母細胞内のさまざまな因子によって再プログラム化され、新たな遺伝子発現を開始する。このことは卵母細胞あるいは受精直後の胚が、遺伝子発現の制御機構を解明する上で格好の材料であることを示している。卵母細胞内の因子によって誘導されるこの再プログラムにはプロモーター領域のDNAのメチル化やヒストンの修飾、それに伴うクロマチンの高次構造などのエピジェネティックな変化が深く関与している(Shiら、2009)。一般に、ヒストンのアセチル化やH3K4(ヒストンH3の4番目のアミノ酸であるリジン)、H3K36およびH3K79のメチル化は遺伝子発現の活性化を誘導し、DNAのメチル化やヒストンH3K9およびH3K27のメチル化は遺伝子発現を抑制すると考えられている。一部例外も報告されているが、これらのエピジェネティックな修飾が遺伝子発現を制御していることは紛れもない事実である。胚性ゲノムの活性化時期のエピジェネティックな変化に関する報告は少なく、この時期のエピジェネティックな変化に関する情報を蓄積することはゲノムの活性化の分子機構を探る上で必要不可欠である。卵母細胞内に存在する母性因子のうち、受精後に機能する遺伝子を特に母性効果遺伝子と呼んでおり、これまでに十数種類が報告されている(Minamiら、2006、2007)。これらの遺伝子はノックアウトマウスを用いた解析により、初期発生に必要不可欠であることは示されているが、研究対象がほ乳動物の受精卵という量的な理由から、分子レベルでの詳細な機能についてはほとんど解析されていない。しかしながら、これらの遺伝子の中にはクロマチンのリモデリングに関わるものも存在し(Bultmanら、2006)、母性因子が遺伝子の転写に大きく関わっていることが明らかになっている(Miyamotoら、2009)。また、申請者らが同定した卵母細胞特異的遺伝子Oog1が胚性ゲノムの活性化時期に核に移行することから(Minamiら、2003)、Oog1を含む母性因子が胚性ゲノムの活性化に重要な役割を持っていることが予測される(Minamiら、2007)。胚性ゲノムの活性化はクローン胚の発生異常とも密接に関連しており(Suzukiら、2006、

2007)、この活性化の分子メカニズムを解明することは初期胚の発生の分子基盤を理解するだけでなく、将来的な発生工学を利用した応用研究にも大きく貢献すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ほ乳動物において受精後に初めて起こる遺伝子発現(胚性ゲノムの活性化:ZGA)のメカニズムをエピジェネティクス(DNAやクロマチンの後天的な修飾によって遺伝子発現が制御される現象を扱う学問領域)の視点から解明する目的で、クロマチンを構成するヒストンに注目し、ヒストンの修飾とクロマチンリモデリング因子が受精卵の遺伝子発現をどのように制御しているかについて解明する。受精後初めて起こる遺伝子発現は、受精前の卵母細胞に蓄えられた因子によって制御されている。申請者らが同定した卵母細胞特異的遺伝子を含め、卵母細胞に蓄えられているヒストン修飾酵素やクロマチンリモデリング因子の機能を解析することによって、胚性ゲノム活性化の分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、遺伝子発現を正に制御することが明らかになっているヒストンH3の4番目のリジン残基(H3K4)のメチル化に注目し、このリジン残基をメチル化する酵素であるSmyd3とH3K4のトリメチル化(H3K4me3)を認識して遺伝子発現を誘導するクロマチンリモデリング因子であるChd1の機能の解析を行った。胚性ゲノムの活性化前の受精卵にSmyd3あるいはChd1の機能を抑制するsiRNAを細胞質に顕微注入し、胚性ゲノムの活性化時にそれぞれのタンパク質が機能しないようにし、その後の発生への影響について形態学的、生化学的あるいは分子生物学的に解析を行った。両タンパク質の抑制がうまく行っていることを定量的PCRおよび免疫染色で確認した。形態的観察ではin vitroにおける胚盤胞期までの発生能と、着床後の発生能を検討するためにin vitroにおけるoutgrowth実験を行って、発生能への影響を検討した。また、多能性の維持や分化に関わる遺伝子の発現やタンパク質の発現を定量PCRと免疫蛍光染色法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1)Smyd3 の抑制は outgrowth 実験によるコロニー形成を阻害する

受精後 3 時間の受精卵に、Smyd3 を阻害する siRNA を顕微注入し、その後の発生を観察したところ、受精後 5.5 日までの発生には形態的な異常は認められなかった。しかし

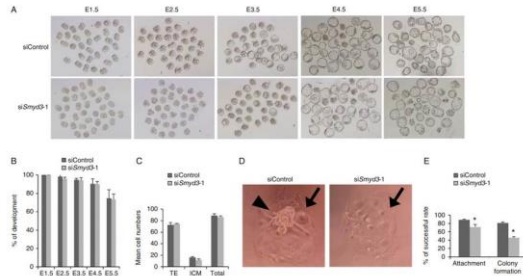


図1 Smyd3抑制胚の発生能

ながら、着床後の発生を in vitro で再現させる outgrowth 実験を行ったところ、Smyd3 を抑制された受精卵では、ICM 由来のコロニー形成率が対照区と比較して有意に低下した (45.8% vs 81.1%, 図1)。また、Smyd3 を抑制した 2 細胞期の受精卵を仮親に受精卵移植した結果、産子率は 20.0% となり、対照区の 51.7% と比較して有意に低下した。

(2)Chd1 の抑制は outgrowth 実験によるコロニー形成を阻害する

上記同様に、受精後 3 時間の受精卵に、Chd1 を阻害する siRNA を顕微注入し、その後の発生を観察したところ、受精後 5.5 日までの発生には形態的な異常は認められなかった。しかしながら、着床後の発生を in vitro で再現させる outgrowth 実験を行ったところ、Chd1 を抑制された受精卵では、ICM 由来のコロニー形成率が対照区と比較して有意に低下した (29.0% vs 81.9%, 図2)。また、Chd1 を抑制した 2 細胞期の受精卵を仮親に受精卵移植した結果、産子率は 13.3% となり、対照区の 48.9% と比較して有意に低下した。

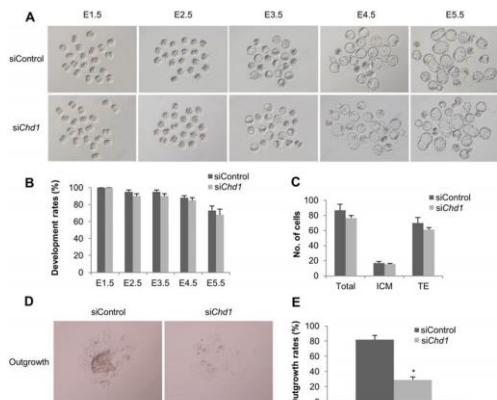


図2 Chd1抑制胚の発生能

(3)Smyd3 の抑制は多能性維持 (Oct4, Nanog, Sox2)、原始内胚葉への分化に関わる遺伝子 (Gata6) と胎盤への分化に関わる遺伝子 (Cdx2, Eomes) の発現を抑制する

上記のように着床後の発生に異常が認められたことから、受精後 4.5 日の胚盤胞期胚における多能性維持関連遺伝子 (Oct4, Nanog, Sox2)、原始内胚葉マーカー遺伝子 (Gata6) および胎盤への分化に関わる遺伝子 (Cdx2, Eomes) についてその発現量を定量 PCR によって、またそれぞれのタンパク質については免疫染色によって解析した結果、すべての遺伝子について発現量が有意に低下しており、タンパク質についてもすべて減少していた (図3)。

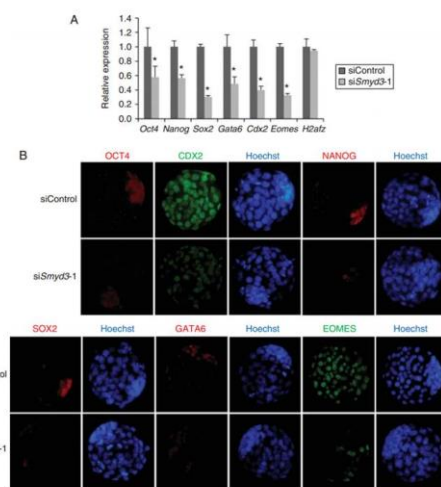


図3 Smyd3抑制胚における遺伝子発現

(4)Chd1 の抑制は多能性維持に関わる遺伝子 (Oct4, Nanog) と胎盤への分化に関わる遺伝子 (Cdx2) の発現を抑制する

Chd1 抑制胚においても着床後の発生に異常が認められたことから、受精後 4.5 日の胚

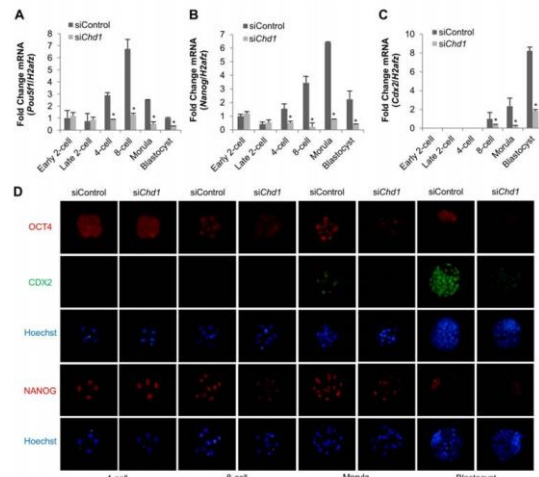


図4 Chd1抑制胚における遺伝子発現

盤胞期胚における多能性維持関連遺伝子 (Oct4, Nanog) および胎盤への分化に関わる遺伝子 (Cdx2) についてその発現量を定量 PCR によって、またそれぞれのタンパク質については免疫染色によって解析した結果、Smyd3 抑制胚同様にすべての遺伝子について発現量が有意に低下しており、タンパク質についてもすべて減少していた (図 4)。

(5) Chd1 抑制による発生異常は Hmgpi のレスキューによって解除される

初期胚において Oct4 や Nanog、Cdx2 の遺伝子発現が初期胚特異的転写因子である Hmgpi によって制御されていることが報告されていることから (Yamada ら、2010)、Chd1 抑制胚に Hmgpi の mRNA を顕微注入し、Hmgpi のレスキューを行ったところ、多能性関連遺伝子と胎盤への分化に関わる遺伝子すべての発現量が回復し、免疫染色によるタンパク質の解析においても回復が認められた。さらには、outgrowth 実験によるコロニー形成率、受精卵移植による産子率も対照区と変わりなく回復した (71.0% vs 76.1% and 48.9% vs 44.4%, 図 5)。

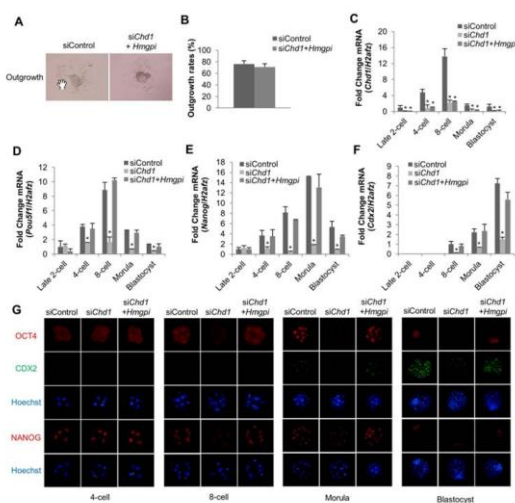


図5 Chd1抑制胚におけるHmgpiレスキュー

(6) まとめ

以上のことから、受精直後のヒストン H3K4 のメチル化に関わる因子 Smyd3 や H3K4me3 を認識するクロマチンリモデリング因子 Chd1 の機能が初期胚の発生、特に着床期の胚発生に重要であることが示された。また、クロマチンリモデリング因子の Chd1 は胚性ゲノムの活性化時に発現する Hmgpi を制御しており、さらに Hmgpi は MGA (mid-preimplantation gene activation) と

呼ばれる ZGA に続く大規模な遺伝子発現時に発現する多能性関連遺伝子 (Oct4, Nanog) や胎盤への分化に関わる遺伝子 (Cdx2) の発現を制御していることから、受精直後の H3K4 のメチル化酵素やクロマチンリモデリング因子が ZGA や MGA における遺伝子発現のネットワークを介して、初期胚の着床後の発生を制御していることが明らかとなった。

<引用文献>

Yamada, M., Hamatani, T., Akutsu, H., Chikazawa, N., Kuji, N., Yoshimura, Y. and Umezawa, A. (2010). Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic 538 development. *Hum Mol Genet* **19**, 480-493.

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 11 件)

- ① Suzuki S, Nozawa Y, Tsukamoto S, Kaneko T, Manabe I, Imai S, Minami N. CHD1 acts via the *Hmgpi* pathway to regulate mouse early embryogenesis. *Development*, (in press), doi:
- ② Suzuki S, Nozawa Y, Tsukamoto S, Kaneko T, Imai S, Minami N. Histone methyltransferase *Smyd3* regulates early embryonic lineage commitment in the mouse. *Reproduction*, (in press) doi: 10.1530/REP-15-0019
- ③ Suzuki S, Tsukiyama T, Kaneko T, Imai S, Minami N. hyperactive piggyBac transposon system is an easy-to-implement method for introducing foreign genes into mouse preimplantation embryos. *J. Reprod Dev*, (in press) doi: 10.1262/jrd.2014-157.
- ④ Tsukamoto S, Hara T, Yamamoto A, Kito S, Minami N, Kubota T, Sato K, Kokubo T Fluorescence-based visualization of autophagic activity predicts mouse embryo viability *Scientific Reports*, 2014 Mar 13; 4: 4533. doi: 10.1038/srep04533.

- ⑤ Hatanaka Y, Shimizu N, Nishikawa S, Tokoro M, Shin SW, Nishihara T, Amano T, Anzai M, Kato H, Mitani T, Hosoi Y, Kishigami S, Matsumoto K. GSE is a maternal factor involved in active DNA demethylation in zygotes. PLoS One. 2013 8(4):e60205. doi: 10.1371/journal.pone.0060205.
- ⑥ Suzuki S, Nozawa Y, Tsukamoto S, Kaneko T, Imai H, Minami N. ING3 is essential for asymmetric cell division during mouse oocyte maturation. PLoS One, 2013 Sep 16; 8(9): e74749. doi:10.1371/journal.pone.0074749.
- ⑦ Ishida M, Okazaki E, Tsukamoto S, Kimura K, Aizawa A, Kito S, Imai H and Minami N. The promoter of the oocyte-specific gene, *Oog1*, functions in both male and female meiotic germ cells in transgenic mice. PLoS One, 2013 Jul 22; 8(7):e68686. doi: 10.1371/journal.pone.0068686.
- ⑧ Tsukamoto S, Hara T, Yamamoto A, Ohta Y, Wada A, Ishida Y, Kito S, Nishikawa T, Minami N, Sato K, Kokubo T. Functional analysis of lysosomes during mouse preimplantation embryo development. J Reprod Dev, 2013 Feb 20; 59:33-39.
- ⑨ Ishida M, Okazaki E, Tsukamoto S, Kimura K, Aizawa A, Kito S, Imai H and Minami N. The promoter of the oocyte-specific gene, *Oog1*, functions in both male and female meiotic germ cells in transgenic mice. PLoS One, 2013 Jul 22; 8(7):e68686. doi: 10.1371/journal.pone.0068686.
- ⑩ Tsukamoto S, Hara T, Yamamoto A, Ohta Y, Wada A, Ishida Y, Kito S, Nishikawa T, Minami N, Sato K, Kokubo T. Functional analysis of lysosomes during mouse preimplantation embryo development. J Reprod Dev, 2013 Feb 20; 59:33-39.
- ⑪ Kawamura M, Akiyama T, Tsukamoto S, Suzuki MG, Aoki F*. The Expression and Nuclear Deposition of Histone H3.1 in Murine Oocytes and Preimplantation Embryos J Reprod Dev. 2012 58(5):557-562
- 〔学会発表〕(計 16 件)
- ① 鈴木 伸之介、野澤 佑介、金子 武人、今井 裕、南 直治郎
クロマチンリモデリング因子 *Chd1* は胚性ゲノムの活性化を通じて初期胚の最初の分化に関与する
第 37 回日本分子生物学会大会、2014/ 11/ 25-27、横浜
- ② Miyamoto Y, Kawahara Y, Suzuki S, Ishida M, Tsukamoto S, Imai H, Minami N. The role of *Oog1* in female meiotic germ cells: Activation of oocyte-specific genes and suppression of testis-associated genes. The 10th Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society 2014 年 11 月 2-5 日 (Bankok, Thailand)
- ③ Suzuki, S, Nozawa Y, Tsukamoto S, Kaneko T, Imai H, Minami N. CHD1 is the zygotic determinant of *Oct4* and *Cdx2* expression via the *Hmgpi* pathway during preimplantation development. 2014 World Congress of Reproductive Biology 2014 年 9 月 2~4 日 (Edinburgh, UK)
- ④ 鈴木 伸之介、野澤 佑介、金子 武人、今井 裕、南 直治郎
クロマチンリモデリング因子 *Chd1* は胚性ゲノムの活性化を通じて初期胚の分化決定に関与する
第 107 回日本繁殖生物学会大会、2014/ 8/ 21-23、帯広
- ⑤ 宮本 裕也、川原 悠、鈴木 伸之介、石田 未弥、塚本 智史、今井 裕、南 直治郎
Oog1 は卵母細胞において卵母細胞特異的遺伝子の活性化と精子形成関連遺伝子の抑制に関与する
第 107 回日本繁殖生物学会大会、2014/ 8/20-24、帯広
- ⑥ 塚本 智史、原 太一、山本 篤、鬼頭 靖司、南 直治郎、久保田 俊郎、佐藤 健、小久保 年章
マウス受精卵のオートファジー活性と胚発生能との関係に関する研究
第 107 回日本繁殖生物学会大会、2014/ 8/20-24、帯広

- ⑦ Nozawa Y, Suzuki S, Tsukamoto S, Kaneko T, Imai H, Minami N.
Functional analysis of histone methyltransferase *Smyd3* in the development of mouse preimplantation embryos.
The 47th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction 2014 年 8 月 19 ~23 日
(Grand Rapid, Michigan, USA)
- ⑧ Miyamoto Y, Kawahara Y, Suzuki S, Ishida M, Tsukamoto S, Imai H, Minami N.
Oog1 functions during meiosis of female germ cells through suppression of testis-associated genes and activation of oocyte-specific genes
The 47th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction 2014 年 8 月 19 ~23 日
(Grand Rapid, Michigan, USA)
- ⑨ Tsukamoto S, Hara T, Yamamoto A, Kito S, Minami N, Sato K, Kokubo T
Monitoring of autophagic activity in the developing mouse preimplantation embryo.
The 5th European Molecular Biology Organization Meeting 2013 年 9 月 21~24 日
(Amsterdam, Nederland)
- ⑩ 鈴木 伸之介、野澤 佑介、金子 武人、今井 裕、南 直治郎
マウス初期胚におけるクロマチン再構成タンパク質 Chd1 に関する研究
第 106 回日本繁殖生物学会大会、2013/ 9/11-14、東京
- ⑪ 野澤 佑介、鈴木 伸之介、塚本 智史、金子 武人、今井 裕、南 直治郎
マウス初期胚におけるヒストンメチル化酵素 *Smyd3* の役割について
第 106 回日本繁殖生物学会大会、2013/ 9/11-14、東京
- ⑫ Suzuki S, Nozawa Y, Tsukamoto S, Kaneko T, Imai H, Minami N.
Ing3 has an important role during oocyte maturation in the mouse.
The 46th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction 2013 年 7 月 22 ~26 日
(Montreal, Canada)
- ⑬ 鈴木 伸之介、野澤 佑介、金子 武人、今井 裕、南 直治郎
マウス卵母細胞の成熟過程における *Ing3* の役割
第 54 回日本哺乳動物卵子学会、2013/ 5/ 25-26、東京
- ⑭ 鈴木 伸之介、野澤 佑介、塚本 智史、金子 武人、今井 裕、南 直治郎
マウス初期胚におけるクロマチン再構成タンパク質 Chd1 の役割
第 35 回日本分子生物学会年会、2012/ 12/ 11-14、福岡
- ⑮ Minami N
Meiosis-specific gene expression by the promoter of an oocyte-specific gene, *Oog1*
2012 CABX Workshop and International Symposium 2012 年 12 月 2-4 日
(Jeju, Korea)
- ⑯ Minami N
Regulation of meiosis-specific gene expression by the promoter of an oocyte-specific gene, *Oog1*.
The 9th Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society 2012 年 10 月 23-28 日
(Manila, Philippines)
- [図書] (計 1 件)
- ① 南 直治郎：卵母細胞特異的に発現する *Oog1* について
卵子学 (森 嵩英 総編集)
京都大学出版会 p803-805, 2011.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
南 直治郎 (Minami Naojiro)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：30212236
- (2) 研究分担者
松本 和也 (Matsumoto, Kazuya)
近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号：20298938
- 塚本 智史 (Tsukamoto Satoshi)
放射線医学総合研究所・主任研究員
研究者番号：80510693