

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H05756

研究課題名（和文）全能性プログラムにおけるエピゲノム再編成の理解とその人為的制御

研究課題名（英文）Epigenetic reprogramming in totipotency acquisition

研究代表者

石内 崇士（Ishichi, Takashi）

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：80612100

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 70,600,000円

研究成果の概要（和文）：精子と卵子の融合により形成される受精卵は全能性を有する。受精卵において生じる胚性ゲノム活性化（ZGA）は受精卵特有の転写プログラムであり、その開始には大幅なエピゲノムの書き換え、すなわち「エピゲノム再プログラム化」が重要であることが強く示唆されており、本研究では、受精卵のエピゲノム制御機構とZGAの詳細な理解を目指した。そして、(1)ヒストンバリエントH3.3は全能期において通常見られない非典型的な分布を示すこと、(2)ゲノムワイドなヌクレオソームポジショニングは受精後の胚発生過程で定まっていくこと、(3)ZGA期には動的な転写リプログラミングが生じること等を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚性幹細胞（ES細胞）やiPS細胞の研究により、多能性がいかにして獲得されるのかという点については現在多くのことがわかっていると言える。しかし、多能性の上位にあるとも言える全能性についての理解は乏しい。これは全能性を理解するには実験材料として希少な受精卵を必要とするためである。そこで我々は、極めて微量の細胞に対しても解析可能な技術を開発することでこの問題の解決を試みた。そして、エピゲノム解析手法としてlow-input（li）ChIP-seqやliMNase-seq法を、受精卵の転写プログラムの解析手法としてLET-seq法を開発し、全能性細胞である受精卵の特徴を見出すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：Fertilized eggs formed by the fusion of sperm and egg possesses totipotency. Zygotic genome activation (ZGA) occurring in the fertilized egg represents a unique transcriptional program, strongly suggesting the importance of significant epigenomic rewriting, termed epigenome reprogramming, for its initiation. This study aimed to gain a detailed understanding of the molecular mechanisms controlling epigenetic reprogramming and ZGA in fertilized eggs. We revealed (1) the atypical distribution of the histone variant H3.3 during totipotency, (2) the establishment of genome-wide nucleosome positioning during post-fertilization embryonic development, and (3) the occurrence of dynamic transcriptional reprogramming during the ZGA period.

研究分野：分子生物学

キーワード：全能性 受精卵 ZGA エピゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

多能性 (pluripotency) や多分化能 (multipotency) とは異なり、全能性 (totipotency) は個体を形成するあらゆる細胞への分化を可能とする。そして、この全能性は、精子と卵子の受精により形成される受精卵に特有の性質である。現在までに多能性に関する研究は目覚ましい発展をとげ、体細胞からの多能性細胞の誘導法は十分に確立されたといえる。その一方、全能性の理解ならびにその誘導に関しては未だに大きな成果はあげられていない。この理由の1つには、受精卵に対する解析方法に制限があったことがあげられる。しかしながら、近年、微量サンプルを対象とした解析方法が確立されてきており、全能性を制御する分子機構解明の突破口となりつつある。例えば、微量サンプルに対するトランスクリプトーム解析法の確立によって、受精卵に特有の転写プログラムである胚性遺伝子活性化 (Zygotic Gene Activation, ZGA) のプロフィールが明らかとなってきている。

受精卵が ZGA によって新たに転写プログラムをスタートさせるためには、受精直後に生じるエピゲノムの書き換え、すなわち「エピゲノム再プログラム化」が重要であると考えられている。体細胞核移植の実験からも、エピゲノム再プログラム化は卵子に蓄えられた母性因子に依存する過程であることが強く示唆されたが、その分子機構は全く分かっていなかった。そこで本研究代表者は、ZGA に必要とされるエピゲノム状態を明らかにするために、培養細胞で ZGA に近い遺伝子発現を示すモデルとして 2 細胞様細胞 (2C 様細胞) を利用した。この細胞群は、マウス ES 細胞に 0.5% 程度で存在し、MERV-L レトロトランスポゾンや Zscan4 などの ZGA 特異的な転写物を発現する。本研究代表者は、この細胞を用いて RNAi スクリーニングを行い、ZGA 制御に関わる候補分子として数十の遺伝子を同定した。さらなる解析の結果、クロマチン構築に必須なヒストンシャペロンである CAF-1 複合体がこれらの転写制御に重要であることや、クロマチンの脱凝縮が ZGA 転写物の発現と関連することを見出した。(Genes Dev 2014, Nat Struct Mol Biol 2015, Nat Genet 2018)。以上の培養細胞を用いた成果を基盤とし、本研究では、受精後マウス胚を対象とした研究を展開することとした。

## 2. 研究の目的

精子と卵子の融合により形成される受精卵においては、胚性遺伝子活性化 (Zygotic Gene Activation, ZGA) を境に、受精卵特有の転写プログラムが開始される。また、ZGA の転写パターンは、体細胞核を未受精卵に移植した場合 (クローン胚) においても同様に観察される。これらの事実は、全能期に新たな転写プログラムを開始する際には、大幅なエピゲノムの書き換え、すなわち「エピゲノム再プログラム化」が重要であることを強く示唆しているが、その分子機構は未解明であった。そこで本研究では、*in vivo* の受精後の全能性核を対象とした研究を展開することで、全能性獲得に機能するエピゲノム再プログラム化の包括的理解とその制御を目指した。特に、エピゲノム再プログラム化の候補制御因子として同定したヒストンシャペロンとその制御下にあるヒストンバリエントに注目しつつ受精前後のエピゲノムの経時変化を同定することで全能性細胞のエピゲノム状態の特徴を明らかにし、さらに、新生 RNA 解析法を受精卵に適用することによりエピゲノム状態の確立に機能する分子基盤を解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

- ① Low-input ChIP-seq 法を用いたヒストン H3 バリエントの解析：本項目においては、受精前の卵子および受精後のマウス胚を回収し、Low-input ChIP-seq 法を適用することでヒストン H3.3 のゲノムワイド分布を解析した。
- ② Low-input エピゲノム解析技術を用いた卵子 DNA メチル化パターン確立機構の解析：本項目においては、卵子に特有の DNA メチル化パターン確立におけるエピゲノムクロストークの重要性に焦点を絞った。特に H3K36me2 と H3K36me3 のヒストン修飾の消失が DNA メチル化に与える影響を解析した。
- ③ Low-input MNase-seq 法の開発と応用：本項目においては、これまでに未知である受精卵におけるヌクレオソームポジショニングの解明のために、low-input MNase-seq 法を開発し、これを受精後胚に適用した。
- ④ Sequencing for low-input EU-labeled total RNA (LET-seq) 法の開発による ZGA ダイナミクスの解析：本項目においては、これまでに未解明である ZGA の開始期に焦点を当てた。特に、ZGA の最初期においてどのような転写物が産生されるのか、それがどのように制御されるのかを解析した。

#### 4. 研究成果

- ・ Low-input ChIP-seq 法を用いたヒストン H3 バリエントの解析 :

H3.3 に対する微量 ChIP-seq 法を適用し、ヒストンバリエント H3.3 の受精後発生におけるダイナミクスを明らかにした。これにより受精直後の胚では非典型的な H3.3 の分布様式 (非典型パターン) が存在することを見出した。また、この分布様式は卵子の成長と成熟過程で徐々に形成されていくこと、さらに、受精後の 2 細胞期においては H3.3 の分布が典型パターンへと変化することが明らかとなった (図 1)。また、この典型パターンの構築にはヒストン H3.1/H3.2 の取り込みが重要であった。そこで、培養下の ES 細胞において、H3.1/H3.2 の取り込み経路に対し人為的な操作を加えたところ、ES 細胞の H3.3 のパターンを 1 細胞期胚のパターンに類似させることができた。これらの成果は論文として発表した (Ishiuchi et al., Nat Struct Mol Biol 2021)。本成果は、本領域の目指す全能性のデコーディングとデザインに対して重要な知見となるものであると言える。

全能性期に特異的な H3.3 分布 (非典型 H3.3 分布) を発見

全能性の消失過程における H3.3 分布の変化を発見

(Ishiuchi et al. Nat Struct Mol Biol. 2021)

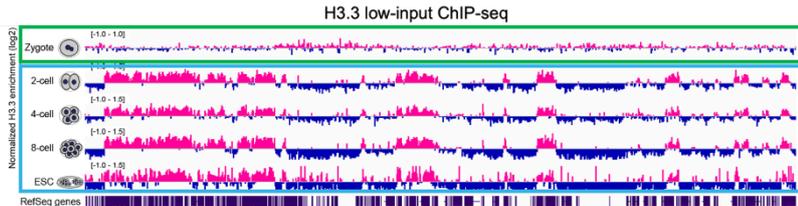


図 1: ヒストンバリエント H3.3 のゲノム上の分布

- ・ Low-input エピゲノム解析技術を用いた卵子 DNA メチル化パターン確立機構の解析 :

H3K36me2 は複数のヒストンメチル化酵素により触媒されるため、触媒酵素のノックアウトにより H3K36me2 を消失させるには技術的困難を伴う。そこで、卵子特異的に H3.3K36M 変異体を発現するマウスを構築し、これによって卵子特異的に H3K36me2 を消失させる実験系を構築した。DNA メチル化パターンを調べたところ、H3K36me2 の消失は中程度に DNA メチル化を受けるゲノム領域の DNA メチル化を減少させたが、高度に DNA メチル化を受ける領域には影響しなかった。その結果を受け、H3K36me3 は高度の DNA メチル化を、H3K36me2 は中程度の DNA メチル化を促進するのではないかという仮説を立て、それを検証することにした。Setd2 ノックアウトを介した H3K36me3 の消失は高度 DNA メチル化を消失させ、さらに驚くべきことに、H3K36me2 と H3K36me3 を同時に消失させた場合にはほぼ全ての DNA メチル化が付加されなくなることを見出した。これらの成果は論文として発表した (Yano et al., Nat Commun 2022)。

- ・ Low-input MNase-seq 法の開発と応用 :

受精後発生におけるクロマチン状態変化を明らかにするために、MNase-seq の微量化に取り組み、100 細胞以下でもクオリティの高いデータの産生が可能な low-input MNase-seq 法の開発に成功した。そして、本技術をマウス初期胚に適用することで、受精後発生過程におけるヌクレオソームポジショニングの動態を明らかにした。そして、受精直後の全能期のヌクレオソームポジショニングは、より発生のすすんだ胚や細胞のそれと比べ大きく異なることを見出した。すなわち、全能期受精卵ではヌクレオソームポジショニングがヘテロな状態にあるものの、その状態は胚発生とともに解消されていった。また、胚発生過程においてヌクレオソームポジショニングを制御する因子として YY1 を同定した。これらの成果は論文として発表した (Sakamoto et al., Genes Dev 2023; microPublication Biol 2024)。

Low-input MNase-seq を開発  
全能性期特異的なヌクレオソーム制御を発見

(Sakamoto et al. Genes Dev. 2023)  
(Sakamoto et al. MicroPubl Biol. 2024)

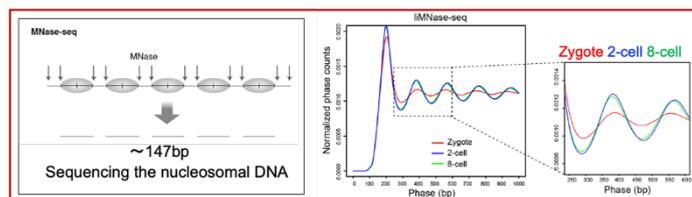


図 2: low-input MNase-seq による受精後胚のヌクレオソームポジション変化の同定

・ Sequencing for low-input EU-labeled total RNA (LET-seq)法の開発による ZGA ダイナミクスの解析：

本研究は、受精卵に特有の全能性の理解のために、受精卵の有するエピゲノム状態およびそれと連動する転写状態を明らかにすることを重視している。このために、受精後発生における転写パターンの変化を正確に捉えるための手法の開発に取り組んできた。受精直後の胚では卵子由来の母性 RNA が大量に存在するために、どのゲノム領域が実際に転写されているのかというものは明確になっていない。そこで、新規に合成された RNA (nascent RNA) のみを網羅的に検出することのできる方法を開発し、100 個の ES 細胞で質の高いデータを得ることができることを見出した。そしてこの手法を受精後胚に適用し、異なる発生段階での転写状態を明らかにした。これにより受精後の転写ダイナミクスが明らかとなっただけでなく、転写因子である **Obox3** が全能性獲得を促進する機能を果たすことを見出した。これらの成果は論文として発表した (Sakamoto et al., Cell Rep 2024)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sakamoto Mizuki, Ito Daiyu, Inoue Rei, Wakayama Sayaka, Kikuchi Yasuyuki, Yang Li, Hayashi Erika, Emura Rina, Shiura Hirotsuke, Kohda Takashi, Namekawa Satoshi H., Ishiuchi Takashi, Wakayama Teruhiko, Ooga Masatoshi	4. 巻 149
2. 論文標題 Paternally inherited H3K27me3 affects chromatin accessibility in mouse embryos produced by round spermatid injection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.200696	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yano Seiichi, Ishiuchi Takashi, Abe Shusaku, Namekawa Satoshi H., Huang Gang, Ogawa Yoshihiro, Sasaki Hiroyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Histone H3K36me2 and H3K36me3 form a chromatin platform essential for DNMT3A-dependent DNA methylation in mouse oocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-32141-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Wakayama Sayaka, Ito Daiyu, Hayashi Erika, Ishiuchi Takashi, Wakayama Teruhiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Healthy cloned offspring derived from freeze-dried somatic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3666
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-31216-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Inatomi Teppei, Matsuda Shigeru, Ishiuchi Takashi, Do Yura, Nakayama Masunari, Abe Shusaku, Kasho Kazutoshi, Wanrooij Sjoerd, Nakada Kazuto, Ichiyonagi Kenji, Sasaki Hiroyuki, Yasukawa Takehiro, Kang Dongchon	4. 巻 1869
2. 論文標題 TFB2M and POLRMT are essential for mammalian mitochondrial DNA replication	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 119167-119167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2021.119167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishiuchi Takashi, Abe Shusaku, Inoue Kimiko, Yeung Wan Kin Au, Miki Yuka, Ogura Atsuo, Sasaki Hiroyuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Reprogramming of the histone H3.3 landscape in the early mouse embryo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 38-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-020-00521-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe Shusaku, Nagatomo Hiroaki, Sasaki Hiroyuki, Ishiuchi Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 A histone H3.3K36M mutation in mice causes an imbalance of histone modifications and defects in chondrocyte differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Epigenetics	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592294.2020.1841873	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 石内崇士, 榊原祐樹, 佐々木裕之	4. 巻 72
2. 論文標題 Low-input ChIP-seqの現状	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 283-286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Mizuki, Abe Shusaku, Miki Yuka, Miyanari Yusuke, Sasaki Hiroyuki, Ishiuchi Takashi	4. 巻 37
2. 論文標題 Dynamic nucleosome remodeling mediated by YY1 underlies early mouse development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 590-604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.350376.122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishiuchi Takashi、Sakamoto Mizuki	4. 巻 6
2. 論文標題 Molecular mechanisms underlying totipotency	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202302225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Mizuki、Ishiuchi Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 YY1-dependent transcriptional regulation manifests at the morula stage	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 MicroPublication Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17912/micropub.biology.001108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Mizuki、Ito Aoi、Wakayama Sayaka、Sasaki Hiroyuki、Wakayama Teruhiko、Ishiuchi Takashi	4. 巻 43
2. 論文標題 Detection of newly synthesized RNA reveals transcriptional reprogramming during ZGA and a role of Obox3 in totipotency acquisition	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 114118-114118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2024.114118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 阪野亜美、伊藤蒼、石内崇士	4. 巻 74
2. 論文標題 初期胚における遺伝子発現・転写制御	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石内崇士
2. 発表標題 全能性を支えるエピゲノム・転写リプログラミング
3. 学会等名 新学術領域 全能性プログラム 公開シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石内崇士
2. 発表標題 受精後発生における転写ダイナミクス
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石内崇士
2. 発表標題 Nucleosome organization in the early mouse embryos
3. 学会等名 The International Symposium "Totipotency and Germ Cell Development" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石内崇士
2. 発表標題 卵子形成機構の包括的理解にむけた取り組み
3. 学会等名 第1回甲信生殖発生研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石内崇士
2. 発表標題 受精後発生を支えるエピゲノム・転写ネットワーク解明にむけた試み
3. 学会等名 バイオDXシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石内崇士
2. 発表標題 受精後発生における転写ダイナミクス
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石内崇士
2. 発表標題 マウス初期発生における転写ダイナミクス
3. 学会等名 幹細胞研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石内崇士
2. 発表標題 哺乳類の初期発生の基盤となるエピゲノム制御機構
3. 学会等名 第14回 日本エピジェネティクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石内崇士
2. 発表標題 エピゲノムと転写からアプローチする全能性デコーディング・デザイン
3. 学会等名 配偶子インテグリティの構築・全能性プログラム 合同公開シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石内崇士
2. 発表標題 Reprogramming of the histone H3.3 landscape in the early mouse embryo
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石内崇士
2. 発表標題 マウス初期発生におけるヒストンバリエントH3.3の動態
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石内崇士
2. 発表標題 初期胚発生におけるヒストンH3バリエントの動態
3. 学会等名 新学術領域研究「全能性プログラム：デコーディングからデザインへ」公開シンポジウム2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石内崇士
2. 発表標題 初期胚発生におけるエピゲノム動態
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石内崇士
2. 発表標題 エピゲノム解析が明らかにする卵子・受精卵の特性
3. 学会等名 世界を先導するリプロダクションコアの形成研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大川 恭行、宮成 悠介 編集	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 270
3. 書名 クロマチン解析実践プロトコール	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>新学術領域 全能性プログラム：デコーディングからデザインへ  <a href="https://totipotency.biken.osaka-u.ac.jp/">https://totipotency.biken.osaka-u.ac.jp/</a></p>
---

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------