

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22125007

研究課題名（和文）受精卵のゲノムアダプテーションの理解

研究課題名（英文）Understanding the "genome adaptation" in fertilized embryo

研究代表者

岡田 由紀（Okada, Yuki）

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：60546430

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 62,400,000円

研究成果の概要（和文）：マウス受精卵を対象とした少数細胞ChIP-seq法の確立と、それを用いた受精直後1細胞期の（エピ）ゲノムリプログラミングの遺伝子レベルでの解明を試みた。前者はChIP後のライブラリ作製の過程で線形増幅に工夫を加えることで、上位15%リードの再現性が向上したが、目標とする方法の開発には至らなかった。一方で内因性ヒストン修飾を消去する変異体を用いて、雄ゲノムリプログラミングと初期胚発生におけるヒストンメチル化の重要性を検討した。その結果、雄ゲノム特異的なH3K4モノメチル化が、1細胞期における雄ゲノムからの転写活性化と初期胚発生に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed i) the establishment of ChIP-seq from very small number of cells, especially mouse preimplantation embryos, and ii) analysis of the (epi)genome reprogramming in fertilized 1-cell embryos using the new ChIP-seq technology.

In the former project, we obtained substantial improvement of reproducibility in top ~15% sequence reads by modifying the step of linear amplification of sequence libraries, although further modifications are still required to reach the goal. In the latter project, instead of using the new ChIP-seq method, we utilized recently identified histone mutants, which erase endogenous histone methylations at the mutated sites, to investigate the importance of histone methylations in preimplantation embryos. As a result, we identified that paternal-specific H3K4 monomethylation by Mll3/4 is required for transcription of paternal genome in late 1-cell embryos, likely through enhancer activation.

研究分野：エピゲノム

キーワード：発生生物学 ゲノム エピゲノム リモデリング クロマチンダイナミクス

## 1. 研究開始当初の背景

受精直後に起きる配偶子由来エピゲノム情報のリプログラミングは、内因性ゲノムストレスの典型的な一例である。特に1細胞胚の前核形成期における雌雄のゲノムは、同じ細胞質内に存在するにも関わらず、独立したクロマチンダイナミクスを呈することから、受精卵では雌雄それぞれのゲノムに独立に対応した環境適応調節機構が存在すると考えられるが、その詳細はいまだ明確でない。哺乳類受精卵の解析はその希少性から生化学的解析が困難であり、免疫染色など定量性に乏しい解析手法が主流である。クロマチン解析に適した実験方法のひとつ ChIP-sequence (seq) 法があるが、これには数千~数万個の細胞を必要とすることから、受精卵の適用は非常に困難な状況であった。

## 2. 研究の目的

上記の問題を解決するためには、マウス受精卵など少数細胞を対象とした ChIP-seq 法の開発が不可欠である。従って本研究課題では、数百個レベルの細胞からの新規 ChIP-seq 手法の開発と、それをを用いた受精卵、特にリプログラミングが顕著に起こるとされる雄ゲノムの ChIP-seq 解析を行い、リプログラミングの実体を遺伝子レベルで明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)「少数細胞 ChIP 法の開発」として、受精卵 500 個程度で可能なプロトコルの確立を目指し、各種条件検討を行った。具体的に検討した項目は以下である。

免疫沈降効率と特異性が高いヒストン修飾抗体の選出と条件検討

に問題が生じた場合、Flag タグを付加したヒストン (mRNA またはリコンビナント蛋白) の過剰発現と Flag ピーズによる免疫沈降の条件検討

意図的な多精子受精誘導による、ChIP 標的ヒストンやゲノム DNA 量の増量

ライブラリ作製時における、「おとり DNA」添加による DNA 線形増幅クオリティの改善

(2)「受精直後のクロマチン状態の解析」として、以下の実験を行った。

リプログラミングは雌雄のゲノム (前核) で大きく異なり、受精直後のリプログラミングは特に雄性前核で顕著に起こることが知られている。このことから受精卵の ChIP 解析には雌雄前核をそれぞれ独立に解析することが望ましいと考え、トランスジェニックマウス等を作製して雌雄前核の標識と分取を試みた。

雄性前核に優先的に取り込まれる性質を有するヒストンバリエントを利用し、雄性前核のヒストンメチル化を人為的に消去して、雄性前核のリプログラミングにおけるヒストンメチル化の重要性を検討した。

## 4. 研究の成果

(1)「少数細胞 ChIP 法の開発」に関して、各項目別の成果は以下のようであった。

抗体の選出：これまでの研究において、ヒストン H3K4 トリメチル化抗体が免疫沈降には感度・特異性・効率ともに優れていることが既知であり、連携研究者の白髭の研究においても、 $10^4$  個の培養細胞を用いた ChIP でその有用性が確認されたことから、H3K4 トリメチル化抗体を使用することに決定した。

Flag タグを利用した免疫沈降： の抗体で条件検討を行っている最中に、他研究グループから関連論文が発表され<sup>1</sup>、(2)の研究課題を考慮すると、H3K4 トリメチル化ではなく、ヒストン H3 バリエントに着目すべきと再考した。しかし H3 バリエントに対する抗体は免疫沈降効率が芳しくないことから、Flag タグを付加した H3 バリエントの mRNA あるいはリコンビナント蛋白質を受精卵に

マイクロインジェクションし、400~600個の受精卵から Flag ビーズを用いた免疫沈降を行った。その結果、沈降産物(DNA)は<1 ngと極めて少量であった。シーケンス用ライブラリ作製を断念し、リアルタイム PCR で候補遺伝子領域におけるヒストンバリエーションの濃縮確認を試みたが、再現性のある結果を得ることができなかった。

多精子受精卵：の結果に基づき、受精卵1個あたりのヒストン蛋白・ゲノム DNA 量を増やす目的で、多精子受精卵(3-5精子/卵)を用意した。これと同様に Flag タグを付加したリコンビナントヒストン蛋白質を発現させ、500個の卵を免疫沈降に供した。理論的にはヒストン蛋白・ゲノム DNA 量は約3倍になると考えられたが、免疫沈降産物(DNA)は依然<1 ngと極めて少量で、リアルタイム PCR でも再現性のある結果を得ることができなかった。

おとり DNA:少数細胞研究における大きな問題のひとつは、ライブラリ作製手順における非線形増幅である、この問題を解決するために、DNA 増幅過程に「おとり DNA」を添加し、酵素-基質濃度比を最適化することで、線形増幅効率の改善を試みた。その結果、培養細胞を用いた検討ではあるが、1 ng 程度の鋳型 DNA から良好な結果が得られ、シーケンスの結果、上位~15%のリードの再現性が向上した。

(2)「受精直後のクロマチン状態の解析」に関して、各項目別の成果は以下であった。

雌雄前核をそれぞれ独立に分離するため、各種 DNA 標識試薬や、雌雄片方のクロマチンを蛍光標識したトランスジェニックマウス等を作製した<sup>2</sup>。分取には、本研究費で購入した MMI 社細胞分取装置 Collector を使用した。その結果、少数細胞(数十個程度)は分取可能であるが、ChIP に十分数の採取は非

効率的であった。

雄性前核に優先的に取り込まれる性質を有するヒストンバリエーションを利用して、雄性前核のヒストンメチル化を人為的に消去して、雄性前核のリプログラミングにおけるヒストンメチル化の重要性を検討した。雌雄前核の転写調節がそれぞれ独立であることは以前から示唆されていたが<sup>3</sup>、本研究の結果、雄性ゲノムの転写には H3K4 モノメチル化/H3K27 アセチル化を介したエンハンサー活性化が重要であることを示唆する知見を得て、論文発表した<sup>4</sup>(図1)。

【引用文献】(2、4は本研究成果である)

1. Erkek et al., Nat Struct Mol Biol. 2013, 20:868-75. doi: 10.1038/nsmb.2599.
2. Makino et al., Front Cell Dev Biol. 2014 doi: 10.3389/fcell.2014.00030
3. Wiekowski, M., et al, Dev Biol 1993; 159, 366-378,, doi:10.1006/dbio.1993.1248
4. Aoshima, K., et al. EMBO reports 2015, doi:10.15252/embr.201439700.

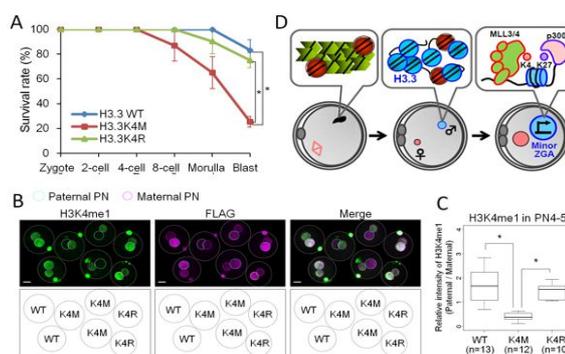


図1 . A) K4M 変異体発現による初期胚発生停止。B, C) K4M 変異体発現による雄性前核 H3K4 モノメチル化の減少。D) 本研究のサマリーとモデル。雄のクロマチンは受精後 H3.3 に置換され、適切なヒストン修飾を受けて転写が活性化される。

## 5. 主な発表論文等

### 【雑誌論文】(計5件)

Yamagata K, & Okada Y. Understanding paternal genome demethylation through live-cell imaging and siRNA. Cellular and Molecular Life Sciences. 2011, 68(10):1669-79. doi: 10.1007/s00018-010-0623-0. 査読有

Aoshima K, Baba A, Makino Y, & Okada Y: Establishment of Alternative Culture Method for Spermatogonial Stem Cells Using Knockout Serum Replacement". PLoS ONE 8(10):e77715. doi: 10.1371/journal.pone.0077715. 査読有

Makino Y, Inoue E, Hada M, Aoshima K, Kitano S, Miyachi H, & Okada Y: Generation of a dual-color reporter mouse line to monitor spermatogenesis in vivo." Front Cell Dev Biol. 2014 2(30). doi: 10.3389/fcell.2014.00030. 査読有

Aoshima K, Inoue E, Sawa H, & Okada Y: Paternal H3K4 methylation is required for minor zygotic gene activation and early mouse embryonic development. EMBO Rep. 2015, pii: e201439700. 査読有

Okada Y & Aoshima K: KM mutant highlights enhancers in minor ZGA. Cell Cycle, in press. 査読無

### 【学会発表】

(国内外招待講演のみ記載)(計5件)

岡田由紀「エピジェネティック遺伝；消すべきか消さざるべきか」NEDO・さがけ合同シンポジウム(東京) 2013年4月19日

岡田由紀「精子クロマチン構造とエピゲノム遺伝」第8回エピジェネティクス研究会年会(2014年5月27日、東京)

岡田由紀「精子クロマチン構造とエピ

ジェネティック遺伝」日本実験動物科学技術 2014(2014年5月16日、札幌)  
Y Okada "Role of H3.3 in mature sperm; Implications in transcriptional regulation in early embryos." 2014 Seoul Epigenetics and Chromatin Symposium (2014年9月4日、Seoul, Korea)

岡田由紀「生殖細胞特異的 H2A バリエーションのリン酸化とその機能の解明」第2回ヒストンバリエーション研究会(2015年2月28日、横浜)

### 【図書】(計3件)

牧野吉倫、岡田由紀 「精子形成のエピジェネティック制御機構」羊土社実験医学 30巻 2916-2922,2012

青島圭佑、岡田由紀 「マウス受精卵前核期におけるクロマチンダイナミクス」生化学 第85巻第4号、2013年4月

羽田政司、岡田由紀 「ヒストン制御とエピジェネティクス」生体の科学 第65巻第6号、2014年12月

### 【産業財産権】

該当なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田由紀 (OKADA, Yuki)

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任准教授

研究者番号: 60546430

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

白髭克彦 (SHIRAHIGE, Katsuhiko)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号: 90273854

伊藤武彦 (SHIRAHIGE, Katsuhiko)

東京工業大学・大学院・生命理工学研究科・教授

研究者番号：90501106

牧野吉倫 (MAKINO, Katsuhiko)

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任助教

研究者番号：60431334

朴聖俊 (PARK, Sung-Joon)

東京大学・医科学研究所・特任講師

(4) 研究協力者

青島圭佑 (AOSHIMA, Keisuke)

羽田政司 (HADA, Masashi)