

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25112009

研究課題名(和文)核移植技術を用いた生殖サイクルのエピジェネティクス変化の解析

研究課題名(英文)Analysis of epigenetic changes during reproductive cycle by nuclear transfer techniques

研究代表者

小倉 淳郎(OGURA, Atsuo)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・室長

研究者番号：20194524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 117,100,000円

研究成果の概要(和文)：体細胞などをドナーとして核移植クローンを行ない、生殖サイクルにおけるエピゲノム変化を解析した。体細胞由来の抑制性メチル化ヒストンH3K9me2およびme3は、体細胞クローンの障害になっていた。また胎盤特異的刷込み遺伝子を制御するH3K27me3は、クローン胎盤で消去されており、それが胎盤の過形成の原因の一つであった。また、アルギニンメチル化であるH3R17me2は、受精時の再プログラムの際に、卵子のヒストンH3.3を精子ゲノムに取り込ませる必須のマーカーであることを明らかにした。以上の通り、生殖サイクルにおけるエピゲノムの重要性、特に新たなヒストンメチル化の役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic changes during the germline cycle were analyzed by nuclear transfer techniques using somatic cells and other cell types as donors. We found that somatic, repressive histone marks such as H3K9me2 and me3 were resistant to reprogramming by nuclear transfer and caused developmental failure of somatically cloned embryos. Another histone mark, H3K27me3, which controls placenta-specific imprinting was lost in cloned embryos, leading to placental enlargement. A histone arginine methylation mark, H3R17me2, was essential for incorporation of maternal H3.3 into the paternal genome and active DNA demethylation of the paternal genome. Thus, we uncovered the importance of histone methylation during the germline cycle.

研究分野：発生工学

キーワード：核移植 エピジェネティクス 生殖細胞 受精 着床

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の生殖サイクルにはいくつかの重要なエピジェネティクス転換期が存在する。ゲノムワイドな転換期として、受精、着床、そして生殖細胞分化が挙げられ、小規模でも発生に大きく影響を与えるものとして、ゲノム刷込みと X 染色体不活化が挙げられる。これらのエピジェネティクス変化はいずれも長期的な記憶、そして特定の時期における消去という特徴がある。これらの特徴を維持するために、ゲノム上には DNA メチル化、ヒストン修飾、クロマチン構造、核内コンポーネント構成などあらゆるエピジェネティクス制御が動員されているものと予想され、当時の技術により精力的に解析が進んでいた。しかしながら、細胞の直接的な解析は、その時期限定の生化学的な特性に留まり、それを発生生物学的な意義に結びつけることは難しかった。

そこで本研究は、通常の直接的な方法では理解の難しいエピジェネティクス転換を明らかにするために、核移植クローン技術あるいは顕微授精を利用した。核移植クローン技術は、1960年代の John Gurdon らのカエルを用いた研究以来の古い歴史を持つが、従来の研究では、レシピエント卵子内においてドナー細胞のすべての記憶が抹消されると考えられていた。しかし、本研究の代表者小倉らは、哺乳類に特有なエピジェネティクス記憶であるゲノム刷込みや体細胞の抑制性ヒストン修飾などが核移植後も再プログラム化されず、クローン胚で維持されることを明らかにした。よって、本来、受精時以外に再プログラム化される記憶、すなわち着床、胎盤形成、生殖細胞分化など大きな転換期に依存するエピゲノム記憶は、核移植では再プログラム化されない。そこで、その性質を利用して、核移植クローン胚に受け継がれたドナー細胞ゲノム情報を時空間的に拡大して解析できると考えた。

### 2. 研究の目的

以上の背景から、核移植技術あるいは顕微授精技術を用いて生殖サイクルにおけるエピジェネティクス変換期、すなわち受精、着床、胎盤形成、生殖細胞分化におけるエピジェネティクス変化を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本申請の研究計画は、生殖サイクル各ステージの細胞をドナーとして用いた核移植技術などによる特殊胚の作出と、その解析から成っている。ドナー細胞は、in vivo に存在する生殖細胞および体細胞に加え、ES 細胞、生殖幹細胞、胎盤性幹細胞などの人工的幹細胞も用いる。試料として、着床前期胚、着床後胚・胎仔、および胎盤組織を採取し、解析する。これらの試料は、DNA メチル化、ヒストン修飾などエピゲノムのレベルから、遺伝子およびタンパク質発現レベルまで解析す

る(これらすべてを可能にするのが、核移植技術を応用する利点である)。一部は研究分担者による独自の微量化と鋭敏化のための新規技術を応用する(特に次世代シーケンサー用試料の微量化)。解析対象は、1. 着床後のヒストンメチル化、2. 刷込み型 X 染色体不活化のインプリント、3. centric/pericentric 領域 DNA メチル化、4. 胎盤特異的エピゲノム記憶である。データの生物学的解釈には、本領域に参加する他の研究者の知識と経験を最大限に利用する予定である。最終的に得られたデータ群は、用いたドナー細胞の生殖サイクルにおける位置、関連する長期的エピジェネティクスの記憶される範囲、その生物学的意義等の情報へ変換し、これらすべて情報を組み入れた、生殖サイクルにおけるエピゲノムダイナミクスの地図を完成させる。

### 4. 研究成果

(1) 円形精子細胞を用いた受精における能動的 DNA 脱メチル化機構の解析

受精直後から精子由来の雄性前核は能動的 DNA 脱メチル化を受けることが明らかにされている。そこで、円形精子細胞を用いた顕微授精を行い、果たして正常に脱メチル化されるかどうか解析した。対照は同じタイミングで実施した精子を用いた顕微授精胚とした。その結果、受精後早期においてはいずれの顕微授精胚も、メチル化(5mC)とヒドロキシメチル化(5hmC)の比率が雌雄前核で差が見られなかった。しかし6時間以降、精子由来受精卵ではほぼすべての例において雄性前核における 5mC の低下と 5hmC の上昇が見られたのに対し、円形精子細胞由来では、ほぼ半数の例にとどまった。そこで、DNA メチル化状態を蛍光タンパク質で可視化し、ライブイメージング技術を用いることにより、DNA 脱メチル化が正常に進行した胚と異常な胚を区別し、胚移植を行ったところ、異常な胚で効率に発生遅延が生じることを明らかにした。この現象は、精子細胞のヒストンの卵子ヒストンへの置換が遅れていることに原因があった。

(2) 着床後の胎盤形成における正常な層構造の形成機構

マウス体細胞クローン胚では、胎盤の層構造が乱れ、過形成を呈することが知られている。そこで、層構造が乱れる直前の 11.5 日胎盤における mRNA およびマイクロ RNA(miRNA)のマイクロアレイ解析を行った。その結果、正常対照との差次的マイクロ RNA 発現は、ほとんどが 2 カ所の刷込み遺伝子領域に絞られることが明らかになった。その下流の遺伝子群と差次的 mRNA との共通遺伝子も絞り込むことができた。さらに胎盤特異的刷込み遺伝子(父方発現)である *Slc38a4*、*Gab1*、*Sfmbt2* の 3 遺伝子の刷込みが消失(loss of imprinting; LOI)されていること

を明らかにした。これらの L01 は、クローン由来 trophoblast stem cell でも確認された。また、*Sfmbt2* のイントロン内には、マイクロ miRNA クラスターが存在しており、これらの miRNA もクローン胎盤で過剰発現していることを確認した。このクラスターを父方欠失した胎盤の解析により、これらの miRNA も父方発現であること、抗腫瘍あるいはアポトーシス遺伝子を抑制して胎盤の成長を促進していることを明らかにした。そこで、miRNA クラスターの母方のノックアウト体細胞を用いて核移植クローンを行ったところ、重量が正常化胎盤が得られた。さらに、*Gab1* との母方ダブルノックアウトとすることで、さらに正常化が進んだ。よって、少なくとも本 miRNA クラスターと *Gab1* の過剰発現 (biallelic expression) が、クローン胎盤過形成の原因の 1 つであることを明らかにした。一方、*Slc38a4* ノックアウトマウスの作成にも成功しており、やはり胎盤の発生に影響が出ていることを明らかにしている。この遺伝子も胎盤の過形成に関係している可能性が示された。

また、胎盤系の幹細胞である trophoblast stem cell (TS 細胞) を用いて、体細胞クローン胎盤の異常についても解析を行なった。その結果、クローン胎盤で同定された 3 つの遺伝子 (*Slc39a4*, *Gab1*, *Sfmbt2*) の L01 が確認された。よって、体細胞クローンは、胎盤形成初期より L01 が生じていることが示唆された。さらに、一細胞発現解析により、クローン TS 細胞ではカドヘリンおよび FGF2R 遺伝子の発現が低下していることが示された。これらは、クローン初期胎盤が、自己複製系よりも分化系に傾いていることを裏付ける結果であった。

#### (4) 着床前胚におけるレトロトランスポゾン抑制機構の解析

哺乳類の着床前胚のゲノムは、桑実期から胚盤胞期、すなわち着床直前において、きわめて特徴的な低 DNA メチル化状態となる。そこで、マウスをモデルに用いて、低メチル化状態にある桑実期胚 - 胚盤胞においてレトロトランスポゾンが抑制される機構を解析した。マウス着床前胚においてヒストンシヤペロン CAF-1 をノックダウンすると、胚が発生停止する。この原因として、LINE-1、SINE-B2、そして IAP が異所性に発現し、胚にダメージを与えていることを明らかにした。さらに、ヒストンバリエーションあるいはヒストン修飾に対する特異抗体を用いた ChIP 解析により、CAF-1 がヒストンバリエーション H3.1-H4 とともに抑制性ヒストン (H3K9me3 および H4K20me3) を付加し、それがレトロトランスポゾンの発現を抑えていることがわかった。

#### (4) 受精時における精子ゲノム再プログラム化必須因子の同定

精子ゲノムは受精直後から核の脱凝縮、核

タンパク質であるプロタミンの脱落、そして卵子由来ヒストンの取込みによるヌクレオソームと前核の形成など、ダイナミックな変化を生じる。これらの変化に必須の因子として、*Mettl23* を同定した。*Mettl23* はタンパク質メチル化酵素の一つであり、その酵素活性によりヒストンアルギニンメチル化 H3R17me2 が修飾されることを生化学的に明らかにした。具体的には、卵子 H3 ヒストンバリエーションである H3.3 が精子由来ゲノムに取り込まれるためには、H3.3R17me2 が必須であること、そして雄性前核形成後の能動的 DNA 脱メチル化には、*Mettl23* の存在が必須であることを明らかにした。よって、*Mettl23* を新たな母性ゲノム再プログラム化因子として同定することができた。

## 5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 30 件)(すべて査読有り)

Ogonuki N, Ogura A (9 人中 9 番目). Oocyte-activating capacity of fresh and frozen-thawed spermatids in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). Mol Reprod Dev 85, 376-386 (2018)

Hatanaka Y, Nakano T, Ogura A (20 人中 20 番目). Histone H3 methylated at arginine 17 is essential for reprogramming the paternal genome in zygotes. Cell Rep 20, 2756-2765 (2017)

Inoue K, Ogura A (8 人中 8 番目). The rodent-specific microRNA cluster within the *Sfmbt2* gene is imprinted and essential for placental development. Cell Rep 19, 949-956 (2017)

Kaminuma O, Ogura A (17 人中 17 番目). Hyper-reactive cloned mice generated by direct nuclear transfer of antigen-specific CD4+ T cells. EMBO Rep 18, 885-893 (2017)

Hirose M, Ogura A (16 人中 16 番目). CRISPR/Cas9-mediated genome editing in wild-derived mice; generation of tamed wild-derived strains by mutation of the *a* (nonagouti) gene. Sci Rep 7, 42476 (2017)

Motomura K, Ogura A (11 人中 11 番目). Cellular dynamics of mouse trophoblast stem cells; Identification of a persistent stem cell type. Biol Reprod 94; 122 (2016)

Loi P, Iuso D, Czernik M, Ogura A. A new, dynamic era for somatic cell nuclear transfer? Trends Biotech 34; 791-797 (2016)

Hasegawa A, Mochida K, Inoue H, Noda Y, Endo T, Watanabe G, Ogura A. High-yield superovulation in adult mice by anti-inhibin serum treatment

combined with estrous cycle synchronization. *Biol Reprod* 94; 21 (1-8) (2016)

Hatanaka Y, Ogura A (9人中9番目). Histone chaperone CAF-1 mediates repressive histone modifications to protect preimplantation mouse embryos from endogenous retrotransposons. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 14641-14646 (2015)

Inoue K, Oikawa M, Kamimura S, Ogonuki N, Nakamura T, Nakano T, Abe K, Ogura A. Trichostatin A specifically improves the aberrant expression of transcription factor genes in embryos produced by somatic cell nuclear transfer. *Sci Rep* 5;10127 (2015).

Kurotaki YK, Ogura A (8人中8番目). Impaired active DNA demethylation in zygotes generated by round spermatid injection. *Hum Reprod* 30;1178-1187 (2015)

Mizutani E, Ogura A (14人中14番目). Generation of cloned mice from adult neurons by direct nuclear transfer. *Biol Reprod* 92; 81 (2015)

Kamimura S, Ogura A (13人中13番目). Establishment of paternal genomic imprinting in mouse prospermatogonia analyzed by nuclear transfer. *Biol Reprod* 91; 120 (1-12) (2014).

Shinagawa T, Ogura A (15人中13番目), Shirahige K, Ishii S. Histone variants enriched in oocytes enhance reprogramming to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 14, 217-227 (2014)

Oikawa M, Ogura A (13人中13番目). Understanding the X chromosome inactivation cycle in mice; A comprehensive view provided by nuclear transfer. *Epigenetics* 9; 204-211 (2014)

Okabe H, Matoba S, Nagashima T, Mizutani E, Inoue K, Ogonuki N, Chiba H, Funayama R, Tanaka S, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, Ogura A (14人中13番目), Arima T. RNA sequencing-based identification of aberrant imprinting in cloned mice. *Hum Mol Genet* 23; 992-1001 (2014)

Hirasawa R, Matoba S, Inoue K, Ogura A. Somatic donor cell type correlates with embryonic, but not extra-embryonic, gene expression in postimplantation cloned embryos. *PLoS One* 8; e76422, (2013)

Honda A, Ogura A (11人中11番目). Naive-like conversion overcomes the limited differentiation capacity of

induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem* 288; 26157-26166 (2013).

Ogura A, Inoue K, Wakayama T. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368, 20110329 (2013)

Kamimura S, Ogura A (9人中9番目). Mouse cloning using a drop of peripheral blood. *Biol Reprod* 89; 24 (1-6) (2013)

〔学会発表〕(計25件)

核移植クローンとエピジェネティクス  
小倉淳郎 第11回日本エピジェネティクス研究会年会(東京都千代田区)

マウス顕微授精及び核移植から見えてくる発生のエピジェネティクス 小倉淳郎 第62回日本生殖医学会学術講演会・総会 2017.11.17(山口県下関市)

Factors affecting the outcome of sperm and spermatid injection. Ogura A, Ogonuki N International Symposium of Japan Society for Marmoset Research (Kyoto, Japan) 2018.01.18

Development of reproductive engineering techniques in mice. Ogura A. The 3rd Symposium of Thai Society for Animal Reproduction, (Bangkok, Thailand), 2016.01.13

Nuclear transfer for the study of developmental epigenetic. Ogura A. International Symposium on the Future of Nuclear Transfer and Nuclear Reprogramming (Yamanashi, Japan), 2016.03.10

〔図書〕(計10件)

顕微授精・核移植クローン技術(配偶子・体細胞からの産子作出). 小倉淳郎, 的場章悟

マウス表現型解析スタンダード. pp317-323. 羊土社 2016;

顕微授精・核移植クローン技術(配偶子・体細胞からの産子作出). 小倉淳郎, 的場章悟 マウス表現型解析スタンダード. pp317-323. 羊土社 2016;

核移植により起こるエピジェネティックなリプログラミングエラー 井上貴美子, 小倉淳郎 細胞工学 2015; Vol.34 No.9;873-878

「顕微授精」 小倉淳郎, 佐藤英明, 河野友宏, 内藤邦彦 哺乳類の発生工学 pp. 83-93, 朝倉書店、東京 2014

「実験動物学における発生工学」小倉淳郎, 佐藤英明, 河野友宏, 内藤邦彦 哺乳類の発生工学 pp. 166-172, 朝倉書店、東京 2014

「顕微授精でわかること、できること」小倉淳郎, 黒滝陽子 細胞工学 2014;

Vol. 33; No.4; 400-405  
「人工授精・体外受精・顕微授精」小倉淳郎  
繁殖生物学 2013; 252-263  
Clone-specific X-linked gene repression caused by ectopic Xist transcripts from the active X chromosome. Ogura A, Inoue K.  
Principles of Cloning, 2nd Edition  
2013 161-172

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://ja.brc.riken.jp/lab/kougaku/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小倉 淳郎 (OGURA, Atsuo)  
国立研究開発法人理化学研究所・バイオリ  
ソースセンター・室長  
研究者番号：20194524

(2) 研究分担者

幸田 尚 (KOHDA, Takashi)  
研究者番号：60211893