

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月19日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02472

研究課題名（和文）生殖系列における性特異的エピゲノム制御の解明

研究課題名（英文）Sex specification of germline cells by epigenetic regulation in mice

研究代表者

河野 友宏（Kono, Tomohiro）

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：80153485

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 32,600,000円

研究成果の概要（和文）：生殖系列細胞の性分化機構の理解を深めるために、マウスの始原生殖細胞（PGCs）の性差について網羅的遺伝子発現・エピゲノム解析を展開した。トランスクリプトーム解析により胎齢13日の雌雄PGCs特異的発現遺伝子群を特定した。雌雄PGCsおよび生後一日目の生殖細胞における包括的ヒストン修飾をChIP-seq解析で取得することに成功した。それらの結果は雌雄PGC間の性差を明らかにし、さらに遺伝子発現との関連を示した。さらに、Sry欠損性転換XY雌マウスをゲノム編集により作成し、XY卵母細胞の減数および機能不全の背景を明らかにした。この研究成果は、雌雄生殖細胞の分化とエピゲノムの新たな関係を示した。

研究成果の概要（英文）：We conducted studies on mechanisms underlying sex differentiation of mouse primordial germ cells (PGCs). By transcriptome analysis, we identified gene expression profiles specific for male and female PGCs, respectively; which could lead sex differences at early stage of PGCs. We successfully obtained global information of comprehensive histone modifications of PGCs by ChIP-seq analysis. Interestingly the data demonstrated sex specific difference of histone modifications, which would regulate sex specific gene expression of PGCs. Furthermore, transgenic mice lacking Sry, sex-determining region Y, were produced by genome editing procedure and we showed molecular mechanism underlying depletion and dysfunction of XY oocytes. This project provides further insight into epigenetic regulation for differentiation of female and male germ cells.

研究分野：生殖科学

キーワード：エピジェネティクス 始原生殖細胞 性分化 トランスクリプトーム ヒストン修飾 ChIP-seq

1. 研究開始当初の背景

マウス胎齢 13.5 日の始原生殖細胞 (PGCs) では、DNA メチル化がほぼ完全に消失している。それではいったい何をランドマークとして雌雄生殖細胞 (卵子・精子) に特異的な DNA メチル化が成立するのかという根源的な疑問が残る。一方、ゲノムの高次構造を調節するヒストン修飾は重要なエピゲノム修飾であるが、解析手法の諸問題から、これまで生殖系列における情報は少なく、生殖系列におけるヒストン修飾の包括的解析が急務となっている。また、雌雄 PGCs における遺伝子発現の性差についても明らかにされておらず、どのようなプロセスを経て雌雄生殖細胞へと分化しているかは不明な点も多く残されている。一方、*Sry* 発現による性決定から、PGCs における性特異的エピゲノム修飾が決定するまでの過程は、エピゲノム修飾リプログラミングの理解を深める上で、きわめて興味深い。XY 性転換メスマウスは不妊となる事が知られているが、その分子生物学的機構は不明な点が多く残されている。同時に XY 性転換メス生殖系列細胞の形成不全の機構を追究することは、PGCs におけるエピゲノムリプログラミングの進行を理解する上でも貴重なモデルになり得る。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス雌雄始原生殖細胞における網羅的ヒストン修飾情報、トランスクリプトーム解析および DNA メチローム情報を取得して比較し、雌雄生殖系列細胞の分化発生におけるエピゲノム修飾の意義を明らかにする。さらに、遺伝的性 (XX/XY) と生殖系列におけるエピゲノムリプログラミングの関係を探るため、*Sry* および関連遺伝子欠損性転換マウスをゲノム編集により作出し、XY 雌生殖系列細胞の形成障害の分子基盤を探究する。一連の研究から、生殖系列における性特異的エピゲノム制御の解明に貢献する。

3. 研究の方法

1) PGCs のトランスクリプトーム性差の解析
Pou5f1- PE-GFP 雄マウスと交配後の B6N 雌マウスから胎齢 13.5 日 (E13.5) の PGCs を FACS ソーティングにより回収した。RNA-seq により網羅的遺伝子発現解析を実施するため、雌雄 PGCs (10000 細胞) から total RNA を抽出し、RNA-seq ライブラリーを構築した。cDNA 合成および増幅は、SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit を用いて行った。さらに、シングルセル RNA-seq データの取得のため、Fluidigm 社 C1 Single-Cell Auto Prep System により単一細胞の捕捉、生存細胞の確認、cDNA の合成ならびに Long-distance PCR を行った。その後、Nextera XT DNA Library Prep Kit を用いて単一細胞 cDNA ライブラリーを構築した。各ライブラリーはイルミナ社 HiSeq 2500 次世代シーケンサーを用いてシーケンス解析した。得られたデータはマウスゲノム mm10 にアライメントし、情報解析した。

2) ChIP-seq 法を用いた PGCs のヒストン修飾の解析

Pou5f1- PE-GFP マウス胎齢 13.5 日 (E13.5) の雌雄 PGCs を FACS ソーティングにより回収した。1 回の ChIP-seq 実験にそれぞれ 10000 個の PGCs を用いた。まず、マイクロコッカールヌクレアーゼ処理により 2-3 スクレオソーム単に断片化後、固定せずに直接クロマチン免疫沈降に供試した。用いた抗体は H3K4me3, H3K4me1, H3K27me3, H3K9me2, H3K9me3 ならびに H3K27ac である。ついで免疫沈降産物を精製後、KAPA Hyper Prep Kit を用いてライブラリーを作成し、イルミナ社 NextSeq 500 次世代シーケンサーに供試した。得られたシーケンスデータは、マウスゲノム mm10 にアライメントし、情報解析した。

3) 性転換雌マウスの作出と卵母細胞の正常性解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて *Sry* 遺伝子欠損マウスを作出するため、独自に設計したガイド RNA を含む *Sry* ターゲッティング px330 プラスミドを構築した。これを受精卵にマイクロインジェクションし体外培養して得られた胚盤胞をレシピエントマウスに移植して *Sry* 遺伝子欠損性転換マウスを誕生させた。なお、SRVHMG-box ドメインコード領域内の塩基の欠損および挿入を確認し性転換の判別を行った。性転換雌マウスの卵巣および卵子を回収し、トランスクリプトーム解析、妊用孕性解析ならびに卵巣組織の病理組織解析を実施した。

4. 研究成果

1) トランスクリプトーム解析による PGCs における性差確立の解明
包括的なトランスクリプトーム解析により、雌雄 PGCs においてそれぞれ特異的 (>2 倍、 $P < 0.05$) に発現する 651 および 428 の差別的発現遺伝子を同定した。これらのなかに多くの転写因子が同定された。遺伝子オントロジーおよびネットワーク解析により、雌雄生殖細胞への分化に関連する遺伝子が同定され、雌および雄 PGC 特異的発現遺伝子の異なる機能が明らかになった。さらに、DNA メチル化および ChIP-seq 解析によるヒストン修飾の分析は、低メチル化遺伝子プロモーター領域が H3K4me3 および H3K27me3 と結合していることを突き止めた。単一細胞トランスクリプトーム解析では、雌 PGC 67 個および雄 PGC 77 個からデータセットの取得に成功した。検出された転写産物の平均数は 6593 (範囲: 3787~8763) であった。クラスター解析および主成分解析は、トランスクリプトームデータセットが完全に雌雄 PGC でそれぞれ独立したクラスターを形成したことから、すでに単一細胞レベルで性特異的な運命決定を受けていることが明らかとなった (図 1)。また、ピアソン相関係数を算出して Welch 検定を行ったところ、雄 PGC は雌 PGC に比べ高い転写不均質性が認められた。これらの成果は、マウスにおいて PGC

の性別特異的分化プログラムはE13.5のステージで決定的に割り当てられていることを示した。これらの成果は、これまでにない詳細な雌雄PGCの遺伝子発現プロファイルを示し、*in vivo*における生殖系列の分化機構の理解を深めるばかりでなく、*in vitro*における生殖細胞の分化誘導の研究に対しても基礎的知見を提供している。

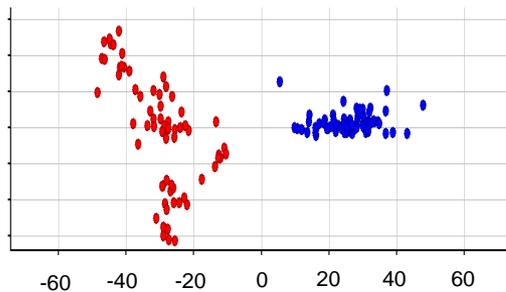


図1 . 単一 PGC トランスクリプトームデータの主成分解析 (赤: 雌 PGC, 青: 雄 PGC)

2) PGCs の性特異的遺伝子発現を調節するヒストン修飾の包括的検出

胎齢 13.5 日のマウス PGC で DNA メチル化を消失した後、ヒストン修飾による性特異的遺伝子発現制御については不明である。そこで、クロマチン免疫沈降および次世代シーケンサー (ChIP-seq 解析) を用いて詳細に追究した。活性化マーカーの H3K4me1、H3K4me3 および H3K27ac、抑制マーカーの H3K27me3、H3K9me2 および H3K9me3 修飾パターンは、雌雄 PGC 間で区別されることが明らかとなった。H3K4me3 / H3K27me3 による二価標識は、雌雄 PGC 間では異なる染色体領域に集積していること、一方雄特異的 DNA メチル化パターンを有する新生仔 (P1) 精原細胞は、異なるヒストン修飾を示した。さらに、最終的に精子中で過剰メチル化される CpG アイランド (CGI) は、PGC 中の H3K4me3 および H3K4me1 標識およびトランスポーズ接近可能部位を欠いていた。P1 の CGI は、他の細胞型とは異なるヒストン修飾パターンを示した。さらに、卵母細胞および精原細胞におけるインプリンティング制御領域におけるヒストンマークの差異は認められたが、これは PGC には適用されなかった。これらの結果は、ヒストン修飾が、DNA メチル化除去後の PGC における遺伝子発現の調節において重要な役割を果たし、雌雄生殖細胞への分化に重要な遺伝子発現制御機構として働くことを示唆している。これらの成果は、雌雄 PGC の分化に重要な遺伝子発現の制御にヒストン修飾が重要な役割を演じていることを裏付ける詳細なデータを提示している。新たなエピジェネティクス制御の重要性を示したものと評価されている。

3) 性転換 XY 雌マウスにおける卵母細胞の機能喪失の分子基盤

性転換された XY 雌マウスの繁殖能力は、卵母細胞の大量喪失および減数分裂進行の障害が生じ、不妊となる。ここでは、近交系 C57BL / 6 において、CRISPR/Cas9 システムを用いて性決定遺伝子である *Sry* 欠損させ性転換マウス (XY 雌) を効率的に作成することに成功した。それらの性転換マウスをもちいて、XY 卵母細胞喪失および機能不全の分子病因を明らかにした。*Sry* 欠損突然変異体マウスは、胎仔発達中に PGC の増殖傷害を示し、性成熟前の卵巣において生殖細胞の枯渇をもたらした。PGC の包括的トランスクリプトーム解析は、有糸分裂増殖の段階の間に、*Sry* 欠損メスが正常な発生プロセスから明らかに逸脱していることを示した。*Sry* 欠損 XY 雌-PGC の増殖の障害は、異常な β -カテニンシグナル伝達および転移因子の過剰発現と関連していた。減数分裂期に入ると、*Sry* 欠損 XY 雌の卵母細胞は、染色体クロスオーバー形成の障害、原始卵胞維持の障害、および胚発生の能力障害を含めて、広範な異常を示した。これらの結果から性転換された XY 雌マウスにおける卵子形成障害の原因に対する理解を深める重要な知見を提示した。XY 女性の研究は重要な領域で多くの成果があげられているが、性転換女性不妊症の分子病因論に関しては未だに謎が残っている。我々の成果は、さらに典型的な女性として存在する XY 核型の患者である「Swyer 症候群」のようなヒトの性分化障害に関する洞察を提供するものである。

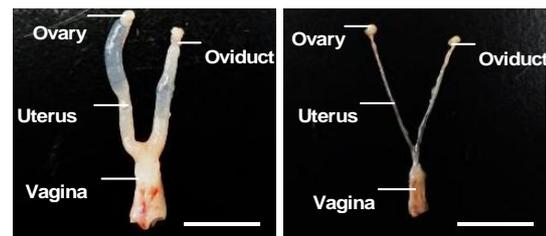


図2 . 性転換 XY 雌の生殖器 (左 XX 雌、右 XY 雌)

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 6 件)

1) Kumamoto S, Takahashi N, Nomura K, Fujiwara M, Kijioka M, Uno Y, Matsuda Y, Sotomaru Y, Kono T. Overexpression of microRNAs from the *Gtl2-Rian* locus contributes to postnatal death in mice. *Hum Mol Genet.* 26 (19):3653-3662. 2017. doi: 10.1093/hmg/ddx223. 査読あり

2) Kobayashi H, Koike T, Sakashita A, Tanaka K, Kumamoto S, Kono T. Repetitive DNA methylome analysis by small-scale and single-cell shotgun bisulfite sequencing. *Genes*

Cells 21(11):1209-1222. 2016.

doi: 10.1111/gtc.12440.

査読あり

3) Koike T, Wakai T, Jincho Y, Sakashita A, Kobayashi H, Mizutani E, Wakayama S, Miura F, Ito T, Kono T. DNA Methylation Errors in Cloned Mouse Sperm by Germ Line Barrier Evasion. Biol Reprod. 94(6):128. 2016.

doi: 10.1095/biolreprod.116.138677.

査読あり

4) Sakashita A, Kawabata Y, Jincho Y, Tajima S, Kumamoto S, Kobayashi H, Matsui Y, Kono T. Sex Specification and Heterogeneity of Primordial Germ Cells in Mice. PLoS One 10(12):e0144836. 2015.

doi: 10.1371/journal.pone.0144836.

査読あり

5) Nagamori I, Kobayashi H, Shiromoto Y, Nishimura T, Kuramochi-Miyagawa S, Kono T, Nakano T. Comprehensive DNA Methylation Analysis of Retrotransposons in Male Germ Cells. Cell Rep 12(10): pp1541-7. 2015.

doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.060.

査読あり

6) Kubo N, Toh H, Shirane K, Shirakawa T, Kobayashi H, Sato T, Sone H, Sato Y, Tomizawa S, Tsurusaki Y, Shibata H, Saito H, Suzuki Y, Matsumoto N, Suyama M, Kono T, Ohbo K, Sasaki H. DNA methylation and gene expression dynamics during spermatogonial stem cell differentiation in the early postnatal mouse testis. BMC Genomics 16: 624. 2015.

doi: 10.1186/s12864-015-1833-5.

査読あり

〔学会発表〕(計 21 件)

1) Tomohiro Kono, Michiko Kawabata, Asuka Kamio, Yuko Jincho, Tomoya Takashima, Hisato Kobayashi, Yasuhisa Matsui. Sex differences of histone modifications in mouse PGCs after erasure of DNA methylation. ESHRE annual meeting, 2017.

2) Akihiko Sakashita, Chiaki Nishimura, Tomohiro Kono. Single-cell transcriptome analysis in XY oocytes of SRY-mutated, sex-reversed mice. World Congress of Reproductive Biology. 2017.

3) Hisato Kobayashi, Tasuku Koike, Akihiko Sakashita, Soichiro Kumamoto, Asuka Kamio-Miura, Tomohiro Kono. A holistic view of parental DNA methylome reprogramming and inheritance during mouse embryogenesis. World Congress of Reproductive Biology. 2017.

4) 小林久人, マウスのゲノム包括的なアレール特異的 DNA メチローム解析, NGS 現場の会, 2017.

5) 西村千秋, 坂下陽彦, 河野友宏, *Sry* 欠損 XY 性転換雌マウスの卵母細胞成熟能および繁殖能の解析, 日本卵子学会, 2017.

6) 川畑順子, 神尾明日香, 神長祐子, 高島友弥, 坂下陽彦, 小林久人, 河野友宏, 脱メチル化完了後のマウス始原生殖細胞におけるヒストン修飾の役割, 日本分子生物学会, 2016.

7) Akihiko Sakashita, Yukiko Kawabata, Yuko Jincho, Shiun Tajima, Souichiro Kumamoto, Hisato Kobayashi, Yasuhisa Matsui, Tomohiro Kono. XY oocytes of *Sry*-mutated sex-reversal mice deviate from the differentiation process at the initial stage, 日本分子生物学会, 2016.

8) Tomohiro Kono, Hisato Kobayashi, Tasuku Koike, Akihiko Sakashita, Haruka Tsuno, Souichiro Kumamoto, Takuya Wakai, Satoshi Sano. DNA methylome analysis in mouse germ cells and early embryos. ESHRE annual meeting, 2016.

9) 吉岡 匠, 神長祐子, 小池 佐, 小林久人, 大島一輝, 加藤容子, 河野友宏, 体細胞クローンマウス卵子の DNA メチレーションエラー, 日本繁殖生物学会, 2016.

10) Hisato Kobayashi, Tasuku Koike, Akihiko Sakashita, Haruka Tsuno, Soichiro Kumamoto, Takuya Wakai, Satoshi Sano, Tomohiro Kono. DNA methylome analysis in mouse germ cells and early embryos, Genomic Imprinting, Epigenetics, and Physiological Functions, 2016.

11) Souitiro Kumamoto, Kayo Nomura, Nozomi Takahashi, Tomohiro Kono. Role of miRNAs expressed from *Dkl1-Dio3* imprinted domain in mice. 6th Annual Next Generation Sequencing Asia Congress, 2016.

12) 小林久人, ゲノミックインプリンティング~全ゲノムパイサルファイトシーケンス解析から“目印”として働く DNA メチル化の本質を探る~, 生命医薬情報学連合大会, 2016.

13) 田島紫雲, 井関陽介, 小川英彦, 尾畑やよい, 河野友宏, ホールマウント免疫染色法を用いた PGCs の計数とアポトーシスの検出, 日本卵子学会, 2016.

14) 川畑順子, 神長祐子, 坂下陽彦, 小林久人, 河野友宏, マウス始原生殖細胞の DMR に

おけるヒストン修飾解析, 日本卵子学会, 2016.

15) 小林久人, 小池佐, 坂下陽彦, 田中啓介, 河野友宏, 小規模およびシングルセルショットガンバイサルファイトシーケンス解析による生殖細胞系列における反復配列特性の解明, 日本分子生物学会, 2015.

16) 小林久人, 次世代シーケンサーを利用した新しい農学研究分野の開拓, 日本動物遺伝育種学会, 2015.

17) 小林久人, 小池佐, 坂下陽彦, 田中啓介, 河野友宏, 小規模およびシングルセルショットガンバイサルファイトシーケンス解析による生殖細胞系列における反復配列特性の解明, 日本繁殖生物学会, 2015.

18) 神長祐子, 川畑順子, 坂下陽彦, 小林久人, 河野友宏, マウス始原生殖細胞の遺伝子発現を制御するエピゲノム修飾, 日本繁殖生物学会大会, 2015.

19) Tomohiro Kono, Akihiko Sakashita, Yukiko Kawabata, Yuko Jincho, Shiun Tajima, Souichiro Kumamoto, Hisato Kobayashi. Profiling of Gender-specific Gene Expression in Female and Male Primordial Germ Cells in Mice. ASRM Annual meeting, 2015.

20) Akihiko Sakashita, Yukiko Kawabata, Yuko Jincho, Shiun Tajima, Souichiro Kumamoto, Hisato Kobayashi, Yasuhisa Matsui, Tomohiro Kono. Epigenetic Landscapes for Regulating Gender Specific Cell Fate and Transcriptional Heterogeneity in mouse Primordial Germ Cells. Epigenetics 2015 | Australian Epigenetics Alliance, 2015.

21) 坂下 陽彦, 田島 紫雲, 川畑 順子, 神長裕子, 小林久人, 河野友宏, マウス始原生殖細胞における DNA メチル化非依存的な性特異的遺伝子発現機構, 日本卵子学会, 2015.

〔図書〕(計 1 件)

1) 河野友宏 他、近大出版、生殖補助医療(ART)、2017、44-50.

〔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

6. 研究組織
(1) 研究代表者
河野 友宏 (KONO, Tomohiro)
東京農業大学・生命科学部・教授
研究者番号：80153485

(2) 研究分担者
小林 久人 (KOBAYASHI, Hisato)
東京農業大学・生命科学部・准教授
研究者番号：70632727

(3) 研究分担者
外丸 裕介 (SOTOMARU, Yusuke)
広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授
研究者番号：90309352