

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07044

研究課題名(和文) マウス卵子形成過程におけるエピゲノム変化の解明

研究課題名(英文) Epigenetic dynamics during mouse oogenesis

研究代表者

石内 崇士 (Ishiuchi, Takashi)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：80612100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、卵子の発生時期におけるクロマチン状態を明らかにすることを目指した。ATAC-seqは微量サンプルにおいてもオープンクロマチン領域を同定することが可能であるという報告があったことから、ATAC-seq法に着目した。そして本課題では、ATAC-seqのライブラリ作製の最適化を行うことで微量サンプルに対するオープンクロマチン領域の同定法の確立に取り組んだ。サンプル調製の最適化においては、Tn5トランスポザゼの解離法などの点について検討を行った。本研究で行った条件設定により、微量サンプルに対しても安定した結果を得ることのできる方法を確立できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to reveal the chromatin status during oogenesis. As it was reported previously that ATAC-seq method is useful to profile open chromatin regions with limited cell number, we focused on this technique. We tried to optimize the method. We examined the suitable method to dissociate Tn5 transposase during sample preparation. We believe that such optimization will be important to obtain stable results from limited cell number samples.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：クロマチン

## 1. 研究開始当初の背景

個体を形成するすべての細胞のうち、生殖細胞は、次世代を残すという役割を担う細胞として体細胞とは区別される。生殖細胞は個体の中で生じる生殖細胞の運命決定と、それに続く正確な分化過程を経ることによって配偶子（精子と卵子）を産生し、次世代の個体を作り出すことを可能にする。言い換えれば、この運命決定や分化過程にエラーが生じると生命にとって最も重要な役目である次世代の個体産生を成し遂げることはできない。したがって、配偶子形成を支える詳細な分子機構の理解は、配偶子の発生メカニズムの理解にとどまらず、不妊症の原因究明などにも役立つものと期待される。

受精が可能な卵子は、胎生期におこる始原生殖細胞の形成とそれに続く減数分裂、卵胞形成、卵母細胞の発育、成熟卵子形成という長期にわたる過程を経て産生される。これまでに、卵子形成過程における生殖細胞の遺伝子発現パターンは発生段階ごとに変化することが知られていた (Pan et al. *Dev. Biol.* 2005)。このことは、卵子形成過程において生殖細胞のエピゲノム状態が継時的に変化することを示唆しているが、その詳細な部分については理解が進んでいなかった。これまでに特に詳細な解析がなされているのは DNA のメチル化のみであった。始原生殖細胞形成時には、DNA の大規模な脱メチル化が生じるが、卵母細胞成長期には卵子特異的な DNA メチル化パターンが確立され、インプリンティングの形成がなされることがわかっていた (Shirane et al. *PLoS Genet.* 2013; Kobayashi et al. *Genome Res.* 2013)。また、この時の DNA メチル化の確立にはヒストン脱メチル化酵素の一つである KDM1B が必要であることが示されており、DNA メチル化とヒストン修飾の関連性と卵子形成におけるヒストン修飾の重要性が示唆されていた (Ciccone et al. *Nature* 2009)。

## 2. 研究の目的

ヒストン修飾や DNA のメチル化状態に加え、オープンクロマチン領域の網羅的な同定は、エピゲノム状態を知る上で有用な情報となることが知られていた。クロマチンはゲノム DNA にヌクレオソームが強固に結合することにより構成されるが、クロマチンはヘテロクロマチンと呼ばれる、転写因子などの DNA 結合因子がアクセスできない状態をとることによって遺伝子発現を不活性化する。逆に、遺伝子を活性化する場合、プロモーターやエンハンサーといった転写因子や

RNA ポリメラーゼが結合する遺伝子発現制御領域は、ヌクレオソームが欠如したアクセスしやすい状態である「オープンクロマチン」の状態をとることによって遺伝子発現を活性化する。したがって、オープンクロマチン領域を網羅的に同定することにより、細胞種に特異的に機能する遺伝子発現制御領域、さらにこれまで未知であった機能的ゲノム領域を同定することが可能である。そこで本研究では、高速シーケンサーを用いて卵子形成過程におけるオープンクロマチン領域を網羅的に同定し、卵子形成過程におけるクロマチンの状態変化と生殖細胞に特異的な機能的ゲノム領域を明らかにすることを目的とした。そして、そのために、少細胞数を用いたオープンクロマチン領域の同定法の最適化を行うこととした。このような研究から、大量の細胞数を準備することが困難な卵子サンプルでも質の高いデータが得られると考えた。

## 3. 研究の方法

オープンクロマチン領域の特定には、これまでに比較的少細胞数でも可能な技術であることが示されている ATAC-seq (assay for transposase-accessible chromatin using sequencing) を用いることとした (図 1)。これまでに比較的少ない細胞数を用いた論文は報告があったものの、卵子サンプルはより少ない細胞数しか使用できないという制限があった。そのため、サンプルのロスを極力減らし、再現性の高い方法の確立するために、サンプル調製過程における Tn5 の解離法の最適化や必須となる PCR サイクル数の決定を行うこととした。

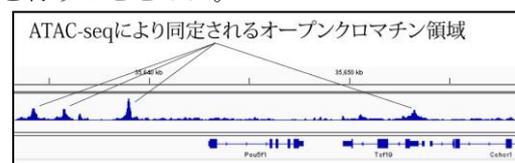


図 1. ATAC-seq のデータの参考例。

## 4. 研究成果

ATAC-seq サンプルの調整法を最適化するためにあたっては、細胞数の調節が容易なマウス ES 細胞を用いることとした。まずはじめに、本法を使用するにあたって標準的な細胞数である 5 万個の細胞を用いて、実際にサンプル調製を問題なく行うことができるかを検討した。その結果、サンプル調製を問題なく行うことができることを確認することができた (図 2)。

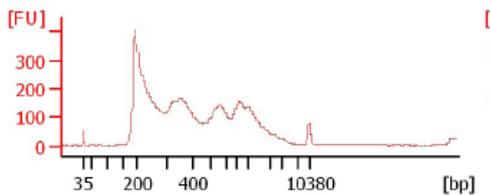


図2. バイオアナライザーによるサンプル調製の確認。

図2に示すとおり、ATAC-seq サンプルの調製時には転写因子などの結合するオープンクロマチン領域だけでなく、ヌクレオソーム間のリンカーDNA にも DNA タグが挿入されるために、いくつかの山がみられる。これは、Tn5 によるタグメンテーションが機能した証であり、このような波形を見ることで、サンプル調製が問題なく完了したことを確認できる。

通常のサンプル調製を問題なく行うことができることを確認できたことから、少細胞数サンプルの調整法の最適化を行うこととした。サンプルのロスを極力減らすために、Tn5 の解離において、EDTA と SDS による解離を行い、どちらが適しているかを調べることにした。SDS を用いた場合は、低濃度の SDS を用いても、その後の PCR が安定しないことがわかった (図3)。

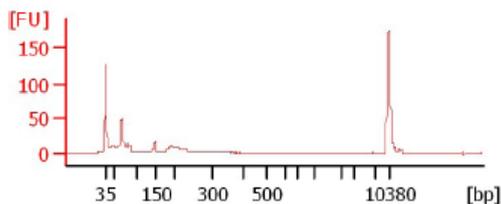


図3 SDS を用いて PCR 増幅されなかった例

一方、EDTA を用いた場合は、5000 細胞に細胞数を減らしても、安定してサンプル調製をすることができることがわかった (図4)。

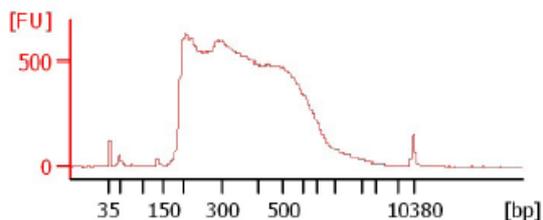


図4 EDTA を用いたサンプル例 (5000 細胞)

この結果をふまえて、細胞数を 500 細胞に減らしてもサンプル調製することが可能かどうか検討したところ、PCR サイクル数をふやすことで可能となることがわかった (図5)。

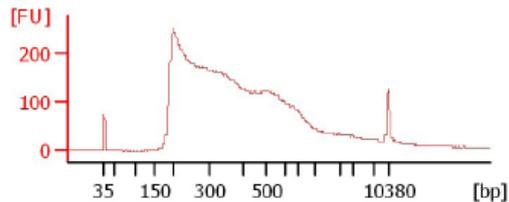


図5 EDTA を用いたサンプル例 (500 細胞)

以上の条件設定から、少細胞数サンプルを対象とした場合には、EDTA を用いてサンプルのロスを減らすことが重要であることがわかった。しかしながら、細胞数を減らした場合にはヌクレオソームサイズの DNA の波形をきれいにすることができないということがしばしば観察された。このことから、少細胞数を用いたサンプル調製にはさらなる工夫が必要であると考えられる。

また、本研究を遂行する間に、通常の ATAC-seq 法を改良し、少細胞サンプルに応用可能であることを示した論文が複数報告された。卵子のような細胞そのものが大きい細胞を対象としてサンプル調製した場合には、ミトコンドリア DNA とゲノム DNA の量比が大きく、調整したサンプルの多くがミトコンドリア DNA に由来するようになってしまうことが知られていた。この問題は、ミトコンドリア DNA をターゲットとするガイド RNA のライブラリを用いて、CRISPR-Cas9 によるミトコンドリア DNA の分解を行うという手法によって克服できることが示された (Wu et al., Nature 2016)。また、つい最近になって、20 個の細胞からでもサンプル調製が可能な miniATAC-seq 法という方法も報告されている (Wu et al., Nature 2018)。したがって、本研究で得られた成果とこれらの手法とを組み合わせることによって、さらに質の高い手法を確立できるのではないかと考えられる。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/epigenome/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石内 崇士 (ISHIUCHI, Takashi)  
九州大学・生体防御医学研究所・助教  
研究者番号：80612100

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

なし ( )