

令和元年6月19日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07999

研究課題名(和文) ウシ精子の体外受精胚発生率および受胎性に係るDNAメチル化状態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of DNA methylation status of bovine spermatozoa related to embryo development after in vitro fertilization and conception after artificial insemination

研究代表者

武田 久美子 (TAKEDA, Kumiko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門家畜育種繁殖研究領域・上級研究員

研究者番号：60414695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウシ凍結精液の新たな評価法の開発のため、ヒト用メチル化解析マイクロアレイを利用した網羅的メチル化状態の比較解析を行い、体外受精後の胚発生率や人工授精による受胎率と関連するメチル化可変部位、さらに精液を採取した雄牛の加齢に伴って変化するメチル化可変部位をそれぞれ検出した。また、加齢変化を示す9箇所、体外受精後の胚発生率に関連する1箇所、人工授精による受胎率と関連する1箇所については、メチル化可変領域のメチル化率を検出するPCR法を基盤とした手法を確立し、多数の凍結精液サンプルや体外受精胚の安価で簡便な評価を可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウシの精液性状検査による評価結果が良好でも人工授精後の受胎性の低い精液が存在しており、新たな評価指標が求められる。本研究ではエピゲノム情報を取り入れたウシ精液の新たな評価法の開発のため、ヒト用メチル化解析マイクロアレイを利用した網羅的メチル化解析から受胎性の異なるグループ間のメチル化プロファイルの解明や簡易評価指標となるメチル化可変部位の検出を行った。また、加齢変化を示す複数のメチル化可変領域のメチル化率から月齢推定がある程度可能であることから、今後、受胎性に関連するメチル化可変領域を複数特定することで、凍結精液の受胎性の事前評価の指標となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the novel methods for the prediction of bull fertility based on epigenome information, we analyzed the genome-wide DNA methylation profiles of bull spermatozoa using a human DNA methylation microarray. We detected differentially methylated regions (DMRs) concerning embryonic developmental ability after in vitro fertilization (IVF%), conception rate after artificial insemination (AI%), and age-related changes. Using combined bisulfite restriction analysis (COBRA), nine DMRs were confirmed to exhibit significant differences in their age-dependent methylation levels. One DMR was detected to correlate with IVF%, and another one DMR was detected to correlate with AI%. Further studies are required to use these DMRs as epigenetic biomarkers for predicting semen or bull fertility.

研究分野：家畜繁殖

キーワード：ウシ 精子 DNAメチル化 受胎性 体外受精

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ウシ精液の品質は、精子活力や生存率、精子濃度など精液性状に基づいて評価されることが多いが、精液性状の評価が良好でも人工授精に使用すると受胎性の低い精液が存在している。長年の選抜の過程を経て受胎率の低い種雄牛が存在する要因として、遺伝的要因以外の異常が考えられた。ヒトでは不妊の要因として、環境的な要因による精子核 DNA の損傷や精子クロマチン構造の不安定な状態が認められており、検査手順も確立している。精子核 DNA ダメージは凍結精液の凍結融解時に発生する活性酸素種に起因しており、家畜凍結精液でも同様の影響が考えられた。しかし、我々が人工授精後の受胎率と精子核 DNA ダメージ率との関連性を調べたところ、直接的な低受胎の要因ではないものも見受けられた (Takeda et al., 2015)。そこで次に要因のひとつとして、遺伝子発現制御 (エピジェネティクス) の異常が考えられた。

エピジェネティクスは DNA メチル化やヒストンの化学的修飾などからなる。精子形成過程において精子核 DNA メチル化は全体的に進行し、精子成熟期でヒストンはプロタミンに置換され、ゲノムの遺伝子発現が抑制される。精子は卵子に受精後、精子核クロマチンの脱凝縮、プロタミンがヒストンに置換されると共に DNA 脱メチル化が進み以後の卵割が可能となる (Ward, 2010)。ヒトでは男性不妊患者におけるインプリント遺伝子のメチル化異常 (Rajender et al., 2011; Dada et al., 2013) や、加齢に伴った精子核 DNA メチル化可変領域 (differentially methylated regions; DMRs) が多数判明し、老化による不妊等への影響が示唆されていた (Jenkins et al., 2014)。しかし、ウシでは特定の候補 DMRs をターゲットとした調査では低受胎精液の DNA メチル化異常は検出されなかった (金田ら, 2014)。スイギュウでは約 15 万箇所の CpG サイトのメチル化アレイの開発により、体外受精において胚発生率の高い精液と低い精液で DNA メチル化プロファイルが違うことが明らかにされた (Verma et al., 2014)。そこで、我々はウシの精子核 DNA についても網羅的に DNA メチル化状態の評価および DMRs を探索する必要があると考えた。ゲノムワイドな DNA メチル化を解析する手法として、次世代シーケンサーを用いたメチル化 DNA 免疫沈降シーケンシング法 (MeDIP-Seq)、全ゲノムバイサルファイトシーケンシング法 (WGBS) があるが、これらの手法は分析コストが非常に高額であり、また家畜では基礎となる知見に乏しいため得られた膨大なデータから個々の遺伝子へのアプローチは極めて困難な状況であった。そこで、我々はサンプル間の網羅的な DMRs の探索手法として、ヒト用メチル化チップの利用に着目した。ヒトでは高密度 DNA メチル化解析用チップの開発により、遺伝子情報の明らかな 48 万箇所の CpG サイトのメチル化の状態を解析することが可能となり、精子においても不妊に関連する DMRs が明らかにされていた (Krausz et al., 2012)。ヒト用 DNA メチル化解析チップをマウスゲノムの分析に用いた場合、約 1 万箇所の CpG サイトが分析可能との報告もあった (Wong et al., 2013)。そこで我々は、ウシゲノムを用いた場合にヒト用メチル化チップで解析可能かどうかを調査したところ、約 5 万箇所の CpG サイトがメチル化評価へ利用できるとの結果が得られ、ウシサンプルの全体的なメチル化パターンの相違や DMRs の比較的安価な探索手法として、ヒト用メチル化解析チップが非常に有効であることを確認していた (Kobayashi & Takeda, 2016)。

### 2. 研究の目的

ウシ人工授精において精液性状検査による評価結果が良好でも受胎性の低い精子が存在している。ヒトでは不妊症や老化に関連した精子 DNA のメチル化異常が示されている。しかし、ウシでは受精能や受胎性に関連づけた精子核 DNA メチル化状態の網羅的かつ詳細なレベルでの研究が進んでいない。ヒト用メチル化解析チップを有効に利用することで、より安価に多数サンプル間の網羅的比較解析を行うことが可能となる。もし人工授精を経なくても受胎性を評価できる新たな評価指標が示されれば、種雄牛造成に係る経済的な効果は非常に高いと期待できる。本研究は、人工授精に供するウシ凍結精液のメチル化異常を未然に検出するために、ウシ精液の品質に影響する DMRs を明らかにし、最終的には PCR 法などを用い、安価で迅速かつ簡便に異常を検出できる手法を開発することを目的とする。そのために、

(1) ヒト高密度メチル化解析用チップを用いて凍結精液の採取月齢や体外受精後の胚発生率、人工授精後の受胎率の異なるウシ精子核 DNA メチル化状態を比較解析し、それらに關与する DMRs を検出する。

(2) 検出した DMRs について簡易評価法を確立し、雄牛の個体毎および凍結精液の採取ロット毎のメチル化状態の動態を評価し、その関連性を確認する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ウシ精子核 DNA の網羅的なメチル化状態の比較と可変部位の検出

人工授精 (AI) 後の受胎率や体外受精 (IVF) 後の胚発生率に差があるそれぞれ 2 頭ずつの凍結精液について、ヒト高密度メチル化解析用チップ (Human Methylation 450 BeadChip, イルミナ社, HM450) のデータを得ていた。しかし、HM450 が 85 万箇所の CpG 部位をターゲットとする改良型ヒト用 DNA メチル化解析用チップ (Infinium Methylation EPIC BeadChip, イルミナ社, EPIC) へバージョンアップしたことから、以降のサンプル解析は EPIC を用いて行った。

凍結融解精液をリン酸緩衝液 (D-PBS) にて洗浄後、遠心分離により分画した精子を解析に用

いた。DNA 抽出は、DNA 抽出キット (DNeasy Tissue & Blood Kit, キアゲン社) を用い、EPIC による分析を外部に依頼した。得られたデータから信頼性の指標である Pval 値および総蛍光強度により有効と判断した CpG 部位について試料間の比較解析を行い、メチル化率に差異のある CpG 部位を抽出しリストアップした。

#### 加齢に伴って変化する CpG 部位の検索

予備試験から検出した DMRs に加齢変化を伴うものが多くみられた。そこで茨城県肉用牛研究所で飼養している 1 頭の種雄牛から採取月齢の異なるロットの凍結精液について 20 カ月齢以下のグループ (14、19 カ月齢) と 50 カ月齢以上のグループ (54、162 カ月齢) に分けグループ間の比較解析を行った。

#### 人工授精後の受胎率に関連する CpG 部位の検索

岐阜県畜産研究所では凍結精液の採取ロットごとの精液性状および AI 後の受胎率データから雄牛 2 頭について AI 後の受胎率に差を見出ししていた。AI 後の受胎率の判明している精液サンプルとして、岐阜県畜産研究所、広島県畜産技術センター、鳥取県畜産試験場、および民間牧場から提供された黒毛和種雄牛由来の凍結精液を用いた。メチル化チップによる解析結果は毎年蓄積し、最終的に高受胎グループとして 50% 以上の 5 頭、低受胎グループとして 40% 未満の 6 頭についてグループ間比較解析を行った。

#### 体外受精後の胚発生率に関連する CpG 部位の検索

IVF 後の胚発生率の明らかな精液サンプルとして、農研機構畜産研究部門、茨城県肉用牛研究所、広島県畜産技術センター、鳥取県畜産試験場にて採取、凍結保存を行った精液を用いた。メチル化チップによる解析結果は毎年蓄積し、最終的に IVF 後の胚盤胞期胚形成率が 30% 以上を高いグループとして 4 検体、15% 未満を低いグループとして 4 検体のグループ間比較解析を行った。

## (2) ウシ凍結精液の DNA メチル化状態と体外受精胚発生率および受胎性への関連性の解明

### COBRA 法をもちいた DMRs の簡易メチル化率推定と関連性の検証

(1) でリストアップしたメチル化可変部位についてヒトプローブのウシゲノム配列に対する BLAST 検索によりヒト-ウシ間の塩基配列の相同性を確認した。ウシの塩基配列からメチル化可変部位をターゲットとしたプライマーを設計し、次に Combined Bisulfate Restriction Analysis (COBRA) 法により、メチル化状態が正しく反映されているかどうかの確認を行った。すなわち精液から抽出した DNA はバイサルファイト処理後、設計したプライマーによる PCR によりターゲット CpG を含む領域を増幅、ターゲット CpG 部位を切断する制限酵素による切断・非切断の違いからメチル化・非メチル化の割合を算出した。COBRA 法によりメチル化状態が反映されない領域についてはリストより削除した。COBRA 法で DMRs と確認できた領域の一部について、バイサルファイトシーケンスによる詳細なメチル化率の差異を明らかにした。

COBRA 法によるメチル化率の検出が可能となった DMRs について、マイクロアレイ解析に用いなかった検体を加え、加齢変化については 66 検体、AI 後の受胎率については 42 検体、IVF 後の胚発生率については 34 検体についてメチル化率との関連性を検証した。

### 個々の DMRs のメチル化率の相違が体外受精後の胚に反映されるかどうかの検証

採取月齢の異なる 4 ロットの精液 (19、28、54、162 ヶ月) を体外受精に用い、胚盤胞期胚形成率を調査すると同時に、胚盤胞期胚 1 個 1 個より DNA を抽出し、加齢変化を示す 9 箇所 DMRs のメチル化率の調査を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ウシ精子核 DNA の網羅的なメチル化状態の比較と可変部位の検出

ウシゲノムを用いた場合のヒト用メチル化解析チップ (HM450) で、約 5 万箇所の CpG 部位がメチル化評価へ利用できていたが (Kobayashi & Takeda, 2016) 凍結精液間で特定の CpG 部位のメチル化状態の違いを検出することに成功した (業績論文)。

加齢変化を示す CpG 部位を EPIC にて検索したところ、約 10 万箇所 (12.2%) の CpG 部位が利用可能だった。またそのうち  $t$  検定により月齢の高低グループ間に有意差があり ( $P < 0.01$ )、高低群のメチル化率に 0.2 以上差のあるものは 77 箇所検出された。またそのうち 1 箇所についてシーケンス解析を行ったところ、加齢による変化が確認された (業績論文)。

AI 後の高受胎率グループおよび低受胎率グループの黒毛和種雄牛の精子 DNA のメチル化率を比較解析した結果、 $t$  検定により高低群間に有意差がある ( $P < 0.01$ ) CpG 部位が 646 箇所 (図 1)、高低群のメチル化率に 0.2 以上差のある CpG 部位は 58 箇所検出された (業績学会発表)。

IVF 後の胚発生率について、 $t$  検定により高低群間に有意差があり ( $P < 0.01$ )、高低群のメチル化率に 0.2 以上差のある CpG 部位は 124 箇所検出された (業績学会発表)。

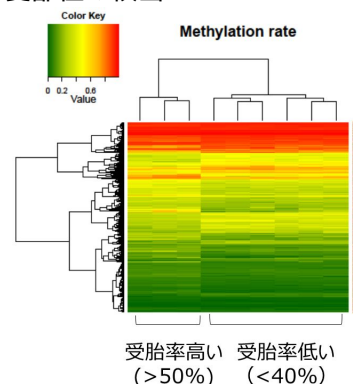


図 1. ヒト用メチル化解析チップによる受胎率の高低群間の精子 DNA メチル化率の比較解析結果 (ヒートマップ)。高低群間に有意差があるもの ( $P < 0.01$ ) が 646 箇所検出された。緑: 低メチル化、赤: 高メチル化。

以上の結果から、採取時期などの加齢に伴う変化や AI 後の受胎率、IVF 後の胚発生率でグループ分けした場合のメチル化プロファイルの差異が明らかとなった。

## (2) ウシ凍結精液の DNA メチル化状態と体外受精胚発生率および受胎性への関連性の解明

### COBRA 法をもちいた DMRs の簡易メチル化率推定と関連性の検証

メチル化チップの解析結果より抽出したターゲット CpG 部位を含む DMRs のうち、BLAST 検索によりウシ配列が特定できたものが 55 箇所、COBRA 法によるメチル化率の評価が可能だったものとして 9 箇所を特定した(業績論文)。COBRA 法によるメチル化率の推定により、種雄牛 35 頭の凍結精液 60 ロット以上を用いた解析が可能となり、これら 9 箇所の DMRs のメチル化率が加齢変化と相関の高いことが示された。また、3 箇所の DMRs を用いれば精液を採取した種雄牛の月齢推定が 80%程度の正確度で可能だった。同様に AI 後の受胎性に関連する指標となる可能性のある DMRs を 1 箇所(業績学会発表)、IVF 後の胚発生率に関連する指標となる可能性のある DMRs を 1 箇所(業績学会発表)特定した。受胎性推定を可能とするためには、今後さらに複数箇所の DMRs を特定する必要があると考えられる。今後、人工授精を経なくても受胎性を評価できる新たな評価指標としてメチル化異常のスクリーニングが可能となれば、種雄牛造成に係る経済的な効果は非常に高いと期待される。

### 個々の DMRs のメチル化率の相違が体外受精後の胚に反映されるかどうかの検証(業績論文)

同一種雄牛で採取月齢の異なる 4 ロットの凍結精液を用いた体外受精胚を作成したところ、胚盤胞期胚発生率に有意な差はみられなかった。また、1 個ずつの胚盤胞期胚から 9 箇所の DMRs についてメチル化率を評価したところ、7 箇所についてメチル化率が有意に低くなり、脱メチル化がおこったと示唆された( $P < 0.05$ )。3 箇所についてより詳細な解析を行ったところ、個々の胚のメチル化率は精子における加齢変化と関連性はみられず、これらの DMRs のメチル化率は受精後の脱メチル化によりリセットされうると考えられた(図 2)。また、多くの胚盤胞期胚は非常に低いメチル化率を示したが、いくつかの胚は高い値を示すなど個々の胚による差異が観察された。今後このような胚盤胞期胚でのメチル化率の違いと胚の正常性や受胎性との関連が示されれば、新たな胚の評価指標にもなりうると期待される。

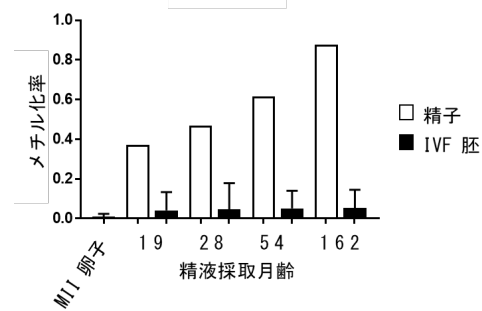


図 2.加齢変化を示すある DMR の COBRA 法によるメチル化率の解析。精子では採取雄牛の月齢が上がるに伴いメチル化率は上昇する(白)が、IVF 胚では低い値を示した(黒)。

## < 引用文献 >

- Kumiko Takeda, Kyoko Uchiyama, et al. Evaluation of sperm DNA damage in bulls by TUNEL assay as a parameter of semen quality. 2015, J Reprod Dev, 61(3):185-190.
- WS Ward, Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. 2010, Mol Hum Reprod, 16, 30-36.
- Rajender S1, Avery K, Agarwal A., Epigenetics, spermatogenesis and male infertility, 2011, Mutat Res, 727:62-71.
- Dada R, Kumar M, et al., Epigenetics and its role in male infertility, 2012, J Assist Reprod Genet, 29:213-223.
- Jenkins TG, Aston KI, et al., Age-associated sperm DNA methylation alterations: possible implications in offspring disease susceptibility. PLoS Genet 2014; 10: e1004458.
- Verma A., Rajput S, et al., Genome-wide profiling of sperm DNA methylation in relation to buffalo (Bubalus bubalis) bull fertility, 2014, Theriogenology, 82, 750-759.
- 金田正弘、エピジェネティクスとウシ精子 DNA のメチル化：獲得形質の遺伝は存在するか？、2014、日本胚移植学雑誌、36、141-147
- Krausz C., Sandoval J., et al, Novel Insights into DNA Methylation Features in Spermatozoa: Stability and Peculiarities, 2012, PLoS One 7, e44479.
- Wong NC, Ng J, et al., Exploring the utility of human DNA methylation arrays for profiling mouse genomic DNA, 2013, Genomics 102, 38-46.
- Eiji Kobayashi and Kumiko Takeda, A data filtering to utilizing Human Methylation arrays in genome-wide study of bovine DNA methylation, 2016, The Journal of Animal Genetics, 44, 45-52.

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 2 件)

Kumiko Takeda, Eiji Kobayashi, Kagetomo Nishino, Akira Imai, Hiromichi Adachi,

Yoichiro Hoshino, Satoshi Akagi, Masahiro Kaneda, Shinya Watanabe. Age-related changes in DNA methylation levels at CpG sites in bull spermatozoa and in vitro fertilization-derived blastocyst-stage embryos revealed by combined bisulfite restriction analysis, Journal of Reproduction and Development, 査読有, 印刷中  
<https://doi.org/10.1262/jrd.2018-146>

Kumiko Takeda, Eiji Kobayashi, Satoshi Akagi, Kagetomo Nishino, Masahiro Kaneda, Shinya Watanabe. Differentially methylated CpG sites in bull spermatozoa revealed by human DNA methylation arrays and bisulfite analysis. 2017, Journal of Reproduction and Development, 査読有, 63(3), 279-287, 2017.  
<https://doi.org/10.1262/jrd.2016-160>.

〔学会発表〕(計 8件)

武田 久美子, 小林 栄治, 今井 昭, 佐藤 伸哉, 安達 広通, 西野 景知, 岩尾 健, 金田 正弘, 渡邊 伸也, 体外受精胚発生率に関連する牛精子核 DNA のメチル化可変部位の探索, 日本畜産学会第 125 回大会, 217, 2019.

武田 久美子, 小林 栄治, 星野 洋一郎, 安達 広通, 今井 昭, 西野 景知, 岩尾 健, 金田 正弘, 渡邊 伸也, 体外受精後の胚における牛精子核 DNA メチル化可変部位のメチル化状態, 第 2 回日本胚移植技術研究会大会, 51, 2018.

武田 久美子, 小林 栄治, 星野 洋一郎, 安達 広通, 今井 昭, 西野 景知, 岩尾 健, 金田 正弘, 渡邊 伸也, 牛精子核 DNA のメチル化可変部位と凍結精液受胎率との関連性の検討, 日本畜産学会第 124 回大会, 210, 2018.

小林 栄治, 武田 久美子, 星野 洋一郎, 安達 広通, 今井 昭, 西野 景知, 岩尾 健, 金田 正弘, 渡邊 伸也, ヒトメチル化チップを用いたウシ精子 DNA における受胎率関連 CpG 部位の抽出, 日本畜産学会第 124 回大会, 210, 2018.

武田 久美子, 小林 栄治, 星野 洋一郎, 安達 広通, 今井 昭, 西野 景知, 岩尾 健, 金田 正弘, 渡邊 伸也, 人工授精後の受胎率に関連する牛精子核 DNA のメチル化可変部位の検出, 日本受精卵移植関連合同研究会京都大会, 2017.

Kumiko Takeda, Eiji Kobayashi, Satoshi Akagi, Masahiro Kaneda, Shinya Watanabe. Differentially methylated CpG sites in bull sperm DNA revealed by human DNA methylation arrays, The 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress, 323, 2017.

Kumiko Takeda, Eiji Kobayashi, Kagetomo Nishino, Akira Imai, Hiromichi Adachi, Yoichiro Hoshino, Masahiro Kaneda, Shinya Watanabe, Age-related changes in DNA methylation levels of CpG sites in bull spermatozoa and IVF embryos. Fourth World Congress of Reproductive Biology(WCRB2017), P2-39, 2016.

武田 久美子, 小林 栄治, 西野 景知, 今井 昭, 金田 正弘, 渡邊 伸也, 繁殖供用開始期の雄牛精子核 DNA の特定メチル化可変部位におけるメチル化状態の差異, 日本繁殖生物学会大会, The Journal of Reproduction and Development, 62, Suppl, j71, 2016.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 小林 栄治

ローマ字氏名: (KOBAYASHI, eiji)

所属研究機関名: 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

部局名: 畜産研究部門家畜育種繁殖研究領域

職名: ユニット長

研究者番号(8桁): 00186727

(2)研究協力者

研究協力者氏名：渡邊 伸也

ローマ字氏名：(WATANABE, shinya)

研究協力者氏名：星野 洋一郎

ローマ字氏名：(HOSHINO, yoichiro)

研究協力者氏名：西野 景知

ローマ字氏名：(NISHINO, kagetomo)

研究協力者氏名：今井 昭

ローマ字氏名：(IMAI, akira)

研究協力者氏名：安達 広通

ローマ字氏名：(ADACHI, hiromichi)

研究協力者氏名：岩尾 健

ローマ字氏名：(IWAO, ken)

研究協力者氏名：金田 正弘

ローマ字氏名：(KANEDA, masahiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。