

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02355

研究課題名(和文) ほ乳類の胚発生に不可欠な母性エピジェネティック制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of maternal-derived epigenetic modifications essential for mammalian development

研究代表者

尾畑 やよい(OBATA, Yayoi)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：70312907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)： 雌の生殖細胞である卵子は、遺伝情報のみならずエピジェネティック修飾などの遺伝外情報を胚に継承する役割を担う。卵子のエピジェネティック修飾の異常は胚性致死あるいは出生後の異常を引き起こすことから、卵子形成過程で正常なエピジェネティック修飾を獲得することは重要である。しかし、エピジェネティック修飾を触媒する酵素は多数存在し、卵母細胞において従来法で酵素群を多重欠損させることは容易でない。そこで、本研究では、ほ乳類の胚発生に不可欠な母性エピジェネティック制御機構の解明を最終目標とし、エピジェネティック修飾酵素遺伝子群の多重機能欠損法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

親は子に卵子や精子を介して遺伝子やエピジェネティック修飾と呼ばれる遺伝外情報を伝える。エピジェネティック修飾とは、メチル化など可逆的な化学反応で遺伝子を修飾する現象で、卵子や精子のエピジェネティック修飾の異常は、流産や出生後の疾患を引き起こす。そのため、精子や卵子が正常なエピジェネティック修飾を保持することは重要であるが、その機構は十分に理解されていない。その原因として、エピジェネティック修飾を担う酵素が多岐にわたり、多重遺伝子欠損マウスを作ることが困難なためである。本研究では、人工的に設計した小分子RNAによって、卵子で複数のエピジェネティック修飾酵素の機能を喪失させる方法を開発した。

研究成果の概要(英文)： Female germ cell, oocyte, is responsible for transmitting to the embryo not only genetic information but also epigenetic modification. Since lack of normal epigenetic modifications in the oocyte lead to embryonic lethality or postnatal disorders, it is essential for functional oocytes to establish epigenetic modifications during oocyte growth. However, there are many enzymes that catalyze epigenetic modifications and it is not easy to achieve multiple deletions of enzymes in oocytes by conventional knockout technology. In this study, we established a method for loss-of-function of multiple enzymes involved in epigenetic modification. This will help to elucidate the mechanisms underlying establishment of maternal epigenetic control mechanisms essential for mammalian embryogenesis.

研究分野：発生工学

キーワード：卵子 エピジェネティック修飾 miRNA

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞形成過程で確立するゲノムインプリンティングは、ほ乳類の生殖細胞が獲得すべき必須の機構であり、これを欠如した受精卵は着床直後に致死となる。DNA のメチル化はゲノムインプリンティングの根幹をなす分子機構である。新規 DNA メチル基転移酵素 DNMT3A およびその補酵素 DNMT3L の共発現は生殖細胞でのみ認められ、このうちのいずれかを欠損した卵子は、減数分裂や形態的な卵子形成には成功するものの、インプリント領域に DNA メチル化修飾が生じない。その結果、この卵子に由来する受精卵は着床後にインプリント遺伝子の発現異常をきたし致死となる。しかし、なぜ、どのようにインプリント領域に DNA メチル化修飾が生じるのかその詳細は不明なままである。

これまでの研究で、DNMT3L をインプリント領域にリクルートするためにはヒストン H3K4 の脱メチル化が必要であることが示唆されてきた。しかし、H3K4 の脱メチル化を担い、卵母細胞形成過程で発現している酵素は KDM1A や KDM1B の他にも多岐に及び、これらを同時に卵母細胞で多重欠損することは極めて困難である。このことは、ゲノミックインプリンティングのみならず、同じ機能を有する遺伝子がゲノム上に複数存在する場合の遺伝子機能の解明において、共通の問題点と言える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス卵母細胞形成過程において複数の遺伝子の機能を喪失するノックダウン法を確立すること、そしてヒストン H3K4 脱メチル化酵素をコードする遺伝子群を卵母細胞で同時にノックダウンさせた場合の表現型を解析することである。

3. 研究の方法

卵母細胞において多重に遺伝子の機能をノックダウンするために、標的遺伝子に対する人工マイクロ RNA (amiRNA) を設計し、卵母細胞特異的に発現する遺伝子 (ホスト遺伝子) の下流に amiRNA を挿入した。具体的には以下の通りである。

(1) GFP を指標とした卵母細胞特異的ノックダウン法の構築

GFP に対する amiRNA (既報と同じ配列) を 2 種類連結させた。これを挿入するホスト遺伝子として *Zp3* 遺伝子の intron 5 および intron 6 内の 3 sites を選出した。ホスト遺伝子の 5' 端相同領域および 3' 相同領域をそれぞれ amiRNA 配列に連結させた (ドナー DNA)。GFP を恒常的に発現するトランスジェニックマウス (GFP マウス) より受精卵を採取し、この受精卵に、*Zp3* 遺伝子の挿入 site に対するガイド RNA、一本鎖にしたドナー DNA および Cas9 タンパクをそれぞれ導入し、これを胚移植してノックインマウスを得た。ドナー DNA と GFP の両方の外来遺伝子を持つマウスを選別し、C57BL/6N マウスと戻し交配して得られたマウスを解析に用いた。

GFP の卵母細胞特異的ノックダウン効果を検証するために、種々の成長ステージの卵母細胞を採取した。また、得られた卵母細胞において、GFP 輝度の定量、amiRNA の定量、ホスト遺伝子 *Zp3* の定量、透明帯の厚さの計測、および得られたマウスの繁殖試験を行った。

(2) 内在性遺伝子 *Dnmt3L* の卵母細胞特異的ノックダウン効果の検証

amiRNA を 2 つのアルゴリズムで 2 種類ずつ設計し 2 種類を連結させた。上記と同様にドナー DNA を作成し、C57BL/6N より得た受精卵に *Zp3* 遺伝子に対するガイド RNA、一本鎖にしたドナー DNA および Cas9 タンパクをそれぞれ導入し、ノックインマウスを得た。ドナー DNA を持つマウスを選別し、C57BL/6N マウスと戻し交配して得られたマウスを解析に用いた。*Dnmt3L* のノックダウン効果は、DNMT3L に対する抗体を用いて免疫染色により評価した。

(3) H3K4 の脱メチル化酵素の卵母細胞特異的ノックダウンの影響

H3K4 の脱メチル化酵素をコードする *Kdm1a* および *Kdm1b*、並びに脱メチル酵素のモチーフを持つ機能未知の 3 遺伝子に対してそれぞれ 2 種の amiRNA をデザインし連結させた。ホスト遺伝子として *Stella* 遺伝子の intron 1 を選出した。また、amiRNA の発現を可視化するために *Stella* 遺伝子の exon 2 にインフレームで mCherry 遺伝子を挿入した。H3K4 脱メチル化酵素のノックダウン効果は、ES 細胞と卵母細胞で検証した。*Kdm1a* および *Kdm1b*、並びに脱メチル酵素のモチーフを持つ機能未知の 3 遺伝子の mRNA を定量するとともに、H3K4me1、H3K4me2 および H3K4me3 抗体による免疫染色を実施した。

4. 研究成果

(1) GFP を指標とした卵母細胞特異的ノックダウン法の構築

GFP に対する amiRNA は *Zp3* 遺伝子の intron 内に挿入され、いずれの site でもノックインマウスを得ることができた。得られたノックインマウスの卵巣から卵母細胞を採取し、GFP の輝度を解析した結果、卵母細胞の周囲に存在する卵丘細胞やその他の体細胞では強い GFP シグナルが検出されたのに対し、十分成長した卵母細胞では、野生型マウスの卵母細胞と同様に GFP はほとんど検出されなかった。一方、ノックインマウスの非成長期卵母細胞では、GFP マウスの非成長期卵母細胞と同レベルで GFP が検出され、GFP のノックダウン効果は認められなかったが、

成長期以降、GFP の輝度は半減以下にまで喪失した。次いで、amiRNA のホスト遺伝子である *Zp3* を定量解析した結果、非成長期卵母細胞、成長期卵母細胞および十分成長した卵母細胞のいずれにおいてもハウスキーピング遺伝子 *Tbp* より顕著に高発現していた。*Zp3* 遺伝子の発現は、成長期卵母細胞で非成長期卵母のおよそ 40 倍高発現していた。*Zp3* 遺伝子の発現量は amiRNA がノックインされているか否かによらず等しかった。そのため、GFP に対する amiRNA の発現もホスト遺伝子の発現動態と連動する可能性が示唆された。そこで、ホスト遺伝子から成熟した amiRNA が発現しているかを検証するため、連結した 2 つの amiRNA それぞれの定量 PCR を行った。その結果、ホスト遺伝子の発現と同様にいずれの amiRNA とも成長期卵母細胞および十分成長した卵母細胞では、非成長期卵母細胞の 10 倍以上の発現増加が認められた。また、ノックインマウスの卵母細胞の透明帯の厚さは、GFP マウスの卵母細胞の透明帯の厚さと比較して遜色なく、排卵数、受精率、受精後の発生能および妊孕性についても差が認められなかった。このノックインされたアレルは、雄の生殖系列を通して安定的に継承された (*J Reprod Dev*, Sasaki et al., 2021)。

以上の結果から複数の amiRNA を連結して特定の遺伝子を卵母細胞特異的にノックダウンする手法の基盤が確立できた。

(2) 内在性遺伝子 *Dnmt3L* の卵母細胞特異的ノックダウン効果の検証

ノックダウンの標的遺伝子として内在性の *Dnmt3L* に対する amiRNA を 2 種のアルゴリズムで設計した。これらの amiRNA を発現ベクターのイントロンに導入し、ES 細胞にトランスフェクションした。その結果、一方のアルゴリズムで設計したもののみ *Dnmt3L* の発現低下が認められた。そこで、*Dnmt3L* に対して有効なノックダウン効果を示した amiRNA を 2 つ連結し、*Zp3* 遺伝子のイントロン内にノックインしたマウスを得た。ノックインのためのゲノム編集は、C57BL/6N マウスの受精卵を用いて行った。ノックインマウスから十分成長した卵母細胞を採取し、DNMT3L 抗体による免疫染色を行った。野生型マウスの卵母細胞では DNMT3L が核に局在していたが、ノックインマウスの卵母細胞では、DNMT3L のシグナルは検出されなかった (日本分子生物学会、日本繁殖生物学会、2019 年)。

以上の結果から、amiRNA によるノックダウンは内在性遺伝子に対しても有効なことがわかった。

(3) H3K4 の脱メチル化酵素の卵母細胞特異的多重ノックダウンの影響

H3K4 の脱メチル化酵素をコードする *Kdm1a* および *Kdm1b*、並びに脱メチル酵素のモチーフを持つ機能未知の 3 遺伝子に対してそれぞれ 2 種の amiRNA をデザインし *Stella* 遺伝子の intron 1 に挿入しさらに下流に mCherry 遺伝子を挿入した。mCherry 陽性細胞を分取し、標的遺伝子の mRNA 量を RT-PCR で解析した結果、単一標的遺伝子に対する amiRNA を発現させた場合、加えて、複数の標的遺伝子に対する amiRNA を発現させた場合、いずれの場合も標的遺伝子の発現量は 40 - 20% 未満に低下し、両者の間に差はなかった。そのため、少なくとも ES 細胞においては単一遺伝子と同レベルで多重ノックダウンが可能と考えた。そこで、H3K4me1、H3K4me2 および H3K4me3 に対する免疫染色を行った結果、mCherry 陽性の ES 細胞では、mCherry 陰性の ES 細胞よりも H3K4 のメチル化抗体で高いレベルのシグナルが検出された。特に H3K4me3 抗体ではシグナルの上昇が顕著であった。このことから、ホスト遺伝子に導入された mCherry によって amiRNA の発現がモニターできること、設計した amiRNA によってヒストン H3K4 の脱メチル化が阻害されていることが示された。次にこれらの amiRNA が導入されたマウス卵母細胞を解析した。これらの卵母細胞の多くは mCherry を高発現しており、H3K4 脱メチル化酵素の amiRNA が発現していても卵母細胞の成長には影響が生じないことが明らかとなった。次に、得られた卵母細胞で H3K4me3 に対する免疫染色を行った。その結果、5 遺伝子に対する amiRNA を導入した場合、機能未知の 3 遺伝子に対する amiRNA のみを導入した場合、いずれの場合も野生型マウスの卵母細胞と比較して、H3K4me3 のシグナルが高くなり、脱メチル化酵素の機能がノックダウンされたことが示された。今後は、この実験系を用いて H3K4 の脱メチル化が、インプリント領域やゲノム全体のエピジェネティック修飾に及ぼす影響を解析していく。

エピジェネティック関連因子は個体発生にも影響を及ぼすことから、ホモ型欠損胚が、卵母細胞形成前に致死になってしまうことが多い。そのため、卵母細胞におけるエピジェネティック関連因子の機能を解析するためには、コンディショナルノックアウトの手法がとられてきた。しかし、コンディショナルノックアウト雌マウスが得られる確率は、flox アレルと Cre アレルを持つ始祖マウスから起算すると 6.25% と非常に低い。多重欠損を試みた場合、この確率はさらに小さくなり、研究の進展を妨げる大きな要因となりえる。本研究では、amiRNA を最大 10 個連結し、5 遺伝子を標的とした多重ノックダウンが可能であることが示された。また amiRNA のノックイン雄マウスと野生型マウスの交配でノックイン雌マウス(多重ノックダウン雌マウス)が得られる確率は 25% と従来方より格段に高い。エピジェネティック関連因子にとどまらず、卵子形成過程における新たな遺伝子機能解析ツールとして提案したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 諸白家奈子、尾畑やよい	4. 巻 97
2. 論文標題 哺乳類の卵子を体外で産生する	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sasaki K, Hara S, Yamakami R, Sato Y, Hasegawa S, Kono T, Morohaku K, Obata Y.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Ectopic expression of DNA methyltransferases DNMT3A2 and DNMT3L leads to aberrant hypermethylation and postnatal lethality in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Reprod Dev	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mrd.23137.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hattori H, Hiura H, Kitamura A, Miyauchi N, Kobayashi N, Takahashi S, Okae H, Kyono K, Kagami M, Ogata T, Arima T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Association of four imprinting disorders and ART	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Epigenetics	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13148-019-0623-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Cui D, Mesaros A, Burdeos G, Voigt I, Giavalisco P, Hinze Y, Purrio M, Neumaier B, Drzezga A, Obata Y, Endepols H, Xu X.	4. 巻 21
2. 論文標題 Dnmt3a2/Dnmt3L overexpression in the dopaminergic system of mice increases exercise behavior through signaling changes in the hypothalamus.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 6297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21176297.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ochiai K, Yamaoka M, Swaminathan A, Shima H, Hiura H, Matsumoto M, Kurotaki D, Nakabayashi J, Funayama R, Nakayama K, Arima T, Ikawa T, Tamura T, Sciammas R, Bouvet P, Kundu TK, Igarashi K.	4. 巻 33
2. 論文標題 Chromatin Protein PC4 Orchestrates B Cell Differentiation by Collaborating with IKAROS and IRF4.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 108517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108517.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanimoto R, Sekii K, Morohaku K, Li J, Pepin D, Obata Y.	4. 巻 148
2. 論文標題 Blocking estrogen-induced AMH expression is crucial for normal follicle formation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev197459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.197459.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sasaki K, Takaoka S, Obata Y.	4. 巻 67
2. 論文標題 Oocyte-specific gene knockdown by intronic artificial microRNAs driven by Zp3 transcription in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Reprod Dev	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-146.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤義治、坂下陽彦、神田暁史、河野友宏、外丸祐介、尾畑やよい
2. 発表標題 Y染色体の存在がマウス雌性生殖系列に及ぼす影響
3. 学会等名 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村寛、池田晋也、荒井美希、吉田幸太郎、尾畑やよい
2. 発表標題 マウス胎仔卵巣培養のための完全合成培地の構築にむけて
3. 学会等名 日本卵子学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木恵亮、尾畑やよい
2. 発表標題 卵母細胞特異的遺伝子ノックダウンシステムの開発
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林記緒、岡江寛明、高橋聡太、樋浦仁、有馬隆博
2. 発表標題 ヒト胚性幹細胞の栄養膜幹細胞への分化転換
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村寛、池田晋也、尾畑やよい
2. 発表標題 合成培地におけるin vitroマウス卵子形成
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木恵亮、高岡沙綾、尾畑やよい
2. 発表標題 卵母細胞特異的ノックダウンシステムの確立
3. 学会等名 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田晋也、田中康貴、大谷麗子、飯田有紀、樋浦仁、外丸祐介、尾畑やよい、河野友宏
2. 発表標題 レトロトランスポソンの脱抑制がマウス前精原細胞の遺伝子発現制御に与える影響
3. 学会等名 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部裕充、樋浦仁、北村茜、宮内尚子、小林記緒、高橋聡太、岡江寛明、京野廣一、鏡雅代、緒方勤、有馬隆博
2. 発表標題 インプリンティング疾患と生殖補助医療のリスク要因
3. 学会等名 日本生殖発生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高島友弥、横田将、樋浦仁、小林久人、尾畑やよい、小川英彦、河野友宏
2. 発表標題 マウス始原生殖細胞で発現するsmall RNA
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤丸翼、谷本連、小林久人、河野友宏、尾畑やよい
2. 発表標題 体外成長卵母細胞から作出したマウス2細胞期胚のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 尾畑やよい(日本繁殖生物学会編)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 インターズー	5. 総ページ数 146-161/313
3. 書名 繁殖生物学 改訂版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京農業大学HP https://www.nodai.ac.jp/academics/life_sci/bio/lab/505/</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	樋浦 仁 (HIURA Hitoshi) (70451523)	東京農業大学・生命科学部・准教授 (32658)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Yale University School of Medicine			
ドイツ	Max Planck Institute			
中国	Northwest Normal University			