

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06368

研究課題名（和文）ウシにおける新たな雄性発現遺伝子の同定

研究課題名（英文）Identification of novel bovine paternally expressed imprinted genes

研究代表者

金田 正弘（Kaneda, Masahiro）

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・准教授

研究者番号：80469840

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ウシにおける新たな雄性発現遺伝子の同定を目指して、ウシ単為発生胚から樹立した線維芽細胞と、正常胚（オス）から樹立した線維芽細胞の遺伝子発現をマイクロアレイを用いて解析した。その結果から得られた候補遺伝子の発現解析・DNAメチル化の解析を行った。また、ウシにおける発現制御機構が明らかになっていないXIST遺伝子（X染色体不活化に關与するnon-coding RNA）のDNAメチル化による発現制御機構を明らかにするため、DNAメチル化阻害によりウシのオス体細胞でXIST遺伝子の発現が誘導されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでインプリント遺伝子やXIST遺伝子の研究は、もっぱらマウスを用いて行われてきた。多くの成果が得られたものの、ヒトや家畜などの研究からは、これらの遺伝子発現やその制御機構については、多くの動物種差が存在することが分かってきた。今回のウシを用いた研究からは、マウスと同様な遺伝子発現制御機構（DNAメチル化）とともに、それ以外の遺伝子発現制御機構が關与していることが示唆されたことから、進化的側面から非常に興味深い知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：To identify new paternally expressed genes in bovine, we analyzed gene expression in fibroblasts established from bovine parthenogenic embryos and in fibroblasts established from normal embryos (males) using DNA microarrays. Expression analysis and DNA methylation analysis of candidate genes obtained from the results were conducted. In addition, to clarify the regulatory mechanism of the XIST gene (non-coding RNA involved in X chromosome inactivation) by DNA methylation changes, whose expression has not been clarified in bovine, I found that the expression of the XIST gene was induced in male bovine somatic cells by DNA methylation inhibition. I found that DNA methylation inhibition induced the expression of XIST gene in bovine male somatic cells.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：DNAメチル化 ウシ 単為発生胚 インプリント遺伝子 XIST遺伝子 X染色体不活化

1. 研究開始当初の背景

ゲノムインプリンティングとは、父母から受け継がれた一対の遺伝子のうち、どちらが片方のみが特異的に発現するという哺乳類に特有の現象である。インプリンティングを受ける遺伝子（インプリント遺伝子）はヒトやマウスで数百同定されており、胎仔や胎盤の成長、代謝機能、母性行動など多くの役割を持つことがこれまでの研究から知られている。しかし、ウシなどの家畜では数十程度しか同定されておらず、それらも主にヒト・マウスの相同遺伝子の探索に限られていた。

また、インプリント遺伝子と同様にエピジェネティックな機構により制御されることが知られている *XIST* 遺伝子 (X 染色体不活化に関与する non-coding RNA) の発現制御機構については、主にマウスを用いた研究が行われていたが、これまでの研究から動物種差がかなり大きいことが分かっている。また、ウシにおける研究はこれまで初期胚を用いた研究が主であり、体細胞を用いた研究はほとんどされていないため、その発現制御機構については未解明の部分が多い。

2. 研究の目的

本研究では、1) ウシで新たな父性発現インプリント遺伝子を同定し、またその制御機構を明らかにすることを目的として研究を行った。あわせて、ウシで明らかになっていなかった 2) *XIST* 遺伝子の DNA メチル化による発現制御機構を解明することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) ウシで新たな父性発現インプリント遺伝子を同定し、それらの発現制御機構を明らかにする

マウスで行われた単為発生胚（母性ゲノムのみを持つ）と正常発生胚（母性・父性ゲノムを両方持つ）の遺伝子発現をゲノムワイドに比較検討するために、マイクロアレイを用いた解析をすでに行っている (Kaneda *et al*, Journal of Reproduction and Development, 2017)。本研究ではその結果から、単為発生胚由来線維芽細胞では発現せず、正常胚由来線維芽細胞でのみ発現する遺伝子を父性インプリント候補遺伝子として抽出した。これらの遺伝子について更なる発現解析を行うとともに、ウシ各種臓器での発現解析、SNP 解析、さらに DNA メチル化解析を行った。

(2) *XIST* 遺伝子の DNA メチル化による発現制御機構を明らかにする

XIST 遺伝子はメスでのみ発現することが知られており、オスの細胞では *XIST* 遺伝子プロモーター領域に存在する CpG アイランドが高度にメチル化されており、発現が抑制されていることがマウスの研究から明らかになっている。そこで、DNA メチル化による *XIST* 遺伝子の発現制御機構を明らかにするために、オスのウシ細胞株に DNA メチル化阻害剤 5-aza-2-deoxycytidine (以下 5-aza-dC) を添加し、*XIST* 遺伝子の発現解析、DNA メチル化解析、さらに X 染色体上に存在する複数の遺伝子についての発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) ウシで新たな父性発現インプリント遺伝子を同定し、それらの発現制御機構を明らかにする

マイクロアレイの結果から、5 遺伝子 (*SPARCL1*, *KRT8*, *CLDN1*, *UPK1B*, *LPL*) についてプライマーを作成し、単為発生胚由来線維芽細胞および正常胚由来線維芽細胞での発現を RT-PCR 法により解析した。その結果、*CLDN1* 遺伝子以外は正常胚由来線維芽細胞でのみ発現していた。これらの発現を種々のウシ臓器で確認したところ、多くの臓器で遺伝子発現が確認できたものの、配列解析から SNP を見つけることはできなかった。

また、これらの遺伝子の DNA メチル化による発現制御機構を明らかにするために、ウシ腎由来細胞株 (MDBK および CKT1) に DNA メチル化阻害剤である 5-aza-dC を 0, 1, 5, 10 μ M の濃度で添加し、4 日間培養した。5-aza-dC 処理により、容量依存的に細胞増殖阻害が認められた。これらの細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を行ったところ、*CLDN1* 遺伝子のみ容量依存的な発現上昇が認められたことから、この遺伝子発現における DNA メチル化の関与が示唆されたものの、他の遺伝子については DNA メチル化の関与を明らかにすることはできなかった。

(2) *XIST* 遺伝子の DNA メチル化による発現制御機構を明らかにする

オスのウシ腎由来細胞株 (MDBK および CKT1) に DNA メチル化阻害剤である 5-aza-dC を 0, 1

5, 10 μM の濃度で添加し、4 日間培養した。その結果、MDBK 細胞では *XIST* 遺伝子の発現が 1 μM 添加群から 10 μM 添加群まで観察されたものの、バイサルファイトシーケンス法による DNA メチル化レベルの低下はわずか (75% 69%) だった。また、X 染色体上に存在する遺伝子 (*PGK1*, *ZFX*, *G6PD*) の発現に変化は見られなかったことから、X 染色体不活化は起こっていないと判断した。一方、CKT1 細胞では全ての 5-aza-dC 添加群で *XIST* 遺伝子の発現は観察されなかった。また、DNA メチル化の程度にも変化は無かった。これらの結果は、DNA メチル化を阻害したオスのウシ体細胞では *XIST* 遺伝子の発現が誘導されるものの、それだけでは X 染色体不活化を引き起こすには不十分であることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 TAKEDA Kumiko, KOBAYASHI Eiji, OGATA Kazuko, IMAI Akira, SATO Shinya, ADACHI Hiromichi, HOSHINO Yoichiro, NISHINO Kagetomo, INOUE Masahiro, KANEDA Masahiro, WATANABE Shinya	4. 巻 67
2. 論文標題 Differentially methylated CpG sites related to fertility in Japanese Black bull spermatozoa: epigenetic biomarker candidates to predict sire conception rate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 99 ~ 107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Elbadawy Mohamed, Yamanaka Megumi, Goto Yuta, Hayashi Kimika, Tsunedomi Ryouichi, Hazama Shoichi, Nagano Hiroaki, Yoshida Toshinori, Shibutani Makoto, Ichikawa Ryo, Nakahara Junta, Omatsu Tsutomu, Mizutani Tetsuya, Katayama Yukie, Shinohara Yuta, Abugomaa Amira, Kaneda Masahiro, Yamawaki Hideyuki, Usui Tatsuya, Sasaki Kazuaki	4. 巻 237
2. 論文標題 Efficacy of primary liver organoid culture from different stages of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 119823 ~ 119823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2020.119823	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 TAKEDA Kumiko, KOBAYASHI Eiji, NISHINO Kagetomo, IMAI Akira, ADACHI Hiromichi, HOSHINO Yoichiro, IWAO Ken, AKAGI Satoshi, KANEDA Masahiro, WATANABE Shinya	4. 巻 65
2. 論文標題 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	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 305 ~ 312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-146	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Srirattana Kanokwan, Kaneda Masahiro, Parnpai Rangsun	4. 巻 23
2. 論文標題 Strategies to Improve the Efficiency of Somatic Cell Nuclear Transfer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1969 ~ 1969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23041969	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金田正弘, 河原知世
2. 発表標題 体細胞クローン牛各種臓器におけるXIST遺伝子のDNAメチル解析
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武田 久美子、小林 栄治、緒方 和子、今井 昭、佐藤 伸哉、木村 和輝、安達 広通、井上 真寛、金田 正弘、渡邊 伸也
2. 発表標題 黒毛和種雄牛の人工授精後の受胎性指標とする精子核DNAメチル化可変 部位追加による評価精度の向上
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金田正弘、河原知世
2. 発表標題 ウシXIST遺伝子のDNAメチル化による発現制御機構
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------