

平成 22 年 6 月 25 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790270

研究課題名（和文） 卵子・胎盤発生におけるエピゲノム及び small RNA 制御機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of control mechanism for epigenomes and small RNA expressions during oogenesis and placentation.

研究代表者

久須美 真紀（KUSUMI MAKI）

国立成育医療センター（研究所）・周産期病態研究部・共同研究員

研究者番号：70470002

研究成果の概要（和文）：DNA 配列を変化することなく遺伝子発現制御を行う機構として、DNA メチル化を主体とするエピゲノム及び small RNA の調節機構に着目して、マウス卵子及び TS 細胞（胎盤の幹細胞）を解析した。卵子では、老化でインプリンティング（エピゲノム機構のひとつ）の破たんは認めないこと、受精後の分裂に必須である miRNA は老化で発現が低下し、卵子成熟過程で発現する相補的に作用する一群の miRNA クラスターが存在することを明らかにした。TS 細胞の small RNA について大規模シーケンスを行い、その解析については現在進行中である。

研究成果の概要（英文）：We analyzed epigenome or small RNA in oocytes and trophoblast stem cells. During aging, imprinting was not aberrant in mouse oocytes. Maternal inherited microRNAs (miRNAs) in mouse oocytes are essential for early embryogenesis before zygotic expression after fertilization. Among miRNAs expressed in oocytes, the expression patterns are mainly decreasing in aged oocytes. Second, we focused oocyte growing which is the stage to establish DNA methylation with imprinted genes. During oocyte growing, miR-290 members were identified as a miRNA cluster only expressed in growing oocytes. Sequencing of small RNA in TS cells was finished and has been analyzed by bioinformatics technique.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2009 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：エピジェネティクス、不妊症、卵子、small RNA、胎盤

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の配偶子は、塩基配列に記された遺伝

情報に加え、特定領域の DNA メチル化によるゲノムインプリンティング等のエピジェ

ネティックな情報を子孫へ伝達する。エピジェネティックなゲノム修飾(エピゲノム)は個体発生と生命維持に必須であると共に、胚発生・配偶子形成過程でゲノムワイドに変化することで、発生と分化における組織特異性や多様性を生み出す。我々はこれまでに、DNAメチル化酵素関連因子 **Dnmt3L** を中心としたエピゲノム制御機構研究を通じ、DNAメチル化酵素ファミリー間の機能的相互作用とそれらのインプリンティングならびにトランスポゾン不活性化における役割を明らかにした。その一環として、母性インプリンティングの消失は胚体外組織の分化異常を誘起し、結果として流産に至ることを明らかにしている (Hata et al., Development 2002)。一方、近年新しい遺伝子発現制御機構として、哺乳類細胞の内在性機能性 **small RNA** の存在が明らかとなり、mi(micro)RNAは哺乳類でも発生に必須であること、卵子や精母細胞で新たに発見された small RNA (siRNA, piRNA) がトランスポゾンの DNA メチル化に関与すること、などが報告されており、エピゲノム制御機構の理解に新たな展開が期待された。

卵細胞は出生前に第一減数分裂前期まで進んで停止し、排卵前に再び減数分裂を開始する。ヒト卵細胞の場合、減数分裂停止状態は数十年間に及び、加齢に伴って機能劣化が生じる。マウスの卵子では、出生後の減数分裂休止期間に卵成熟が起こり、その間にインプリンティングを獲得した成熟卵が適切なタイミングで減数分裂を再開する。加齢卵子の mRNA プロファイルでは **Dnmt3L** など DMR メチル化獲得に関わる因子の発現が低下していることから、加齢に伴いインプリンティングの獲得に破綻が生じている可能性が示唆されていた。また、卵子はいわゆる **maternal factor** として豊富な mRNA を貯蔵しており、その維持・翻訳抑制に RNA 結合蛋白質や **miRNA** が関与すると予想されていたが、実際に卵子に貯蔵された **miRNA** の継承が初期発生に必須であることが示された (Tang et al., Genes Dev. 2007)。一方、分子機序は不明だが、若年者から提供された健常卵細胞質を高齢不妊症患者の卵子に注入すると妊娠成功率が回復することが示された

(Lanzendorf et al., Fertil Steril. 1999)。さらに体細胞クローンのエピゲノム解析により、除核した成熟卵子に移植された体細胞核の全ゲノム領域でエピゲノム再編成が起こることが示されている。これらの結果から、健常卵子には分化全能性再獲得のための脱分化機構が存在すると考えられる。

哺乳類の胚体外組織は胚体組織とは異なるエピゲノム再編成を受け、胎盤はゲノム全体が低 DNA メチル化状態にあり、特殊なエピゲノム制御下におかれていると考えられて

いる。ヒト胎盤の形態形成にはレトロウイルス由来遺伝子シンシチン(*syncytin*)が関与していると予想され (Sha Mi et al, Nature, 2000)、マウスでもレトロウイルス由来遺伝子 *Peg10* の関与が示されている (Ishino et al, NatGenet, 2006)。胎盤以外ではこのような外来性配列はメチル化により強く抑制されている事実から、胎盤の特殊な低メチル化環境下で、シンシチンや *Peg10* のような胎盤発生に必須のレトロウイルス由来遺伝子の転写活性化が許容されると同時に、その他の多数のレトロウイルス由来配列は、small RNA のような分子機構によって抑制されている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

(1) 新たな卵子加齢変化因子の同定

- ① 老化卵子核の DNA メチル化インプリントをマーカーに、加齢変化をエピゲノムの観点から評価する。
- ② 加齢に伴い存在量の変化する卵子 **miRNA** を同定し、生殖細胞における生理的な意義、DNA メチル化や貯蔵 mRNA の維持に関わる機構を明らかにする。

加齢に伴い卵子に蓄積する有害要因を、エピゲノムおよび **small RNA** による遺伝子発現制御の観点から検討し、受精後の正常な胚発生と卵子エピゲノム情報との関係を明らかにすることを旨とする。以上より、卵細胞機能の質的評価とその分子機構を理解することを目指す。

(2) 新たな卵子成熟機構の解明

マウス卵子ではサイズ増大に伴い、インプリンティングが獲得されることが分かっている。卵子サイズの増大に伴って起こる卵子成熟過程における **miRNA** の発現を解析し、インプリンティング獲得に関わる因子の考察を行う。

(3) 胎盤形成と small RNA

栄養膜幹細胞(TS細胞)より胎盤特異的 **small RNA** ライブラリーを作製・解析する。

発生初期の **trophectoderm** を大量かつ高精製度に回収する事は困難であるため、未分化な **torrophectoderm** を反映している絨毛栄養膜幹細胞 (TS 細胞) を利用する。胚体組織と異なり低メチル化状態を維持する胎盤は、分化に必要なレトロウイルス由来遺伝子の発現を許容すると同時に、**small RNA** などの発現による胎盤特異的な発現制御が関与している可能性が考えられる。

3. 研究の方法

(1) 卵子の加齢変化

- ① 加齢に伴うエピゲノム状態変化のスクリーニング及びエピゲノム異常の解析
生理的機能や分子メカニズムの詳細が最も

解明されているインプリンティング遺伝子の DMR (differentiated methylated region ; 父母由来でメチル化状態の異なる領域) のメチル化状態の変化をモデル系に、加齢に伴うエピゲノム異常のスクリーニングを行う。加齢マウス (43 週齢±2 週) と若年マウス (6 週齢±2 週) を用いてスクリーニングする。成熟卵子数百個からゲノム DNA を回収する。DMR を含め、DNA メチル化の詳細が解析されているゲノム領域 (インプリント遺伝子、反復配列) の DNA メチル化の定量的解析を行う。メチル化状態の解析には bisulfite PCR、COBRA、pyrosequencing を用いる。若年マウス・加齢マウスを正常オスと交配させて blastocyst を回収し、着床前初期胚まで遺残しうる異常エピゲノム修飾領域を同定する。

② 老化卵子・卵子成熟における miRNA 量変化の解析

老化及び成熟及び未成熟卵子より回収した RNA 分画より、micro array を用いて、miRNA 発現量の変化を解析する。老化及び卵成熟過程で発現量の変化が同定された miRNA について、real-time RT-PCR を用いて確認する。

(2) 胎盤形成と small RNA

TS 細胞特異的な small RNA の同定
未分化な胚体外組織を反映している栄養膜幹細胞 (TS 細胞) より small RNA を 20-40mer の範囲を gel purify にて抽出、濃縮し、リンカーをつけた small RNA をベクターに導入し、TS 細胞発現 small RNA ライブラリーを作成し、網羅的に配列を同定する。得られた配列情報を元に、bioinformatics な手法を用い、標的となる遺伝子、機能を推定する。

4. 研究成果

(1) エピゲノム異常

加齢に伴う卵細胞核のエピゲノム状態変化のスクリーニングを行った。10ヶ所のインプリンティング遺伝子の DMR (Igf2r, Zac1, Peg1, Lit1, Snrpn, Meg1, Gnasxl, Peg10, Peg3, H19)、3ヶ所の反復配列 (IAP LTR, Line1-5) について加齢マウス (43 週齢±2 週) と若年マウス (6 週齢±2 週) の卵子ゲノムを用いて bisulfite sequence を行った。結果、Lit1 において、老化でメチル化が 43.1% (コントロールは 95.9%) と低下していたため、COBRA 解析, pyrosequencing を行ったが、やや老化でメチル化率が低かったが、有意な差は見いだせなかった。

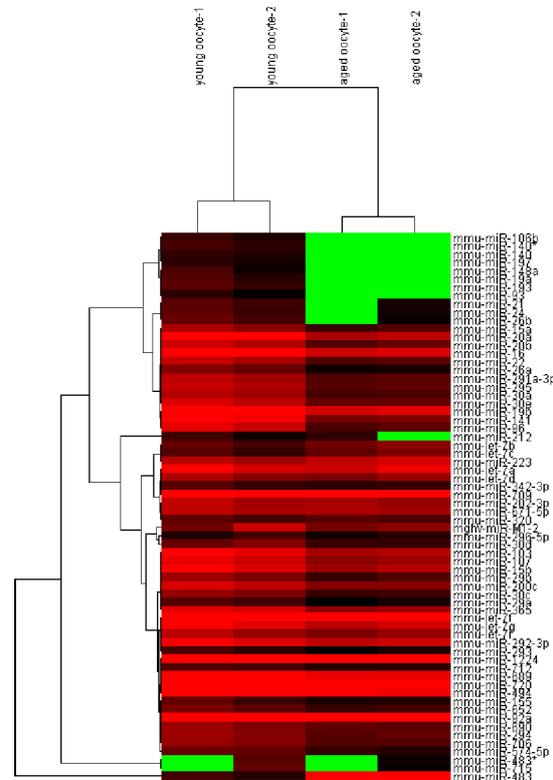
Lit1 のメチル化は老化で低下する可能性は否定できないが、加齢による重大なエピゲノム異常の可能性を示唆する結果は得られなかった。

DNA のメチル化機構は老化過程でもかなり安定していると結論でき、その安定感を利用した遺伝子発現操作の今後の可能性を支持す

るものである。

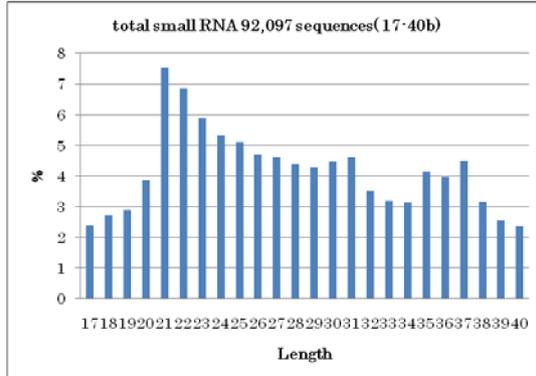
(2) 老化卵子・成熟卵子・未成熟卵子における miRNA 量の解析

加齢マウスと若年マウスの卵子の total RNA を用い、miRNA micro-array による解析を行った。



膜幹細胞(TS細胞)より small RNA を抽出、濃縮し、リンカーをつけた small RNA をベクターに導入し、TS細胞発現 small RNA ライブラリーを作成し、sequence を行い、網羅的に配列を同定した。そのうえで small RNA の働きを検討するため、卵子や精子などのライブラリーを参考に、クラスター解析を行っている。他のデータベースと比較・検討中である。

部・室長
研究者番号：



Small RNA 分子によるゲノム機能制御は、原始的な生物にも進化的に保存されたシステムであり、ウイルスなどの外敵からの保守のほか、内在性 RNA の制御、発生・分化に関わることが分かってきた。胚体外組織は低メチル化状態を維持し、いくつかのレトロウイルス由来遺伝子の発現を許容する一方、その他の大部分のレトロウイルス由来配列は抑制されており、特殊な small RNA 分子によるゲノム機能制御・発生分化制御機構の存在が予想され、可能性が大きい。

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 件)

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久須美真紀 (KUSUMI MAKI)

国立成育医療センター周産期病態研究部・共同利用研究員

研究者番号：70470002

(2) 研究者協力者

秦 健一郎 (HATA KENICHIRO)

国立成育医療センター周産期病態研究部・部長

研究者番号：

中林一彦

国立成育医療センター周産期病態研究