

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15697

研究課題名（和文）受精卵のゲノム再プログラム化を制御するヒストンアルギニン残基メチル化の解析

研究課題名（英文）Analysis of histone arginine residue methylation that controls reprogramming of the genome in the zygote

研究代表者

伊丹 暢彦（Itami, Nobuhiko）

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・研究員

研究者番号：20849616

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：受精後のマウス雄性ゲノムの再プログラム化には、卵内のヒストンH3R17がジメチル化されている（H3R17me2a）ことが重要である。本研究では卵や受精卵、さらに胚性幹細胞や線維芽細胞において、H3R17me2aは細胞分裂間期のゲノムには存在するものの、分裂期のゲノムからは消失することを発見した。脱メチル化阻害剤を用いた実験により、マウス卵の細胞分裂期と間期の間でH3R17me2aの動態が変化し、これが胚発生にも影響を及ぼしていることを見出した。また、ウシを用いた研究では、ヒストン取り込み等のイベントを伴う受精卵の前核形成に、特定のアミノ酸が影響を及ぼしていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は受精卵のゲノム再プログラム化機構の一端を明らかにするものであり、受精卵の全能性獲得機構の解明や効率的な幹細胞の作成等に寄与する。さらにウシを用いた研究で、受精後の前核形成や発生速度を制御できる因子を発見できたことは、高受胎性が担保された受精卵の増産につながるため、畜産現場への受精卵移植の普及に大きく貢献できる。

研究成果の概要（英文）：The reprogramming of the male genome in mouse fertilization requires histone H3R17 dimethylation (H3R17me2a) in the oocyte. In this study, it was discovered that while H3R17me2a exists in the genome during interphase in eggs, fertilized eggs, embryonic stem cells, and fibroblasts, it disappears from the genome during mitosis. Using experiments with demethylation inhibitors, it was found that the dynamics of H3R17me2a change between the mitotic and interphase stages in mouse eggs, and this affects embryonic development. Additionally, in a study using cows, it was found that specific amino acids are involved in events such as histone incorporation in the pronuclear formation of zygotes.

研究分野：動物生殖学

キーワード：受精卵 卵子 ヒストン アルギニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全能性とは個体を全て形成することのできる受精卵特有の能力である。分化した細胞である卵と精子のゲノムは、受精時のゲノム再プログラム化により全能性を獲得する。このゲノム再プログラム化は、ヒストン修飾や DNA メチル化レベルにおけるエピジェネティクス変化とそれを制御するメカニズムにより成立すると考えられるが、その全容は未だ解明されていない。精子に由来する雄性ゲノムの再プログラム化には、卵細胞質中に蓄積されているヒストン変異体(H3.3)の取り込みが重要であり、特に申請者の所属するグループでは、H3.3 の 17 番目のアルギニン(R17)がジメチル化されていることが雄性ゲノムへの取り込みに必須であると報告した。しかし、この卵におけるアルギニンメチル化の制御機構や転写に及ぼす影響など、詳細は未だ不明である。本研究ではマウスの卵を用い、ヒストンアルギニンメチル化酵素の発現・機能解析とその制御による再プログラム化の成否の観察、ヒストンアルギニンのメチル化が導入されているゲノム上の領域の同定などを行い、アルギニンメチル化とゲノム再プログラム化の関連性の解明を目指す。本研究の完成により受精卵が全能性を獲得する機構の一端が明らかになり、多能性幹細胞の作出効率向上や、ヒト受精障害における効果的な治療法の開発に寄与することが期待される。

2. 研究の目的

マウス卵・受精卵や ES 細胞や線維芽細胞を用いて H3R17me2a の発現動態と役割を明らかにする。受精卵における H3R17 メチル化酵素の発現や役割を明らかにする。

研究期間中の申請者の異動により、研究対象をウシに変更した。ウシは体外受精卵移植による受胎率が 40%程度であるが、分割速度の複数の基準を満たす受精卵の移植後受胎率は 70%を超える。申請者は受精直後のゲノムへのヒストンの取り込みがカギを握る前核形成について、その速度を制御することで分割速度を速め、高受胎が見込める受精卵を効率よく作出できる培養系を構築する。

3. 研究の方法

マウス卵や受精卵、ES 細胞や線維芽細胞において、免疫染色により H3R17me2a の発現動態を検証した。さらに H3R17 のメチル化酵素の発現を RT-qPCR と免疫染色にて解析し、酵素の機能解析のため、卵におけるノックダウン解析を試みた。H3R17 をメチル化する酵素として Mettl23 と CARM1 が知られている。これらの発現抑制を行うことにより、H3R17 のメチル化における役割を明らかにする。Mettl23 は前任者の研究によりホモノックアウトマウスが作成されているが(Hatanaka et al., Cell Rep, 2017)、このマウスでは卵細胞質への H3R17me2a の蓄積が起きており、産仔も若干少なくなるものの産出できているため、Mettl23 と CARM1 の双方が redundant に R17 のメチル化を触媒している可能性が高い。そこで、この Mettl23 KO マウスの卵に CARM1 ノックダウン処理をすることにより H3R17me2a を限りなく減少させ、受精後の再プログラム化の成否(前核形成や胚発生)について検証する。申請者は前実験にて H3R17me2a は減数分裂の進行に伴い細胞質中に蓄積するというデータを得ている。つまり減数分裂が再開する前の卵核胞(GV)期において Mettl23 と CARM1 を消失させることにより細胞質中への H3R17me2a の蓄積が抑制され、受精後の再プログラム化に異常をきたすのではないかと考えた。

ウシ受精卵の体外培養時において、前核形成やその前段階であるゲノムへのヒストンの取り込みを制御すると考えられる因子を添加、もしくは非添加とし、前核形成や第一分割への影響を検証した。

4. 研究成果

免疫染色により、H3R17me2a は発育途上期の卵から胚盤胞、さらに ES 細胞や線維芽細胞まで存在していることがわかった。しかし興味深いことに、細胞分裂間期ではゲノム上に確認できる H3R17me2a のシグナルが、分裂期になると消失することを発見した。この現象は受精卵・ES 細胞・線維芽細胞に共通して観察された。阻害剤を用いた実験により、ゲノム上からの H3R17me2a シグナルの消失は peptidylarginine deiminase 1 によるアルギニンの脱メチル化によって引き起こされており、さらにこの現象は胚発生に必要なものであることを見出した。H3R17 のメチル化酵素の候補である CARM1 と Mettl23 は発育途上期の卵から胚盤胞に至るまで発現していた。そこで発育完了卵に対してこれら因子のノックダウンを試みたが、卵細胞質中にすでにタンパク質として存在している量が多かったためか、表現型は観察されなかった。今後はさらに遡った時期からノックダウンを試みる必要があると考えている。

ウシ体外受精卵培養に用いられる特定のアミノ酸が受精直後の前核形成を遅らせており、このアミノ酸を非添加とすることでウシ受精卵の第一分割のタイミングが早まることを確認した。このことから、特定のアミノ酸による前核形成の遅れが第一分割の遅れにも影響していることがわかった。前核形成の遅れは雌雄ゲノムへのヒストンの取り込みが不十分であることに起因する可能性が高い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kamimura Satoshi, Inoue Kimiko, Mizutani Eiji, Kim Jin-Moon, Inoue Hiroki, Ogonuki Narumi, Miyamoto Kei, Ihashi Shunya, Itami Nobuhiko, Wakayama Teruhiko, Ito Akihiro, Nishino Norikazu, Yoshida Minoru, Ogura Atsuo	4. 巻 105
2. 論文標題 Improved development of mouse somatic cell nuclear transfer embryos by chlamydocin analogues, class I and IIa histone deacetylase inhibitors†	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 543 ~ 553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioab096	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 Mochida Keiji, Hasegawa Ayumi, Shikata Daiki, Itami Nobuhiko, Hada Masashi, Watanabe Naomi, Tomishima Toshiko, Ogura Atsuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Easy and quick (EQ) sperm freezing method for urgent preservation of mouse strains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-93604-y	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊丹暢彦, 赤木悟史, 平尾雄二
2. 発表標題 培養液の非必須アミノ酸組成の改変によるウシ高品質胚の作出
3. 学会等名 第6回日本胚移植技術研究会大会
4. 発表年 2022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
---------	---------