

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15705

研究課題名(和文) ヒストンH3バリエーションH3.3の量的操作による、体細胞核移植法の改善

研究課題名(英文) Improvement of somatic cell nuclear transfer technology by modulating H3.3 amount in chromatin

研究代表者

羽田 政司 (Hada, Masashi)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：10802746

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)：本研究はヒストンバリエーション H3.3 を体細胞核移植 (SCNT) 胚で過剰発現させることで、遺伝子発現に抑制的なヒストンバリエーションH3.1またはH3.2 (H3.1/H3.2) の排斥を介して、SCNT 法の成功率を改善させることを目的としていた。顕著な報告として特に以下 2 点が挙げられる。(1) 胚体外組織細胞を用いた解析により、H3.1/H3.2 が SCNT 法の障壁となること、更にはそのメカニズムを明らかにした。(2) 実際に H3.3 の過剰発現で SCNT 法の成功率が向上す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

本研究では H3.3 を用いた新しい SCNT 法の改善方法を提供すると共に、H3.1/H3.2 によって SCNT 法が阻害されるメカニズムを明らかにした。これらの知見は SCNT 法の実用化のみならず、初期胚発生メカニズムの理解や再生医療に進展に貢献できると期待される。なお、本研究では胎盤系列の細胞からクローンマウスを作出したが、これは世界で初めての成果である。

研究成果の概要(英文)：This study aims to improve the success rate of somatic cell nuclear transfer (SCNT) through the overexpression of histone H3 variant H3.3. Notable achievements include: 1) analysis using extra-embryonic tissue cells revealed that H3.1/H3.2 acted as a barrier to the SCNT method and its mechanism; 2) the overexpression of H3.3 improved the success rate of the SCNT method.

研究分野：生殖工学

キーワード：ヒストンバリエーション 体細胞核移植 胚体外系列 H3K9me3 ChIP-seq 高次クロマチン構造 初期発生

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

SCNT法は分化した細胞核からクローン個体を作製できる技術であるが、未だ成功率は低い。最近、クローン胚に保持されたドナー体細胞核のエピゲノム情報を修正することで、出生率が劇的に改善されることが報告された。しかしながら、未だ大多数のクローン胚は着床後に胎盤発生異常を伴い胚発生を停止することから、着床後の発生を阻害する未知のエピゲノム異常の存在が示唆される。最近、遺伝子発現の促進に重要なエピゲノム因子であるヒストン H3 バリエント H3.3 が胎盤発生に重要であることが報告された。更に申請者の先行研究で、クローン胚の核内 H3.3 の減少と胎盤発生異常との関係性が示唆されており、ヒストンバリエントが SCNT 法の成否に深く関与している可能性が浮上した。

2. 研究の目的

上記の背景を鑑み、本研究は初期発生期におけるヒストンバリエントの機能を明らかにし、クローン胚における核内ヒストン H3 バリエント量を操作することで SCNT 法の成功率を高めることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 初期発生期におけるヒストンバリエントの機能解析: 胎盤系列と胎児系列の培養幹細胞である栄養膜幹細胞 (TS 細胞) と胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いてヒストン H3 バリエントのゲノム局在解析を行った。次にヒストンバリエントをクロマチンに組み込む因子であるヒストンシヤペロンを欠損させることで、細胞の性質に与える影響を解析した。
- (2) H3.3 過剰発現による SCNT 法の改善: H3.3 をコードする mRNA をクローン胚で過剰発現させ、胚発生への影響を解析した。

4. 研究成果

(1) 初期発生期におけるヒストンバリエントの機能解析
 TS 細胞と ES 細胞におけるヒストンバリエント H3.1/H3.2 と H3.3 のゲノム局在を ChIP-seq 解析で調べたところ、胚体外系列の細胞である TS 細胞において H3.1/H3.2 が数 Mb にわたって蓄積している領域が存在していた (図 1)。過去の研究で H3.1/H3.2 は抑制的なヒストン修飾である H3K9me3 を呼び込む場合があることが報告されており⁽¹⁾、TS 細胞における H3K9me3 のゲノム局在も解析したところ、H3.1/H3.2 と共に大きなドメイン構造を形成していることが分かった。この領域を申請者達は TSC-defined highly heterochromatinized domain (THD) と名付けた。次に THD における H3.1/H3.2 の機能を調べるため、H3.1/H3.2 をクロマチンに組み込む因子である P150 の発現を TS 細胞で低下させたところ、THD において H3.1/H3.2 だけでなく H3K9me3 も減少していた。また、P150 の発現量が低下した TS 細胞の遺伝子発現を調べたところ、TS 細胞の幹細胞マーカー遺伝子である Cdx2 や Elf5 などの発現も減少し、ES 細胞の幹細胞マーカー遺伝子である Oct3/4 の発現が上昇していた。これらの結果から H3.1/H3.2 は THD を制御することで、胚体外組織に特徴的な遺伝子発現を制御していることが明らかになった。

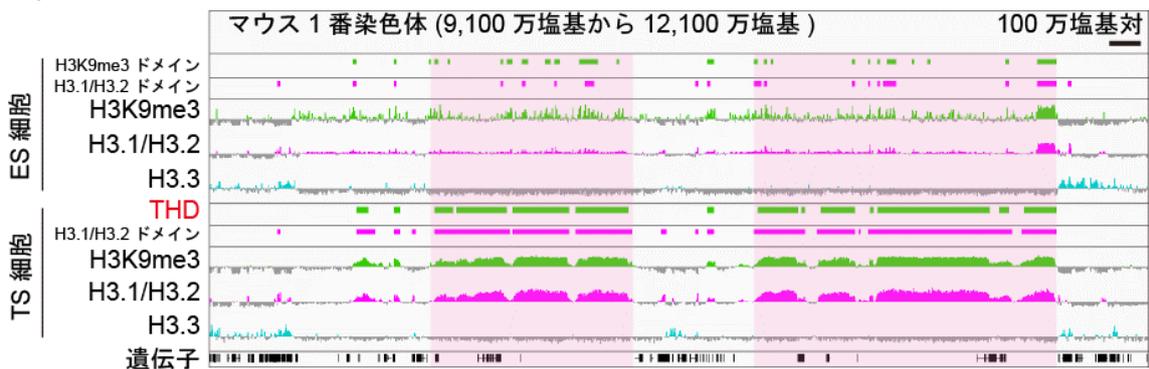


図 1. ES 細胞と TS 細胞を用いた H3K9me3 と H3.1/H3.2 の ChIP-seq 解析

更に ATAC-seq 解析や Hi-C 解析によって THD の特性を詳細に解析したところ、THD が形成されている領域は特に安定的なクロマチン構造となっていることが分かった。興味深いことに THD は TS 細胞だけでなく、マウス初期発生期の胎盤系列の細胞やヒト胎盤細胞においても観察され、胎盤系列の細胞において広く重要な意味を持つことが示唆された。

TS 細胞のような胚体外系列の細胞を用いた SCNT 法は特に成功率が低いことが報告されている⁽³⁾。またドナー細胞が持つ H3K9me3 がクローン胚の発生を強力に阻害することも報告されており⁽²⁾、THD がリプログラミングに対して強い抵抗性を示す可能性が考えられた。そこで酵素的処理によって THD を破壊したところ、TS 細胞由来クローン胚の発生効率は大きく向上

し、世界で初めて胎盤系列の細胞に由来するクローンマウスを作出することに成功した (図 2)。

(2) H3.3 過剰発現による SCNT 法の改善

上記の通り、H3.1/H3.2 が SCNT 法に対して抵抗性を示すことが分かった。核内 H3.1/H3.2 量は H3.3 を過剰発現することで減少することが報告されているが、過剰な H3.3 量は胚発生を逆に抑制してしまう。そこで H3.3 過剰発現による SCNT 法への影響を調べるため、まず最適な発現量を検討する必要がある。クローン胚へ導入する H3.3 mRNA の濃度を 12.5, 25, 50, 100, 200 ng/uL という範囲で検討したところ、25 または 50 ng/uL の濃度が最適であることが分かった。そこで次に、これらの濃度で H3.3 mRNA を導入したクローン胚の個体への発生能を評価した。核

ドナー細胞として BDF1 系統の卵丘細胞を用いたが、産子率は未処理群が 0.4%であったことに對し、H3.3 過剰発現群では 25 ng/uL で 1.0%, 50 ng/uL で 1.1%であり、微増であるが改善していることが分かった。一方で当初期待されたクローン胎盤の発生異常への影響も解析したが、顕著な改善は見られなかった。

【参考文献】

1. Hatanaka et al, *PNAS*, 2015
2. Matoba et al, *Cell*, 2014
3. Ogawa et al., *Cell Repro.*, 2015



図 2. TS 細胞由来
クローンマウスの作出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Shikata Daiki, Matoba Shogo, Hada Masashi, Sakashita Akihiko, Inoue Kimiko, Ogura Atsuo	4. 巻 13
2. 論文標題 Suppression of endogenous retroviral enhancers in mouse embryos derived from somatic cell nuclear transfer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fgene.2022.1032760	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 Hada Masashi, Miura Hisashi, Tanigawa Akie, Matoba Shogo, Inoue Kimiko, Ogonuki Narumi, Hirose Michiko, Watanabe Naomi, Nakato Ryuichiro, Fujiki Katsunori, Hasegawa Ayumi, Sakashita Akihiko, Okae Hiroaki, Miura Kento, Shikata Daiki, Arima Takahiro, Shirahige Katsuhiko, Hiratani Ichiro, Ogura Atsuo	4. 巻 36
2. 論文標題 Highly rigid H3.1/H3.2-H3K9me3 domains set a barrier for cell fate reprogramming in trophoblast stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 84 ~ 102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/gad.348782.121	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 Akter Most Sumona, Hada Masashi, Shikata Daiki, Watanabe Gen, Ogura Atsuo, Matoba Shogo	4. 巻 11
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-based genetic screen of SCNT-reprogramming resistant genes identifies critical genes for male germ cell development in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-94851-9	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 -
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 -

1. 著者名 Inoue Kimiko, Ogonuki Narumi, Kamimura Satoshi, Inoue Hiroki, Matoba Shogo, Hirose Michiko, Honda Arata, Miura Kento, Hada Masashi, Hasegawa Ayumi, Watanabe Naomi, Dodo Yukiko, Mochida Keiji, Ogura Atsuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Loss of H3K27me3 imprinting in the Sfmbt2 miRNA cluster causes enlargement of cloned mouse placentas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16044-8	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 Tsuchimoto Akihiro, Tone Masaaki, Ogonuki Narumi, Hada Masashi, Ogura Atsuo, Takashima Seiji	4. 巻 10
2. 論文標題 Germ cell depletion in recipient testis has adverse effects on spermatogenesis in orthotopically transplanted testis pieces via retinoic acid insufficiency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-67595-1	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3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 羽田政司
2. 発表標題 Highly rigid H3.1/H3.2-H3K9me3 domains set a barrier for cell fate reprogramming in trophoblast stem cells
3. 学会等名 全能性プログラム : デコーディングからデザインへ 論文徹底解説シリーズ・第12弾 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 羽田政司
2. 発表標題 胚体外系列の細胞に特徴的なH3K9me3の巨大ドメインは、体細胞核移植法に対して強い抵抗性を示す
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 1), 羽田政司, 中戸隆一郎, 岡江寛明, 廣瀬美智子, 有馬隆博, 白髭克彦, 小倉淳郎
2. 発表標題 胚体外組織におけるヒストンH3/バリエーションH3.1/2の機能解析
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Research Highlight https://www.riken.jp/en/news_pubs/research_news/rr/20220401_1/index.html 胎盤らしさを支える分子基盤を解明 https://www.riken.jp/press/2022/20220118_1/index.html 胎盤らしさを支える分子基盤を解明 https://research-er.jp/articles/view/106845 小倉班の論文がGenes Dev.に掲載されました https://totipotency.biken.osaka-u.ac.jp/news/achievements/20220118 Highly rigid H3.1/H3.2-H3K9me3 domains set a barrier for cell fate reprogramming in trophoblast stem cells https://web.brc.riken.jp/en/archives/news/20220118_02 胎盤らしさを支える分子基盤を解明 https://web.brc.riken.jp/ja/archives/news/20220118_02

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