

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15000

研究課題名（和文）卵子型エピゲノム形成におけるH3K36メチル化酵素ファミリーの機能解明

研究課題名（英文）Functional analysis of H3K36 methyltransferase during in establishment of mouse maternal epigenome

研究代表者

佐々木 恵亮（Sasaki, Keisuke）

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10737159

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳動物の卵形成に不可欠なエピジェネティクスについての理解を深めるため、ヒストンH3における36番目のリジン（H3K36）のメチル化現象に着目した。はじめに、H3K36メチル化酵素のひとつであるマウスNsd3遺伝子の機能を破壊したノックアウトマウスを作成し、母性NSD3が卵形成に必須であることが示唆された。また、クロマチン免疫沈降シーケンスに代わる少量サンプルでのヒストン修飾プロファイリングが可能なCUT&Tag法のマウス卵への適用に成功し、H3K36メチル化を含む複数種類のヒストン修飾のローインプットな全ゲノムプロファイリングが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、卵における機能が不明であったNSD3の機能の一端が明らかになったとともに、CUT&Tagにより卵におけるローインプットなヒストン修飾プロファイリングが可能となった。したがって、本研究で樹立したNSD3ノックアウトマウスの卵を用いたCUT&Tagを実施することで、NSD3がどのような分子機序で卵形成に関与するのかを明らかにすることができる。また、本研究では試験管内で機能的な卵を生み出す培養系を応用することで、マウス卵形成過程で発現する遺伝子の機能を体外でスクリーニングする技術の開発にも成功し、これまでもより迅速に遺伝子機能を解析することができるようになった。

研究成果の概要（英文）：To understand epigenetic regulation during mammalian oogenesis, we focused on the methylation of lysine 36 in histone H3 machinery. First, mouse Nsd3 gene, known as one of the H3K36 methyltransferases, was knocked out by CRISPR-Cas system, suggesting that maternal NSD3 is essential for the establishment of maternal epigenome and further oogenesis. In addition, we attempted to apply the CUT&Tag method to mouse oocytes, which enables histone modification profiling using small cell samples instead of chromatin immunoprecipitation-sequencing, and also established low-input and genome-wide profiling method for H3K36me3, H3K4me3, and H3K27me3.

研究分野：生殖生物学

キーワード：マウス 卵 ヒストン修飾 H3K36メチル化 ゲノム編集 in vitro oogenesis CUT&amp;Tag

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の雌性生殖細胞は卵成長・減数分裂・母性因子の蓄積・卵子型エピゲノムの獲得といったイベントを経て、正常な個体発生を支持する完全な卵となる。生殖細胞はヒストンテールの化学修飾やDNAメチル化によって性特異的にエピジェネティックな特徴を付与される(=卵子型/精子型エピゲノム)。ヒストンH3における36番目のリジンのメチル化(H3K36me)は卵成長過程の最初期に起こり、卵子型エピゲノム獲得の起点となる。卵母細胞におけるH3K36meの多くはヒストン-リジンメチル化酵素SETD2(SET domain containing 2)によって付与されるが、SETD2のみではH3K36me機構の全容は説明できないため、SETD2非依存的なH3K36me経路の存在が示唆されていた(Xu et al., *Nat Genet* 2019)。しかしながら、*Setd2*以外のH3K36me酵素遺伝子が卵子型エピゲノムの獲得に果たす役割は未解明であった。このような背景から、SETD2非依存的なH3K36meがどのように卵子型エピゲノムを形成させ、どのように卵としての完全性に寄与するのかという疑問が生じた。

## 2. 研究の目的

上記の疑問を解決するため、本研究では*Setd2*以外のH3K36me酵素遺伝子として*Nsd*(nuclear receptor-binding SET domain protein)ファミリーに着目した。*Nsd1-3*により構成されるこのファミリーは様々な組織でH3K36meを触媒するが、マウス卵母細胞における機能は不明であった。そこで本研究では、卵子型エピゲノムが形成され卵が完全性を獲得する過程におけるH3K36me酵素遺伝子*Nsd*ファミリーの役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 卵胞培養を用いた*Nsd*ファミリーの多重ノックダウンの検証

研究代表者が発表した卵特異的遺伝子ノックダウン法を応用し、*Nsd1-3*全ての機能を失った遺伝子改変マウスの作出を試みる(Sasaki et al., 2021 *J Reprod Dev*)。本方法は人工的に配列をデザインしたmicroRNA様配列(artificial microRNA; amiRNA)を用い、amiRNAを卵特異的に発現する遺伝子のイントロンにノックインすることで卵特異的な遺伝子多重ノックダウンを図るものである。*Nsd1-3*を標的としたamiRNAをデザインし、amiRNA発現ベクターに組み込み、ノックダウン効果を検証した。10日齢B6D2F1雌マウス由来の二次卵胞内卵母細胞に顕微操作によってamiRNA発現ベクターをマイクロインジェクションし、遺伝子導入卵胞を卵胞培養することで成長完了卵を得た。培養後のtdTomato陽性卵を用いた蛍光免疫染色により、H3K36meの挙動を観察した。

### 2) *Nsd*ファミリー多重ノックダウンマウス作出の試み

研究代表者らが開発した卵特異的遺伝子ノックダウン法を応用し、*Nsd1-3*の3遺伝子の機能を同時に損なった卵特異的多重ノックダウンマウスの作出にとりかかった。はじめに、人工的にデザインしたmicroRNA(artificial microRNA; amiRNA)を用いることで*Nsd*ファミリーの多重ノックダウンを可能にするシステムを構築し、1)で開発したスクリーニング法によって機能性を検証した。また、CRISPR-Cas9によってamiRNAをノックインした多重ノックダウンマウスの作出を試みた。

### 3) *Nsd3*ノックアウトマウスの作出と表現型の解析

*Nsd*ファミリー遺伝子の卵形成過程における個々の機能を調べるため、CRISPR-Cas9によって*Nsd3*ゲノム編集マウスを作出した。得られたファウンダー雌マウスが妊孕性を示すかどうかを野生型雄マウスとの交配試験によって検証した。さらに、*Nsd3*ゲノム編集マウスを系統化し、遺伝子欠損が個体発生に与える影響を調べた。

### 4) CUT&Tagによるマウス卵のヒストン修飾プロファイリング法の確立

作出した多重ノックダウンマウスやノックアウトマウスにおける卵子型エピゲノムの状態を知るためには、卵の全ゲノムヒストンプロファイルを調べる必要がある。既存の解析方法であるクロマチン免疫沈降シーケンシング(ChIP-seq)は解析に足る必要細胞数が多く、卵のような希少な細胞には適さない。そこで本研究ではChIP-seqに代わる解析法CUT&Tag(Cleavage Under Target & Tagmentation)のマウス卵への適用を試みた。

## 4. 研究成果

### 1) 卵胞培養を用いた*Nsd*ファミリーの多重ノックダウンの検証

卵特異的に発現する遺伝子*Gdf9*(growth differentiation factor 9)プロモーターの

制御下で赤色蛍光タンパク質 tdTomato と *Nsd1-3* を標的とする amiRNA を発現するプラスミドベクターを構築し、卵特異的に複数の amiRNA を発現させ、さらに tdTomato による遺伝子導入卵のトレースが可能となった。二次卵胞内卵母細胞へのマイクロインジェクションおよび卵胞培養の結果、*Nsd1-3* 多重ノックダウン卵では H3K36me 修飾が部分的に失われることがわかった。本研究課題開始直前に海外の研究グループにより NSD1 の機能の一部が明らかにされ、マウス卵形成過程において NSD1 はヒストンメチル化活性をもたず、*Nsd1* ノックアウト雌マウスは妊孕性を示すことがわかった (Shirane et al., 2020 *Nat Genet*)。したがって、*Nsd2/3* のいずれか、あるいは、双方が卵子型エピゲノムの形成に寄与することが予想された。

## 2) *Nsd* ファミリー多重ノックダウンマウス作出の試み

1) でデザインした *Nsd1-3* を標的とした amiRNA をタンデムに連結させてクラスター化し、*Gdf9* イントロン内の効率的にゲノム編集が可能な遺伝子座へのノックインを試みたが、目的の遺伝子改変マウスは得られなかった。amiRNA クラスターは 3 kb にも及ぶ塩基長であり、本手法で採用したエレクトロポレーションでの導入は困難であると考えられた。現在はマイクロインジェクション法あるいは piggy BAC トランスポゾンを用いた手法に切り替え、遺伝子改変マウスの作出を継続している。

## 3) *Nsd3* ノックアウトマウスの作出と表現型の解析

1) の結果から、*Nsd2/3* のいずれか、あるいは双方が H3K36 メチル化の確立に重要であることが示唆された。体細胞を用いた研究により、NSD1 および NSD2 は主に遺伝子間領域を標的とする一方、NSD3 はプロモーターやエンハンサーを標的とすることがわかっている。そこで本研究では、NSD1 や NSD2 とは異なる機能を有すると予測される NSD3 に着目し、CRISPR-Cas によりノックアウトマウスを作出した。

ゲノム編集によって *Nsd3* のエキソン 2 を変異させたファウンダーマウスを 10 匹得た。2 匹はホモ欠損の雌マウスであり、残りの 8 匹は全て 1 塩基挿入型 (ins) によるフレームシフトを起こした個体であった。ins 型のヘテロ欠損雄マウスを起点にゲノム編集マウス系統を樹立し、ヘテロ接合体である *Nsd3<sup>ins/wt</sup>* 雌マウスと *Nsd3<sup>ins/wt</sup>* 雄マウスによる交配によりホモ欠損となる *Nsd3<sup>ins/ins</sup>* 個体が得られた。*Nsd3<sup>ins/ins</sup>* マウスの出生率はメンデルの法則と大きく違わなかったことから、胚性 *Nsd3* は受精後の発生に必須ではないことが示唆された (wt/wt = 31.8%、ins/wt = 50%、ins/ins = 18.2%)。一方で、ファウンダーを含む *Nsd3* ホモ欠損雌マウスと野生型雄マウスを交配したが産仔が得られなかったため、母性 NSD3 が正常な卵形成、あるいは、胚発生に必須である可能性が示唆された (N = 2)。今後は *Nsd3<sup>ins/ins</sup>* 卵の細胞機能を調べることで、卵子型エピゲノムの形成過程における NSD3 単独の機能を明らかにする予定である。

## 4) CUT&Tag によるマウス卵のヒストン修飾プロファイリング法の確立

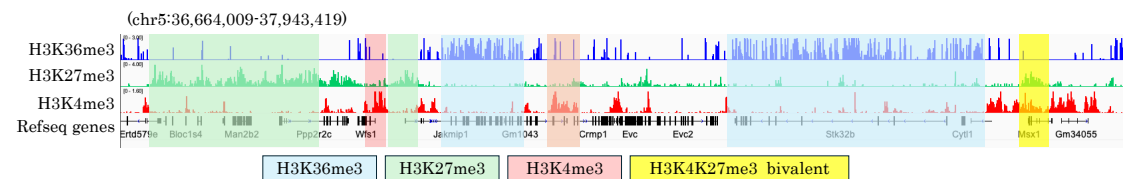


図2. CUT&Tagによるマウス成長完了卵のH3K36me3、H3K27me3およびH3K4me3の全ゲノムプロファイリング

本研究開始時にはマウス卵を用いた CUT&Tag の実施報告例はなかったため、卵の一次抗体反応条件や核酸精製方法といった CUT&Tag の実験条件の検討を行った。この結果、細胞に吸着するコンカナバリン A ビーズフリーな手法によりシークエンスに足るライブラリを調製可能になった。また、H3K36me3 を関連性のあるヒストン修飾 H3K4me3 および H3K27me3 についても CUT&Tag を実施し、卵形成過程でダイナミックに変動するこれら 3 種類のヒストン修飾の全ゲノムプロファイリングが可能となった。図 2 で示したように、CUT&Tag によって卵ゲノムを H3K36me3 ドメイン、H3K27me3 ドメイン、H3K4me3 ドメイン、並びに、H3K4me3 と H3K27me3 双方の修飾をもつ H3K4K27 bivalent ドメインに分類することができたため、本手法が入手細胞数の少ない遺伝子改変マウスの卵を用いた場合に有効な解析手法であることが証明された。なお、本研究で実施した CUT&Tag はインプット細胞数が 200~250 個で十分な深度のデータが得られている。その一方で、CUT&Tag はピーク状に限局する H3K4me3 に対しては高解像度のデータが得られたのに対し、ブロードに分布する H3K36me3 と H3K27me3 の解像度は比較的低く、後者についてはゲノムディストリビューションを網羅的に検証するのに有効であることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 3件）

1. 著者名 Suzuki Daisuke, Sasaki Keisuke, Kumamoto Soichiro, Tanaka Keisuke, Ogawa Hidehiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Dynamic Changes of Gene Expression in Mouse Mural Trophectoderm Regulated by Cdx2 During Implantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 945241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.945241	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 Keisuke, TAKAOKA Saaya, OBATA Yayoi	4. 巻 67
2. 論文標題 Oocyte-specific gene knockdown by intronic artificial microRNAs driven by <i>Zp3</i> transcription in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 229 ~ 234
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 -

1. 著者名 Satouh Yuhkoh, Suzuki Emiko, Sasaki Keisuke, Sato Ken	4. 巻 -
2. 論文標題 Improved mRNA electroporation into immature oocytes to examine protein dynamics during development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2023.12.07.570343	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木大介、佐々木恵亮、小川英彦
2. 発表標題 転写因子Cdx2の下方制御はマウス壁栄養外胚葉の分化及び胚盤胞のoutgrowthに必要である
3. 学会等名 第63回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木恵亮、柿沼俊枝、佐々木麻智子、大上厚志
2. 発表標題 体外卵成長培養がマウス卵のエピジェネティクスに与える影響
3. 学会等名 第116回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2023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
---------	---------