

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293364

研究課題名(和文) 卵子加齢の分子特性解明と新しいバイオマーカー開発の橋渡し研究

研究課題名(英文) Study for the molecular mechanism in an oocyte aging

研究代表者

阿久津 英憲 (Akutsu, Hidenori)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：50347225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：受精卵全能性獲得に必須の分子機序としてX染色体不活化に焦点をあてた。受精後に精子由来X染色体は不活化され、一方卵子X染色体が優先的に働く仕組みがヒストン3の9番目リジンにメチル基が3つ付加されていること(H3K9me3)を見出した。この非対称的なクロマチン状態を伴う刷込み型Xist遺伝子発現パターンが乱れると着床後早期に胚性致死に陥る。致死的精子ゲノム異常を受精卵段階でのアリルスイッチングにより生仔まで生存可能であることを初めて実証した(Fukuda A, et al. Plos Genetics 2016)。卵子の全能性獲得にはヒストン核タンパク質の化学的修飾も重要であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：An oocyte aging is strongly related with impairing totipotency of zygote and X-chromosome inactivation of female embryos is partially key molecule feature on acquiring totipotency. We aimed to explore molecular mechanism on X-chromosome inactivation process in preimplantation development using mice model. An our first accomplishment showed that histone 3 lysine 9 tri-methylation (H3K9me3) was involved in Xm (maternal X-chromosome)-Xist derepression from early preimplantation phases. We also found that the chromatin state at the Xist genomic locus became markedly condensed as oocyte growth proceeded. Xm-Xist was derepressed by chromatin alterations, the derepression was stably maintained and rescued paternal Xist mutational lethality, indicating that loss of Xm-Xist imprinting was irreversible. We propose that chromatin condensation and fine-tuning of Rnf12 dosage are crucial for Xist imprint maintenance by silencing Xm-Xist (Fukuda, et al. Plos genetics 2016).

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：生殖医学 受精卵 不育症 女性医学

1. 研究開始当初の背景

わが国は、出生率(合計特殊出生率)が1.41(2012年)と依然非常に低い値である。一方で、不妊症治療特に凍結・融解胚による治療も含めた生殖補助医療(ART)享受による出生児数は総出生児数の2.5%(2009年)にもなり着実に増加している。社会のライフスタイル変化に伴い女性の妊娠・出産時年齢が上昇してきた昨今、ARTはいかなる生殖年齢層にも有効ではないことが明らかとなっている。特に、加齢と卵子の質の低下については、社会の高い関心とともに社会問題となりつつある。まず、確かな基礎研究に裏打ちされた卵子に関するエビデンスを国民に提供する必要がある。申請者は、マウスES細胞を応用し加齢卵子の質に関連する分子特性を明らかにしてきた(基盤研究B・研究課題番号:21390456)。

2. 研究の目的

実験動物マウスを用い、着床前期胚発生と着床周辺期の胎盤発生期までに組織学および分子発生動的にも劇的に変動することに着目し卵子得意的な現象を切り口に分子機序を解明していく研究を進める。卵子が成熟する過程でのDNAメチル化はとX染色体不活化機構との関係性を明らかにし、発生段階での双方の発現動態を示めしていく。卵子の全能性獲得に関与するX染色体不活化機序の解明をすることで、不育症や加齢に伴う卵子の質に関する分子機序を明らかにしていくことを目指す。

3. 研究の方法

受精卵(雌)のX染色体が着床するまでの期間で精子由来細胞核優先に不活性化され、一方で卵子由来X染色体が活性化しているというインプリント型のX染色体不活化機構が卵子細胞核のX染色体ヒストンH3のリジン9番の3つのメチル基修飾(H3K9me3)によるものであることを世界で初めて見出した(Fukuda, et al. Nat. Comm., 2014)。まず、卵子成熟過程でのDNAメチル化とX染色体不活化機構に関し、X染色体の一部のクロマチン凝縮を解析する。卵子形成期からXist遺伝子発現制御領域はクロマチン凝縮の状態であり、受精後卵子特異的に付いたH3K9me3により雌雄非対称性クロマチン凝縮が成立・維持されXist遺伝子の発現は精子由来アレルで抑制され全能性獲得が達成される。胚微量サンプルに対するクロマチン解析法を発展させていく。同時に、Xistノック

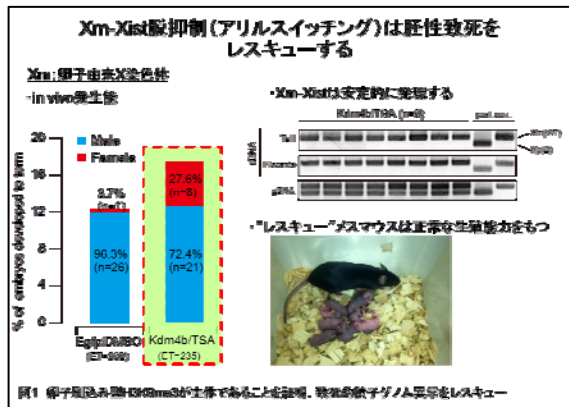
アウトマウスを用いDNA-FISH, RNA-FISH法を駆使し胚性致死に至るクロマチン動態を明らかにしていく。

卵子のXist発現を抑制する「しるし(H3K9me3)」が受精後の発生でどれだけ機能的に働くかを検証する。そのため、Xistノックアウトマウス(変異が精子由来だと致死性)を用い、卵子ゲノムでH3K9me3の修飾を解除することで致死性精子ゲノム異常をカバーできるかを検証する。

4. 研究成果

卵子加齢と卵子の質の低下に関し、受精卵の本質である全能性獲得に必須の分子機序としてX染色体不活化に焦点をあてその分子機序解明を目指した。技術の開発として、卵子・受精卵に対するマイクロインジェクションによる遺伝子機能評価系と極めて少ない細胞数でクロマチンアッセイを可能としたembryo ChIP (eChIP)解析系を構築出来た。そして、受精後に精子由来X染色体は不活性化され、一方卵子X染色体が優先的に働く仕組みがヒストン3(H3)の9番目のリジン(K)にメチル基(me)が3つ付加されていること(H3K9me3)を世界で初めて見出した(Fukuda A, et al. Nat Commun 2014)。受精卵でのX染色体不活性化の主体的制御がDNAメチル化ではなくヒストンコードのたった一つの特異アミノ酸に対する化学的修飾であることを示した。マウス単為胚作製・サイトジェネティクス解析とeChIP解析系を基盤としたX染色体不活化解析法を開発した。卵子核ではXist遺伝子の発現調整領域では特異的にH3K9me3が付加され、さらに局所的にクロマチン凝縮を制御していることを明らかにした(Fukuda A, et al. Development 2015)。受精から着床までの短い期間で非対称的なクロマチン状態を伴うこの刷込み型Xist遺伝子発現パターンが乱れると着床後早期に胚性致死に陥るため、初期胚でのX染色体不活化制御機構の理解がいかに重要であるかを示すものであった。

そこで、Xist遺伝子ノックアウトマウス系を応用し実証した。致死性精子ゲノム異常を受精卵段階でのアレルスイッチングにより生仔までレスキュー可能であることを世界で初めて実証した(図1)(Fukuda A, et al. Plos Genetics 2016)。受精卵のX染色体不活化制御、つまり卵子の全能性獲得にはDNAメチル化以外でヒストン核タンパク質の特異アミノ酸の化学的修飾も極めて重要であることを見出した。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Fukuda A, Tomikawa J, Miura T, Hata K, Nakabayashi K, Eggan K, Akutsu H*, Umezawa A. The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome inactivation and embryogenesis in mice. *Nat Commun* 2014; 5: 5464.
2. Fukuda A, Mitani A, Miyashita T, Umezawa A, Akutsu H*. Chromatin condensation of Xist genomic loci during oogenesis in mice. *Development* 2015; 142(23): 4049-4055.
3. Mizuno H, Akutsu H, Kato K. Ethical acceptability of research on human-animal chimeric embryos: summary of opinions by the Japanese Expert Panel on Bioethics. *Life Sci Soc Policy* 2015; 11(1):15.
4. Miura T, Sugawara T, Fukuda A, Tamoto R, Kawasaki T, Umezawa A, Akutsu H*. Generation of primitive neural stem cells from human fibroblasts using a defined set of factors. *Biol Open* 2015; 4(11): 1595-1607.
5. Fukuda A, Tanino M, Matoba R, Umezawa A, Akutsu H*. Imbalance between the expression dosages of X-chromosome and autosomal genes in mammalian oocytes. *Sci Rep* 2015; 5: 14101.
6. Akutsu H, Machida M, Kanzaki S, Sugawara T, Ohkura T, Nakamura N, Yamazaki-Inoue M, Miura T, Vemurib MC, Rao MS, Miyado K, Umezawa A. Xenogeneic-free defined conditions for

derivation and expansion of human embryonic stem cells with mesenchymal stem cells. *Regenerative Therapy* 2015; 1: 18-29.

7. Fukuda A, Mitani A, Miyashita T, Sado T, Umezawa A, Akutsu H*. Maintenance of Xist imprinting depends on chromatin condensation state and Rnf12 dosage in mice. *PLoS Genet* (in press).

8. Fukuda A, Mitani A, Miyashita T, Kobayashi H, Umezawa A, Akutsu H*. Spatiotemporal dynamics of Oct4 protein localization during preimplantation development in mice. *Reproduction* 2016; 152(5): 417-430.

[学会発表] (計 2 件)

1. IFFS/JSRM International Meeting 2015, Topics session1: "The role of asymmetric histone modifications in embryo development". Hidenori Akutsu (シンポジウム発表) 2015年4月26日. 場所: パシフィック横浜.

2. 日本生殖再生医学会 第12回 学術集会 教育講演. 演題: 「雌性胚の受精卵から個体発生に至るクロマチン制御機構」 阿久津英憲 2017年3月19日. 場所: シェーンバッハ・サポーター (東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

社会貢献

・内閣府総合科学技術会議生命倫理専門調査会委員として動物性集合胚研究に関する文部科学省指針見直しの見解(平成25年8月1日生命倫理専門調査会)を作成するなど、国の政策に貢献。

・文部科学省特定胚及びヒトES細胞研究専門委員会委員として胚に関する研究のガイドライン運営に貢献。

・日本学術会議 課題別委員会医学・医療領域におけるゲノム編集技術のあり方検討委員会幹事でもあり、初期胚研究の実験動物モデルで遂行し生命科学、医学へ展開する研究マネジメントについても本課題成果をもとに貢献。

6. 研究組織

阿久津英憲 (AKUTSU, Hidenori)

国立成育医療研究センター・研究所・部長

研究者番号：50347225

(2) 研究分担者

菅沼亮太 (SUGANUMA, Ryota)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：30528211

浜谷敏生 (HAMATANI, Toshio)

慶應大学・医学部・講師

研究者番号：60265882

(3) 連携研究者

()

なし

研究者番号：

(4) 研究協力者

()

なし