

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670715

研究課題名(和文)精子ゲノムのジェネティック・エピジェネティックな評価

研究課題名(英文)Genetic and epigenetic evaluation method for the sperm

研究代表者

幸田 尚(KOHDA, Takashi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：60211893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：生殖補助医療において、特に顕微授精の場合は精子を人為的に選択するため、良好な精子を判別する手法が必要である。そのため精子の運動性や形態といった外見の指標が用いられてきたが、このような指標と精子ゲノムのエピジェネティックな状態やDNA損傷の程度との関連は必ずしも明確ではない。本研究では我々がこれまで開発を行ってきたメチルシトシン、ヒドロキシメチルシトシンを同時解析できる手法の微量化を行い、L1配列のようなコピー数の多い配列に関しては単一精子から数十コピー由来の分子の網羅的シトシン修飾解析を可能とした。これにより、精子の形態学的評価とシトシン修飾の関連を明らかにすることが可能になった。

研究成果の概要(英文)：In the assisted reproductive technology (ART), the identification method for "good" sperm has been needed. The morphological standard is not necessarily sufficient to identify the genetic and epigenetic integrity of the sperm genome. Here we apply the newly developed method that identify the methylcytosine, hydroxymethylcytosine and non-modified cytosine simultaneously to the single sperm. After the requirement study, we have successfully apply this method for the L1 repetitive sequence analysis for cytosine modification.

研究分野：分子生物学

キーワード：sperm hydroxymethylcytosine ART

1. 研究開始当初の背景

生殖補助医療において、特に顕微授精の場合は精子を人為的に選択するため、良好な精子を判別する手法が必要であると考えられてきた。そのため精子の運動性や形態といった外見的な指標が用いられてきた。近年では強拡大顕微鏡下での観察により、携帯的に良好と思われる精子を選んで顕微受精 (ICSI) を行う intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) も提案され、実際に治療でも用いられている。しかしながら、このような指標と精子の染色体異常や DNA 損傷の程度との関連は必ずしも明確ではない。一方、受精率や運動性の低いいわゆる「質の低い」精子では、ゲノムのメチル化の程度が高いという報告がある。また、年齢の上昇とともに精子のゲノムのメチル化およびヒドロキシメチル化の程度が高くなるという報告もある。精子ゲノムのエピジェネティックな修飾が年齢をはじめとした様々な要因で変化しうるとすれば、次世代に伝わるエピジェネティックな情報が変化する可能性が考えられる。

さらに、受精時の精子のゲノムとランのゲノムでは DNA のメチル化の程度が大きく異なっていること、ヒトやマウスをはじめとして多くの哺乳類では受精直後の 1 細胞期胚において、精子由来の雄性前核においてのみメチルシトシン (mC) のヒドロキシメチルシトシン (hmC) への急速な変換が起こることが知られている。したがって、受精直後の胚においては父親由来のアレルと母親由来のアレルの間にエピジェネティックな非対称性が存在することになる。このような非対称性は胚盤胞期に向けて解消されてゆくと考えられているが、インプリント遺伝子を除いて完全に消失するか、体細胞においても一部残り続けるのかについて、詳細は明らかになっていない。これらのことを明らかにするために、単一精子レベル、単一胚レベルでのエピジェネティックな解析手段の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、精子の genetic、epigenetic な情報の integrity を評価する方法を確立するという生殖補助医療分野における大きな実用的な成果を目指しているとともに、受精後の雄性前核、雌性前核のエピジェネティックな非対称性、脱メチル化における除去修復とゲノム損傷に対する修復反応の関係について、生物学的な新しい知見を得るための基礎的な手法の確立を行うとともに、これら精子の genetic、epigenetic な情報の質の評価を個々の精子のレベルで統合的に検討することで、精子が次世代に伝える遺伝情報の総体を明らかにするとともに、生殖補助医療の技術向上のための基礎的知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では単一精子レベル、単一胚レベルでのエピジェネティックな解析法の微量化に取り組んだ。第 1 はゲノム DNA のシトシン修飾を網羅的に解析する手法である。これまでシトシン修飾の解析においては bisulfite sequencing が多く用いられてきた。Bisulfite 処理は非修飾のシトシン (C) はウラシルに変換するが mC は変換されないため、mC を同定することができるという手法であるが、酸性条件で反応を行うため変換と同時に DNA の切断が起こるため、微量な DNA からの解析は困難であるとされてきた。またこの手法では近年明らかにされた新しいシトシン修飾である hmC を mC と区別することができなかった。そこで我々は、hmC、mC 及び C を同時に解析することのできる新しい原理に基づく手法の開発を行い、95% 以上の高精度での解析に成功し、Enzyme-assisted Identification of Genome Modification Analysis (EnIGMA) 法と名付けた。さらにこの手法を次世代シーケンサーによるゲノムワイドの解析にも適用することに成功している (投稿中)。本研究では、この手法を含め bisulfite 処理を含む解析法における変換処理について、微量解析が可能となるような条件の探索を行った。特に bisulfite 反応については、シトシンのウラシルへの変換反応を十分に行うためには DNA を一本鎖として高温で酸性条件下でのインキュベーションが必要であるため、DNA の切断が問題となる。そこで、DNA の変成条件、bisulfite 反応時のポリアミンの添加、Tetrahydrofurfuryl alcohol の添加など種々の条件を検討した。

第 2 は、精子のゲノムの切断や、受精後プロタミンのヒストンへの置換後のヒストン修飾の解析を行うためのクロマチン免疫沈降 (ChIP) の微量化である。最終的には個々の精子での解析を行うため、単一細胞での解析を目指し、DNA 回収率の向上や精密な条件検討のため、PCR による 1 分子ずつの解析を行うために droplet PCR を用いて正確に何分子が解析できているかを検定した。

また、EnIGMA 法、ChIP-seq いずれにも共通して、そもそも何分子からかシーケンスができているのかを明らかにするために、例えば次世代シーケンサーでの解析にあたって、ライブラリー作成のための PCR 前にそれぞれの分子にランダムな配列を持つアダプター (random barcode adaptor) を付加したのち PCR 増幅を行い、シーケンス後の解析から同一の分子由来のシーケンス結果をまとめて単一分子の解析を行う手法を適用した。

4. 研究成果

我々が開発した EnIGMA 法を用いた mC、hmC 及び C の同時解析においては、当初 200ng 程度のゲノム DNA が必要であった。本研究において検討の結果、数 10 ng のゲノム DNA があ

れば 95%以上という高い精度での解析に成功した。また、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドでの解析も可能であることを確認できている。Bisulfite 反応の部分の反応条件の検討を行ったが、個々の条件検討で DNA の切断を抑えて効率を向上しても 2 倍程度の向上にとどまり、これらを組み合わせても、現在のところ単一遺伝子座での解析には十分な精度での解析は 1,000 細胞程度の細胞が必要と見積られるため、実際に単一のヒト精子を用いた解析を進めるためにはさらなる技術改良が必要である。現在も検討は継続中であるが、これまでのところゲノム中に多数コピーが存在する反復配列については、すでにかなり少数の細胞での解析が可能であると考えられたため、マウスの細胞 5 個程度から L1 配列について random barcode 法を併用した EnIGMA 法による解析を試みた。その結果 200 分子以上の L1 配列の解析が可能であることが明らかとなった。したがって、L1 と同程度のコピー数を持つ反復配列であれば単一精子からでも 40 分子程度の解析は可能であると見積られる。

ChIP-seq に関しても micro-ChIP と言われる既存の手法の検討を行ったが、解析に必要な細胞数は同様に 1000 細胞程度にとどまった。また、次世代シーケンサーを用いた解析を行うためサンプルを PCR によって増幅する際に、分子間での増幅の偏りが生じないように、droplet PCR を用いることで均一な増幅を行い、一段の精度向上を目指して検討を行っているが、今のところ十分な増幅量が得られておらず、さらなる条件検討が必要であると考えている。

EnIGMA 法に関しては、反復配列について単一精子での解析がある程度可能となったと考えられるので、今後精子の形態学的・生化学的な評価とゲノムの網羅的シトシン修飾解析を行い、エピジェネティックな評価基準の確立を目指したい。

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0件)

[学会発表](計5件)

発表者名: 幸田尚、川崎佑季、石野史敏
標題: DNMT1 を用いた新しいヒドロキシメチルシトシンの同定法-EnIGMA 法の開発 学会等名: 日本エピジェネティクス研究会
発表年月日: 2014 年 5 月 25 日~27 日 発表場所: 東京大学(東京都)

発表者名: 黒田 友紀子、川崎 佑季、幸田尚、石野 史敏 標題: DNMT1 を用いたヒドロキシメチルシトシンの定量的検出法
学会等名: 日本分子生物学会 発表年月日: 2014 年 11 月 25 日~27 日 発表場所:

パシフィコ横浜(神奈川県)

発表者名: 幸田尚、川崎佑季、石野史敏
標題: ヒドロキシメチルシトシンの新たな同定法-EnIGMA 法によるシトシン修飾解析
学会等名: 日本エピジェネティクス研究会
発表年月日: 2015 年 5 月 25 日~26 日
発表場所: 学術総合センター橋講堂(東京都)

発表者名: 川崎 佑季、黒田 友紀子、石野史敏、幸田尚 標題: ヒドロキシメチルシトシンとメチルシトシンを同時解析する新たな解析技術 EnIGMA 法の開発 学会等名: 日本分子生物学会 発表年月日: 2015 年 12 月 1 日~4 日 発表場所: 神戸国際会議場(兵庫県)

発表者名: 高木 清考、原田 竜也、久保田俊郎、石野 史敏、幸田尚 標題: ヒト胚盤胞期胚の年齢による遺伝子発現変化
学会等名: 日本分子生物学会 発表年月日: 2015 年 12 月 1 日~4 日 発表場所: 神戸国際会議場(兵庫県)

[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]
ホームページ等
<http://www.tmd.ac.jp/mri/epgn/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

幸田 尚 (KOHDA, Takashi)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授
研究者番号: 60211893

(2) 研究分担者

久保田俊郎 (KUBOTA, Toshiro)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：50126223

原田竜也 (HARDA, Tatsuya)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・講師
研究者番号：80376748

(3)連携研究者

()

研究者番号：