

小倉発生遺伝工学研究室

主任研究員：小倉 淳郎 (D.V.M., Ph.D.)



(0) 研究分野

分科会：生物

キーワード：受精、ゲノム再プログラム化、生殖細胞、エピジェネティクス

(1) 研究背景と研究目標

哺乳類のライフサイクルの中で、大規模なエピジェネティクス改変が生じるイベントの分子メカニズムの解明を目指す。すなわち、受精によってどのように新しい命が始まるか、生殖細胞ゲノムはいかにして確立するか、そして最初の細胞系列の分岐である胎仔側と胎盤側のエピジェネティクスはどのように決まっていくのかを明らかにする。この目的のためには、正常な発生胚のみならず、さまざまな人為的操作（発生工学操作）によって特殊胚（核移植胚や顕微授精胚など）や幹細胞を作出し、解析する必要があるため、これらに必要な技術も開発する。解析対象の動物には、関連技術やゲノム情報がもっとも豊富にそろっているマウス (*Mus musculus*) を主に用いている。本研究室の強みは、自ら開発した発生工学技術や幹細胞作出技術を最先端のゲノム・エピゲノム解析技術を組み合わせることによって、独自のデータを蓄積できるところにある。この結果、上記の困難な目標に挑むことができる。

(2) 2019年度成果と今後の研究計画(中長期計画2025年度まで)

(A) 体細胞核移植(SCNT)胚におけるエピジェネティクス状態の解析

SCNT は、1個の体細胞から1匹の動物を作出することができる唯一の生殖工学技術である。このため、基礎生物学から産業応用までさまざまな重要な可能性を秘めているが、核移植産子の出産率は極めて低い。近年我々は、SCNT胚におけるX染色体不活化の正常化および抑制性のヒストン修飾である H3K9me3の除去によって約20%まで出生率を高めることができた。しかし胎盤の異常（過形成）は改善されなかったため、今年度は、その解決を目指した。その結果、ノックアウト技術を用いて胎盤特異的なH3K27me3依存性刷り込み遺伝子である *Sfmbt2* のイントロンに存在するmiRNA群の刷り込み消去による異常発現（両アレル発現）を本来の母性発現に戻したところ、胎盤の異常は有意に改善した（図1）。すなわち、SCNT特異的な胎盤異常は、H3K27me3依存性刷り込み遺伝子のうちでも、*Sfmbt2*のさらに内部にある miRNAの発現亢進が原因であることを突き止めた。しかしながら、着床直後の胎盤発生低下は改善していなかったため、今後、その原因を解明する必要がある。

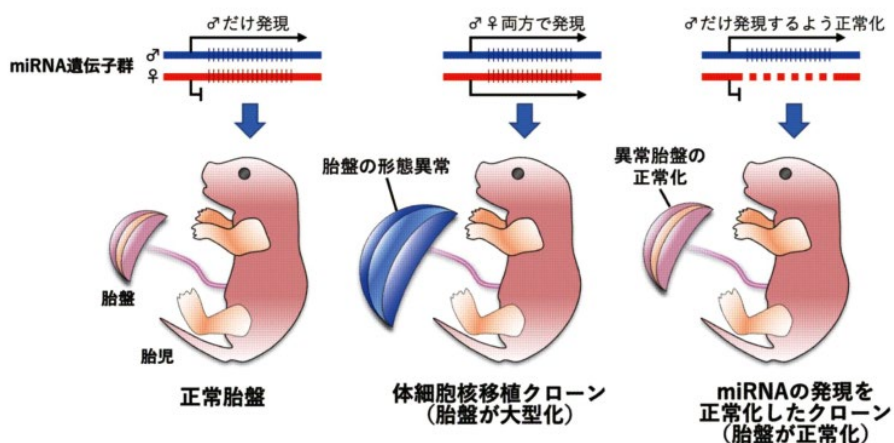


図1. 胎盤特異的刷り込み遺伝子 *Sfmbt2* のイントロンに存在するmiRNA群の刷り込み発現パターンの正常化（父方発現）を母方アレルのノックアウトを導入して回復させることによってSCNT特異的な胎盤発生異常が改善した。

(2025年度までの研究計画) SCNT胚のエピジェネティクス状態の解明をさらに進めることによって、SCNT産子の出生率を実用的なレベル（胚移植20-30%）まで改善させる。具体的には、SCNT胚や胎盤のヒストン修飾および遺伝子発現を詳細に検討する。最終的には、他の産業や疾患モデル動物にも応用できる技術を確立する。

(B) 胚体側および胚体外側(胎盤側)の確立にかかわるエピジェネティクス基盤の解明

胎盤は哺乳類特有の臓器であり、胚の着床前後に最初に分岐する細胞群から形成される。我々は、この胎盤発生系の細胞分岐には、ヒストンH3のバリエーションであるH3.1が重要な働きをすることを突き止めた。胎盤系の幹細胞であるtrophoblast stem cells (TSC) と胚体系の幹細胞であるembryonic stem cells (ESC) を次世代シーケンサーを用いたChIP-seqによって解析をした結果、TSCには、約10 MbにわたるH3.1の大きなドメインが遺伝子間領域に形成されていることを発見した。この大きなドメインは抑制性ヒストン修飾であるH3K9me3が重なっており、大きなヘテロクロマチン領域を形成していることが示唆された。同様の規模のドメインは、in vivoの胎盤組織でも存在していることを確認した。また、興味深いことに、これらのドメインは、着床前にすでに形成されていることがわかった。H3.1ヒストンシャペロンであるCAF1をノックダウンしたところ、TSCはESCのマーカーであるOct3/4を発現し、またTSCのマーカーであるCdx2やElf5などを発現させた。以上の結果から、胎盤系の細胞分化にはH3.1が重要な働きを担っていることが示された。

(2025年度までの研究計画) 今後、胚体外組織特有のエピジェネティクスを明らかにし、その分化に関わる分子メカニズムを明らかにする。これによって、哺乳類特異的に進化した胎盤関連のエピゲノム機構を同定していく。

(C) 哺乳類の受精機構の解明

受精が成立するためには、精子は卵子の周辺に存在する透明帯を通過しなければならない。その通過には、主な精子先体のタンパク質分解酵素であるアクロシンが関与すると考えられたが、アクロシンノックアウト(KO)マウスおよびラットは正常な繁殖能を持つ。そこで、最初に精巣上体精子のIVFに成功し、受精機構の解明に貢献してきたゴールデンハムスターを用いて、改めて解析を行った。CRISPR法を用いてアクロシンKOハムスターを作製し、アクロシンの役割を解析した。KOハムスター精子はアクロシンタンパク質が発現しておらず、酵素活性も見られなかった。ホモKO雄の自然交配では、雌の膈内に精子が確認されても妊娠せず、雄の不妊が確認された。また体外受精後、KO精子を媒精した卵子では雄性前核が見られなかった(図2)。しかし透明帯を除去した卵子とは受精したことから、アクロシンは透明帯浸入に関与することが明らかになった。マウスとラットの先体は他の哺乳動物に比べて極端に小さいので、マウスとラットはむしろ特殊な受精機構を備えている可能性がある。

(2025年度までの研究計画) 今後、適切なモデル動物を用いることにより、受精機構の解明を進め、必須の因子を同定していく。その結果は、ヒトの男性不妊の原因解明および治療に役立つことが期待される。

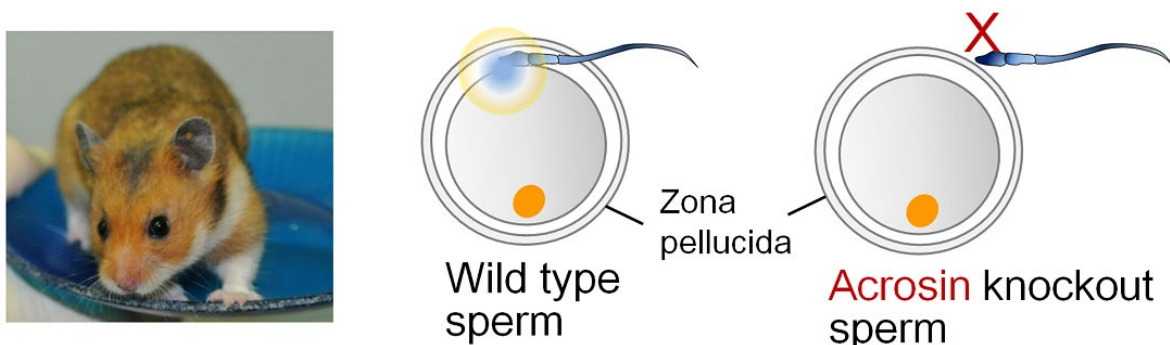


図2. アクロシン KO ハムスターによって、アクロシンが正常な受精に必須であることが明らかになった。アクロシンKO精子は、透明帯に結合できるが、通過できないため、卵子表面に到達できない。精子の透明帯通過には、精子の強力な前進運動能だけでなく、先体タンパク質分解酵素も重要な役割を果たすことが示された。

(3) 研究室メンバー
(主任研究員)
小倉淳郎

(2019年度)

(4) 発表論文等

1. “Birth of a marmoset following injection of elongated spermatid from a prepubertal male.”, Ogonuki N, Abe Y, Kurotaki YK, Nakao K, Aiba A, Sasaki E, Ogura A., **Mol Reprod Dev** 86, 928-930, (2019).
2. “Paternal knockout of Slc38a4/SNAT4 causes placental hypoplasia associated with intrauterine growth restriction in mice.”, Matoba S, Miura K, Hirose M, Shiura H, Kohda T, Nakamuta N, Ogura A., **Proc Natl Acad Sci USA** 116, 21047-21053 (2019).
3. “Early production of offspring by in vitro fertilization using first-wave spermatozoa from prepubertal male mice.”, Mochida K, Hasegawa A, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A., **J Reprod Dev** 65, 433-441 (2019).
4. “How to improve mouse cloning.”, Ogura A., **Theriogenology** 150, 215-220 (2020).
5. “Acrosin is essential for sperm penetration through the zona pellucida in hamsters.”, Hirose M, Honda A, Fulka H, Tamura-Nakano M, Matoba S, Tomishima T, Mochida K, Hasegawa A, Nagashima K, Inoue K, Ohtsuka M, Baba T, Yanagimachi R, Ogura A., **Proc Natl Acad Sci USA** 117, 2513-2518 (2019).

Laboratory Homepage

https://www.riken.jp/research/labs/brc/bioresour_eng/index.html

<https://ja.brc.riken.jp/lab/kougaku/index.html>