

京都大学教育研究振興財団助成事業
成果報告書

2024年4月24日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会長 藤 洋作 様

所属部局 医学研究科附属動物実験施設

職名 特定助教

氏名 守田 昂太郎

助成の種類	令和5年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究課題名	ラットの胚性ゲノム活性化を制御するヒストン修飾の局在領域の同定			
上記以外で助成金を 充当した 研究内容	扱いが容易な小型のゲノム編集ラットを作製し、1ケージあたりの飼育頭数を増やすことで効率よく受精卵を得て、初期胚の研究に用いるためのリソース開発			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名) 特になし			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) 第46回日本分子生物学会年会「Ghr遺伝子を欠損した小型ラットの行動解析」			
成果の概要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会計報告	交付を受けた助成金額	1,000,000	円	
	使用した助成金額	1,000,000	円	
	返納すべき助成金額	0	円	
	助成金の使途内訳	費目	金額(円)	
		試薬・消耗品	115,731	
		備品(実体顕微鏡用蛍光アダプタ)	271,150	
		RNA-Seq解析費用等	551,657	
		国内学会参加費	21,000	
国内学会旅費	25,700			
国内学会年会費	14,762			
当財団の助成につ いて	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 科研費が採択されなかった時に貴財団の研究助成を受けることができたおかげで、RNA-seq等の高額な解析費用を必要とする受託の依頼や高額な抗体、研究試薬を購入することができ、学会への参加及び発表を行うことができた。科研費を申請していた時の計画通りに進めることができたと思います。貴財団の助成がなければ、令和5年度は自由に研究できる予算がなくデータを出すことが困難でしたので非常に助かりました。			

成果の概要/守田昂太郎

本研究の背景と目的

我々を含む哺乳動物の受精卵は、一定の時間を経た後に DNA・ヒストンのメチル化やアセチル化などのエピゲノムが急激に変化し、胚由来の遺伝子が新規に発現する胚性ゲノムの活性化 (ZGA) と呼ばれる現象が起こることが発生には必須である。本研究では、マウスとは異なり、ヒトにより近いタイミングで ZGA が生じるラット初期胚を用いて、ヒストン修飾やその制御領域がマウスとはどのように異なるか、ヒトと共通しているかどうかを明らかにすることを目的として研究を行った。

行った実験結果と成果

2023 年度の研究成果として、まずラット初期胚 (未受精卵、受精卵、2 細胞期胚、4 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実期胚) を自然交配したラットからサンプリングして RNA-seq を行った。RNA-Seq の結果から未受精卵、受精卵、2 細胞期胚のグループ間が転写産物に相関が強く、4 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実期胚のグループ間で相関が強いことが明らかになった (図 1)。これらの結果は 4 細胞期から転写産物が大きく変化することを示しており、major ZGA がラットは 4 細胞期から生じることが示唆された。また、転写産物を調べると、BET ファ

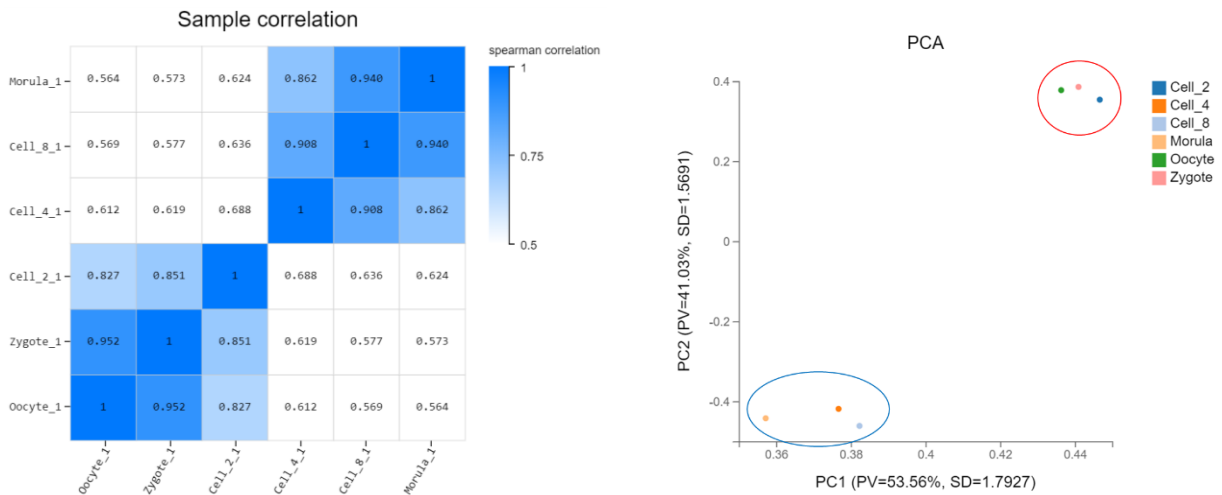


図1 RNA-seq解析の結果

左:ラット初期胚の各ステージの転写産物を比較したヒートマップ

右:ラット初期胚の各ステージの転写産物を比較した主成分分析(PCA)

ミリー遺伝子のひとつである、Brdtが major ZGA の直前の minor ZGA の時期である 2 細胞期に高発現していることを発見した。Brdt の発現量としては、2 細胞期胚において検出された全 mRNA の中で TOP20 以内に入っていたため、非常に高レベルに発現して胚発生過程に

において重要な機能を担っている可能性が考えられた。

BRDT タンパク質の結合基質であるアセチル化ヒストン(H3K27ac)に関しては、これまで我々が以前から行っていた免疫染色の解析で、マウス及びラットの初期胚の ZGA が起こる直前の時期から高レベルに検出されることを発見してからはこの修飾に関して注目してきたが、同時期にマウス胚の ZGA に H3K27ac が関与していることが他の研究グループから報告され、ラット胚においても H3K27ac が ZGA に関与している可能性が高いことが分かった。また、我々はこれまでに H3K27ac に結合する BRDT に関しては RNA-Seq を行う前から注目してきた因子であり、その阻害剤を用いて受精卵を体外培養すると、2細胞期胚で発生が停止することを明らかにした。そのため、次に我々は Brdt-mCherry mRNA を作製してラット受精卵の細胞質にマイクロインジェクションすることで BRDT タンパク質を過剰発現させて ZGA へ及ぼす影響を観察した。その結果、1細胞期での ZGA の活性化はラット胚では起こらなかったものの、2細胞期胚においては RNA 合成が促進された(図1)。このことから BRDT は2細胞期で起こる minor ZGA の開始に重要な働きをしていることが分かった。

近年では、マウスやウシにおいてアセチル化を認識して除去する HDAC が ZGA のタイミングで発現しアセチル化ヒストンを除去することが必須であることが報告されている。そこで、HDAC を発現する mRNA をラットの受精卵の細胞質へマイクロインジェクションしてタンパク質を強制発現させたが、ZGA が早期から生じるような変化は認められなかった。BRDT タンパク質は H3K27ac に結合することが知られているが、生化学的に H4K5ac との親和性が H3K27ac より高いことも最近報告されている。そこで、H4K5ac の役割にも注目し、まずは2細胞期胚と4細胞期胚で免疫染色を行った結果、H4K5ac のシグナルが2細胞期では核内の DNA が密集していない領域に存在しているのが認められた。また、4細胞期では、H4K5ac の核内における局在が変化し、よりブロードに核内に広がって局在している様子が認められた。これらのことから、H4K5ac も2細胞期胚以降の転写活性化に何らかの役割を果たしている可能性が考えられた。H3K27ac や H4K5ac の機能を調べるために我々は H3 及び H4 を発現するプラスミドを用意し、H3K27 をアルギニンに置換した H3K27R と H4K5 をアルギニンに置換した H4K5R を発現するプラスミドを合成した。今後は mRNA を合成後、ラット受精卵の細胞質へマイクロインジェクションして胚発生及び ZGA へ及ぼす影響を明らかにする。

今後の計画と将来期待される成果

少量の細胞数でクロマチン領域の同定が可能な Cleavage Under Targets and Tagmentation (CUT&Tag)法を用いてラット初期胚でも調べられる実験系を確立しようと現在試みており、

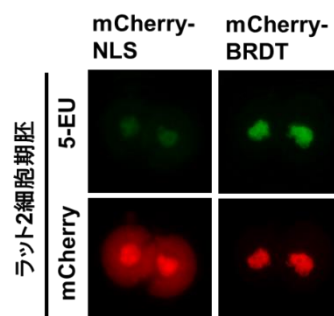


図2 BRDT過剰発現が2細胞期の転写活性に及ぼす影響
mCherry-NLS: コントロール区、
mCherry-BRDT: BRDT 発現区

CUT&Tag によってラット初期胚のゲノムにおける H4K5ac の領域を同定して ZGA 遺伝子の発現との関連を明らかにする予定である。近年、ウシの胚盤胞期胚わずか 1 個で CUT&Tag が成功したとの報告が京都大学の別のラボから報告があり、協力を得ながら進めたいと考えている。応募者は当初 H3K27ac に着目してラット初期胚に及ぼす影響を調べてきたが、近年の報告では、マウス等の動物種でも H3K27ac と ZGA の関連が明らかにされてきているので、H4K5ac を調べることでより新規の分子メカニズムを明らかにできると考えられる。H4K5ac に関する知見は H3 の様々なアセチル化・メチル化修飾よりも圧倒的に少なく、初期胚においてはほとんど調べられていないため、ZGA との関連を明らかにすることで有用な知見となると考えられる。ZGA を制御するヒストン修飾の局在領域がラットとヒトで共通して存在している箇所がマウスよりも多ければ、ヒトの ZGA 研究にラットを用いることができると考えられる。また、ZGA の開始時期は生物種によって異なっているため、ラットを用いて ZGA を制御する機構を明らかにすることで、なぜマウスの時期と異なるのか、マウスの ZGA はなぜ早く生じるのか等、それらの生物学的意義の解明に貢献するだけでなく、得られた知見が将来的にヒトの生殖補助医療の発展に貢献することが期待される。