

課題番号 34

マウス 1 細胞期胚におけるセリン代謝による発生制御機構とその機能の解明

〔1〕組織

代表者：大我 政敏

(麻布大学獣医学部)

対応者：林 陽平

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 13 万円

〔2〕研究経過

1-2 細胞期胚は一つの細胞から個体を形成することができる唯一の細胞である。この個体を形成することができる能力は、“分化全能性”あるいは単に“全能性”と呼ばれる。本研究の目的は、この全能性を生み出す制御メカニズムを明らかにすることである。そしてさらに、得られた知見から、少子化に喘ぐ我が国にとって喫緊の課題とされ改善が望まれる不妊症の治療および改善に繋がる代謝改善の知見の取得を目指す。1 細胞期胚は、生殖細胞として分化した精子と卵子が受精することで生じる。このように受精を前後に細胞は高度に分化した状態から未分化な状態へと変化する。この変化は“初期化”と呼ばれる。初期化は induced Pluripotent Stem (iPS) 細胞が作られる際にも生じる脱分化に対しても使われがちではあるが、分化した細胞が多能性を持つ iPS 細胞になると、生殖細胞が分化全能性を獲得する受精時に起こる変化は全くの別物である。近年、細胞の性質の変化には代謝が重要であることが明らかにされている。細胞の状態が変化する際に栄養の要求性などが変化するなどが挙げられる。我々は高度な分化状態から全能性へと変化する初期化の際には、代謝もまた大規模な変化を遂げ、その後の胚発生に重要な役割を果たすと考えた。

これまでの林博士との共同研究により、エピゲノム制御に重要な Ser 代謝経路 (SGOC 経路, 図 1) の阻害剤 (CBR-5884: 以下 CBR) 処理が精子由来の雄性前核におけるヒストンのメチル化の消失と 1 細胞期での胚発生の停止を引き起こすことを見出していた。そ

こで本研究ではこの現象に着目し、SGOC 経路が全能性獲得時にエピゲノム制御に重要であると考え、その機能を明らかにすることを試みた。

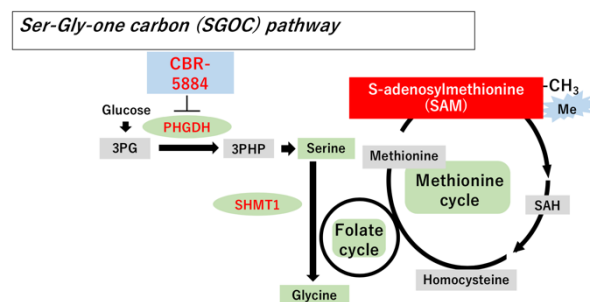


図 1 SGOC 経路の概要

まず、以下に研究活動状況の概要を示す。

2024 年 8 月 20, 21, 22 日 対面

2024 年 12 月 25, 26 日 対面

2025 年 3 月 6, 7, 8 日 対面

上記以外にもメールおよび LINE のテキスト送信による進捗報告と方向性についての週に 1 度以上の頻度で discussion を頻繁に行っている。

〔3〕成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。まず第 1 に、SGOC 経路の阻害による 1 細胞期での胚発生の停止 (1-cell arrest) が、転写によって引き起こされていることを見出した。古くから知られていることであるが、1 細胞期から 2 細胞期への卵割は卵形成過程に蓄積された mRNA やタンパク質 (母性因子) によって制御されているため、1 細胞期における転写産物に依存しない。そのため、この時期の転写を阻害しても卵割は問題なく起こる (Nature 1974)。この性質を活用して、SGOC 経路阻害によって生じたエピゲノム異常下での遺伝子発現異常が 1-cell arrest の原因である可能性を検証した。CBR 処理に加え、alpha-amanitin (ama) による転写阻害をおこなった胚の卵割率を調べた。コントロールとして、CBR のみ、あるいは、ama のみで処理した胚についても同様に卵割率を調べた。興味深いことに、CBR+ama 処理胚は、コントロールの ama 処理並みの卵割率を示した。このことから、CBR 処理による 1-cell arrest は、異常な転写によって起こ

るものと考えられた。一見必須ではない転写がエピゲノム破綻によって乱されて胚発生にとって有害となるのではないかと考えた。しかしこの考えとは違う関連性が以下の実験で示されることになった。

エピゲノムと転写は相互に制御を行っている。つまり、エピゲノムによって遺伝子発現は制御されるが、メチル化酵素あるいは脱メチル化酵素の発現量の変化によってまた、当然エピゲノムも制御を受けている。上記の異常な転写が雄性前核におけるメチル化の消失の上流である可能性を検証するために、CBR+ama 処理胚について、H3K4me3, H3K27me3 について調べたところ、CBR を阻害しつつ SAM を相補した CBR+SAM 区と同等レベルまでメチル化が回復した。つまり、SGOC 経路阻害による雄性前核でのヒストンの脱メチル化状態は転写によって引き起こされる可能性が考えられた。続いて、SGOC 経路阻害下で生じる異常な転写の産物がタンパク質となって、メチル化阻害に関与しているのかを検証するために、転写の阻害ではなく、翻訳を阻害してもメチル化の消失が回復するのかを調べた。その結果、シクロヘキシミド (CHX) で翻訳を阻害した CBR 処理胚では H3K4me3 が DMSO 処理区と同等レベルであった。以上の結果をまとめると、SAM の合成を阻害したことで、単純にメチル基のドナーの減少によって、ヒストンのメチル化が消失するのではなく、遺伝子発現を介して、雄性前核における新規のメチル化を阻害、あるいは、脱メチル化が活性化しているものと考えられた。

SGOC 経路阻害によって発生が停止する 1 細胞期胚内でどのような変化が生じているのかを知るために、CBR 処理胚について、RNA-seq を行った。1 細胞期胚は転写活性が低く、また、母性因子としての mRNA が豊富であるため、発現変動遺伝子の同定は難しいが、Go term として "p53 signaling pathway" が上位に挙がってきた。そこで、DNA 損傷が生じているのではないかと考え、DNA double strand break のマーカーである、gamma H2A.X (γH2A.X) の有無を CBR 処理胚、CBR+SAM 胚、CBR+ama 胚とコントロールとしての DMSO 胚について調べた。期待した通り、CBR 処理胚の雄性前核では高レベルの γH2A.X が検出された一方で、雌性前核は DMSO と同レベルであった。したがって、ヒストンのメチル化の消失したことで、DNA double strand break が引き起こされたことが示唆された。この仮説を支持するように、CBR+SAM, CBR+ama の雄性前核でのメチル化が回復した胚では、CBR 処理しているにも関わらず γH2A.X は DMSO と同レベルであった。最後に、ヒストンのメチル化の消失と DNA 損傷の関連をさらに検証するために、先行研究 (OncoTarget and Therapy, 2020) において、脱メチル化酵素阻害剤

として、SGOC 経路阻害による H3K4me3 の脱メチル化を阻害すると報告されている JIB-04 (以下 JIB) を用いた。JIB により、H3K4me3 の脱メチル化を阻害することで DNA 損傷が回復するかを調べたところ、JIB 処理では受精卵における H3K4me3 の上昇は確認できなかった。しかし重要なことに、γH2A.X の顕著な減少が見られ、DMSO 処理区と同等レベルまで回復していた。このことから、消失することで DNA 損傷を引き起こすヒストンのメチル化を特定はできていないものの、やはりヒストンのメチル化の消失が DNA 損傷のトリガーである可能性が示された。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究は 2024 年度より挑戦的研究(萌芽)に採択され、今後更なる発展が期待される。本研究成果で注目しているのは、CBR 処理により、異常な遺伝子発現が生じたと推測される点である。我々は、ヒストン以外のメチル化反応が、受精後の遺伝子発現、特に、minor ZGA (zygotic gene activation) の制御として重要なのではないかと考えている。例えば、転写因子に対するメチル化が minor ZGA の制御機構に重要なものかもしれない。転写因子のメチル化は、その立体構造を変化させ、標的 DNA や相互作用をする他の因子とのアフィニティを変化させる、あるいは、核内局在が変化させられることが知られる。Minor ZGA の代謝機能による制御について、我々が知る限りこのような知見がないため、minor ZGA の制御機構解明のための新しい道筋を切り開くことになるかも知れない。

[4] 成果資料

招待講演

- (1) 第 97 回日本生化学会大会 1513m 「環境因子による世代間伝播の生化学」「受精後 1 日のセリン代謝攪乱が当代の胚発生および次世代に及ぼす影響」大我政敏 2024 年 11 月 6 日 横浜
- (2) 第 47 回分子生物学会大会 生殖代謝学: 栄養と代謝による生殖サイクルの制御 「マウス 1 細胞期胚のエピゲノム制御における SGOC 経路の機能解析」大我政敏 2024 年 11 月 27 日 博多

学会発表

- (1) 第 117 回日本繁殖生物学会大会 SGOC 経路による minor ZGA 依存的エピゲノム制御とゲノム安定性維持機構 畠山愛美, 金丸奈々, 中前沙那, 長久保光貴,,, 林陽平, 大我政敏 2024 年 9 月 22 日 名古屋
- (2) エピゲノム研究会 染色体ワークショップ Regulation of Epigenome Reconstruction Immediately after Fertilization via the Serine Metabolism Yohei Hayashi,,, Masatoshi Ooga, 2025 年 1 月 20 日 熊本