

多階層オミックスによる卵子の発生能制御分子ネットワークの解明

Omics approaches towards the elucidation of the molecular network regulating the developmental capacity of the mammalian oocyte

課題番号：18H05214

佐々木 裕之 (SASAKI, HIROYUKI)

九州大学・生体防御医学研究所・教授



研究の概要（4行以内）

卵子は有性生殖を行う全ての動物の次世代を担う細胞であり、発生に必要な基本的なプログラムをほぼ全て有している。本研究では、哺乳類のモデル生物であるマウスにゲノム編集と多階層オミックスの技術を適用し、卵子の抑制型プログラムは如何にして構築・維持・伝達されるのか、また、その破綻は受精卵の発生に如何なる影響を与えるのか、の2点を明らかにする。

研究分野：分子生物学、発生学

キーワード：卵子、オミックス、エピゲノム、ゲノム編集、機械学習

1. 研究開始当初の背景

動物の卵子が持つ発生プログラムは、基本的には転写因子のカスケードとエピゲノム修飾（DNAメチル化・ヒストン修飾等）からなり、後者には活性型のプログラムと抑制型のプログラムがある。しかし人工多能性幹細胞の登場以来、活性型プログラムの因子の同定に労力が割かれ、抑制型プログラムには不明な点が多い。一方、遺伝子に変異を導入するゲノム編集技術、微量サンプルに適用可能な多階層オミックス技術、及び生物に適用可能な数理学的手法の進歩により、卵子において抑制型プログラムを研究する舞台が整ってきた。

2. 研究の目的

本研究では哺乳類の実験モデル動物であるマウスを対象として、ゲノム編集技術及び多階層オミックス技術を駆使し、受精後の発生を支える卵子の抑制型プログラム（抑制型のエピゲノム修飾）の確立と維持に係る分子ネットワークを明らかにする。特に初期発生に不要な（又は有害な）遺伝子（生殖細胞形成遺伝子や体細胞遺伝子）の抑制、転移性遺伝子の抑制、片親性発現を規定するゲノム刷り込み等を担う抑制型のプログラムに着目し、DNAメチル化酵素、ヒストンメチル化酵素、及びそれらの制御因子のクロストークを明らかにする。

具体的には、(1) 卵子内の抑制型エピゲノム制御因子のネットワークを明らかにする；(2) 卵子内エピゲノム制御因子の発生プ

ログラムへの影響を明らかにする；(3) エピゲノム制御因子の新たな機能を明らかにする；(4) 受精を経て伝達される抑制型プログラムの特性を明らかにする、の4つの目標を達成する。

3. 研究の方法

卵子の抑制型エピゲノム修飾であるDNAメチル化及び3つのヒストン修飾に関わる6種類の鍵分子（Dnmt3a [DNAメチル化酵素]、Uhrf1 [維持DNAメチル化因子]、G9a [H3K9me2修飾酵素]、Setdb1 [H3K9me3修飾酵素]、Setd2 [H3K36me3修飾酵素]、Stella [DNAメチル化保護因子]）に着目し、ゲノム編集技術、多階層オミックス技術を駆使して、その制御ネットワークと生物学的作用の全体像を明らかにする。また、収集したエピゲノムデータに機械学習・数理モデリングを適用し、エピゲノム変化の次世代への伝達を予測可能にするモデルを構築する。

4. これまでの成果

(1) 卵子内の抑制型エピゲノム制御因子のネットワークを明らかにする：6種類の鍵分子のうちのG9a [H3K9me2修飾酵素]が卵子のH3K9me2導入に必須であること、しかしDNAメチル化への影響は僅少であることを発見した。このH3K9me2とDNAメチル化の関係は体細胞のそれと異なっており、定説を覆す結果であった (*Cell Rep.* 2019)。また、H3K9me2/3がクロマチン相互作用ドメインに与える影響を調べるため、G9aとSetdb1

[H3K9me3 修飾酵素]の欠損卵子について清華大の Xie らと共同研究を行った。微量 Hi-C 解析の結果、H3K9me2/3 の相互作用ドメインへの貢献は確認できず、むしろポリコム複合体が導入する H3K27me3 が有意に関連するという興味深い結果を得た (*Mol. Cell* 2020)。さらに、以前から共同研究を進めていた京大斎藤らによるヒト人工多能性幹細胞からの卵原細胞の誘導について、ゲノムワイドな DNA 脱メチル化、インプリント消去、X 染色体再活性化等生体内の卵子で生じるエピゲノム変化が培養皿内で再現されていることを確認した (*Science* 2018)。

(2) 卵子内エピゲノム制御因子の発生プログラムへの影響を明らかにする：G9a 欠損卵子はヘテロクロマチン再構成と受精後の染色体分配の異常を示すこと、そのため一部の胚が着床前に致死であることを発見した (*Cell Rep.* 2019)。他の成果を合わせると、全体的にヒストン修飾酵素の欠損では早期の致死性が見られ、Dnmt3a の機能ドメインに導入されたアミノ酸置換では表現型がないか、あってもより後期の致死性であることが明らかになりつつある。

(3) エピゲノム制御因子の新たな機能を明らかにする：Uhrf1 [維持 DNA メチル化因子] 欠損卵子の DNA メチル化異常と受精後の着床前致死性については既に報告したが、今回、正常胚との核・細胞質の置換実験により、致死性の原因が核ではなく細胞質にあることを突き止めた。さらに、微量プロテオミクス解析により、欠損卵子における特定のタンパク質の著減が見つかった。一方、これらのタンパク質の mRNA は減少していなかった。これらの結果は、Uhrf1 が細胞質で新たな機能を持つことを示しており、現在これまでの結果を投稿準備中である。

(4) 受精を経て伝達される抑制型プログラムの特性を明らかにする：予備的解析の過程で、この特徴抽出問題はかなり難度の高い問題であることが判明した。そのため、配列モチーフ探索のための畳み込みニューラルネットワークと様々な特徴量解析を同時に行うマルチモーダル・ニューラルネットワーク分類器の学習と解析を行う；個々の DNA メチル化部位の属性（構造や転写されるか否か等）情報により正負例データをより精緻に分類し文脈依存的に解析を実施する、の二つのアプローチから解析を進めている。また、畳み込みニューラルネットワークで卵子のエピゲノム修飾（DNA メチル化・ヒストン修飾等）同士の関係を説明するモデルを構築した（投稿準備中）。

5. 今後の計画

これまでの研究で見えてきた、H3K36me3 と H3K27me3 を中心とする卵子のユニークな制御ネットワークを明らかにし、エピゲノム制御因子が如何にして細胞骨格を制御するのか解明する。また、機械学習によるネットワークの解明とモチーフなどの特徴の抽出を行う。以って、不妊・流産の原因解明、生殖補助医療技術の改善、疾患感受性関連のエピゲノム変化の伝達機能の解明へ向けて研究基盤を確立する。

6. これまでの発表論文等（受賞等も含む）

(1) Ohishi, H., Au Yeung, W.K., Unoki, M., Ichiyanagi, K., Fukuda, K., Maenohara, S., Shirane, K., Chiba, H., Sado, T., Sasaki, H. Characterization of genetic-origin-dependent monoallelic expression in mouse embryonic stem cells. *Genes Cells* 25, 54-64 (2020).

(2) Du, Z., Zheng, H., Kawamura, Y.K., Zhang, K., Gassler, J., Powell, S., Xu, Q., Lin, Z., Xu, K., Zhou, Q., Ozonov, E.A., Veron, N., Huang, B., Li, L., Yu, G., Liu, L., Au Yeung, W.K., Wang, P., Chang, L., Wang, Q., He, A., Sun, Y., Na, J., Sun, Q., Sasaki, H., Tachibana, K., Peters, A.H.F.M., Xie, W. Polycomb group proteins regulate chromatin architecture in mouse oocytes and early embryos. *Mol. Cell* 77, 825-839 (2020).

(3) Au Yeung, W.K., Brind'Amour, J., Hatano, Y., Yamagata, K., Feil, R., Lorincz, M.C., Tachibana, M., Shinkai, Y., Sasaki, H. Histone H3K9 methyltransferase G9a in oocytes is essential for preimplantation development but dispensable for CG methylation protection. *Cell Rep.* 27, 282-293 (2019).

(4) Tucci, V., Isles, A., Kelsey, G., Ferguson-Smith, A.C., The Erice Imprinting Group (including Sasaki, H., 14th of 20 co-authors). Genomic imprinting and physiological processes in mammals. *Cell* 176, 952-965 (2019).

(5) Yamashiro, C., Sasaki, K., Yabuta, Y., Kojima, Y., Nakamura, T., Okamoto, I., Yokobayashi, S., Murase, Y., Ishikura, I., Shirane, K., Sasaki, H., Yamamoto, T., *Saitou, M. Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in vitro. *Science* 362, 356-360 (2018).

(6) 上原賞（上原記念生命科学財団）(2019)

7. ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/lab/epigenome/>