

ウシ受精卵の発生とエピジェネティクスにおける 葉酸サイクル関連酵素の役割

京都大学大学院農学研究科・准教授 池田 俊太郎

■ 目 的

One Carbon Metabolism (OCM) は葉酸とメチオニンの共役した代謝経路(葉酸サイクルおよびメチオニンサイクル)を軸とし、メチル基やメチレン基などの一炭素グループの相互変換や転移反応を行っている。メチオニンサイクルはウシ初期胚の胚盤胞発生に必須であるが、これと共役する葉酸サイクルを構成する個々の酵素の初期胚発生に対する寄与は不明である。初期胚における葉酸サイクル関連酵素の機能解析は、母体の栄養環境や生殖補助技術における培養系の改善につなげる上で重要と考えられる。そこで本研究では、ウシ初期胚発生において、葉酸サイクルの構成酵素として DHFR、SHMT1、SHMT2、MTR、MTHFR の発現動態を明らかにし、その内 MTHFR について RNAi による発現阻害を行い、初期胚発生や代表的なエピジェネティック修飾であるヒストンのメチル化に及ぼす影響を調べた。

■ 方 法

食肉市場由来のウシ卵巣より卵母細胞を採取して体外成熟・受精後培養し、その過程で GV および MII 期卵子・1-・2-・8-16 細胞期胚・桑実胚・胚盤胞を得た。各サンプルより RNA を抽出し、上記の遺伝子について RT-qPCR を行い、各ステージの発現量を解析した。また、MTHFR の機能解析として、体外受精 3 日後の 8-16 細胞期胚に対しリポフェクション法により siRNA を導入して RNAi を行った。受精 5 および 6 日後の桑実胚について、ノックダウン効率をそれぞれ RT-qPCR およびウェスタンブロッティングにより解析し、受精 8 日後に胚盤胞への発生率を評価した。さらに発生した胚盤胞について、総細胞数、栄養膜 (TE) 細胞数、内部細胞塊 (ICM) 細胞数をそれぞれ計測した。また受精 6 日後の桑実胚について、ヒストン H3 の 4 番目のリジンのトリメチル化 (H3K4me3) の程度をウェスタンブロッティングにより解析した。

■ 結果および考察

内部標準遺伝子に対する相対的な mRNA 発現量について、SHMT1 は桑実胚期以降に、その他の遺伝子は 8-16 細胞期胚以降に発現が低下した。8-16 細胞期以降に RNAi により MTHFR の発現を阻害した区では、MTHFR の mRNA およびタンパク質発現量が対照区に比べ低下した。MTHFR 発現阻害区では胚盤胞発生率、胚盤胞の総細胞数、TE 細胞数、ICM 細胞数のいずれも対照区と比較して有意に低下した ($P < 0.05$)。一方で、H3K4me3 の程度に有意な差は見られなかった。以上の結果よりウシ初期胚における葉酸サイクル関連酵素の発現動態が明らかとなり、MTHFR の胚盤胞発生における重要な役割が示された。また、メチオニンサイクルの阻害が代表的なヒストンのメチル化を低下させるのとは対照的に、今回の MTHFR の阻害条件では少なくとも H3K4me3 には変化がなく、ヒストンのメチル化への影響なしに、胚発生が阻害されていることが示唆され、葉酸サイクルが初期胚発生においてユニークな役割を持つことが考えられた。

■ 結 語

胚自身の MTHFR の機能が胚盤胞発生に明らかに寄与していることが示され、この知見は生殖補助技術や飼養技術を介して資源動物の初期胚発生を改善する上で重要であるだけでなく、様々な交絡因子を持つ臨床データや、多様な葉酸に関する栄養条件の下での解析のために未決定であった、着床前発生における MTHFR の役割について新しい洞察を与えるものと考えられる。