
エピジェネティック修飾情報に基づく家畜受精卵の遺伝子機能解析

京都大学大学院農学研究科・教授 池田 俊太郎

■ 目的

家畜生産において、人工授精や受精卵移植における受精卵の死滅(早期胚死滅)は、子畜生産の大きな抑制要因になっている。エピジェネティック修飾は、DNAの塩基配列を含む構造に化学的な修飾が付加されることにより遺伝子の発現状態が規定され、それが細胞分裂を通じて維持される機構であり、エピジェネティック修飾の違いは細胞の性質を特徴づける。本研究では、著者らが報告したウシ受精卵のヒストンH3の4番目のリジン残基のトリメチル化修飾のデータ解析において、体外受精由来と体内受精由来の受精卵間で修飾量に差異の見られたNOLI/NOP2/Sun domain(Nsun)familyに着目し、マウスをモデルとして、Nsunファミリーの内*Nsun5*の受精卵の発生における機能解析を行い、同遺伝子の早期胚死滅との関連を考察することを目的とした。

■ 方法

ICRマウスから過剰排卵によって排卵卵子を得て、精巢上体精子を用いた体外受精(IVF)により1細胞期胚を得た。IVF後3-6時間の1細胞期胚に*Nsun5*を標的としたsiRNA、あるいは対照として非標的siRNAを顕微注入した。顕微注入24時間後に、逆転写定量PCR(RT-qPCR)を用いて遺伝子の発現抑制効率を検証した。siRNAを導入した胚をIVF後120時間まで培養し、胚盤胞発生率と胚盤胞の直径(IVF後96時間)、透明帯からの孵化率(120時間)を計測した。また、核染色により細胞数(72および96時間)を、TUNEL法によりアポトーシスを検出し、アポトーシスを示した細胞の割合(Dead cell index)(96時間)を評価した。さらに、胚盤胞の細胞分化に関連する転写因子OCT4およびCDX2、転写共役因子YAP1の抗体を用いた免疫蛍光染色によってこれらの因子の陽性細胞数を測定した。統計解析は、2実験区間の比較をt検定によって、3実験区間の比較を分散分析およびTukey-Kramer検定によって行い、 $P<0.05$ を有意とした。

■ 結果および考察

*Nsun5*を標的とする2種類のsiRNAを導入し、RT-qPCRにより*Nsun5*発現量を測定したところ、いずれにおいても効果的に発現が抑制(ノックダウン)されていた。*Nsun5*ノックダウン区では、IVF後96時間における胚盤胞発生率および胚盤胞の直径が対照区に比べ有意に低下した。さらに、IVF後120時間における孵化率がノックダウン区で著しく低下した。培養を144時間まで延長しても120時間において孵化していなかった胚のほとんどが発生を停止し死滅していた。*Nsun5*ノックダウン区では細胞数の低下とDead cell indexの増加が見られた。桑実胚におけるYAP1タンパク質の免疫蛍光染色の結果、*Nsun5*ノックダウン区ではYAP1が核移行している細胞(YAP1陽性核細胞)の数および割合が低下した。また、総細胞数が同等の桑実胚であってもノックダウン区ではYAP1陽性核細胞数が低値を示す傾向があった。さらに、ノックダウン区の胚盤胞ではCDX2陽性細胞数が減少し、総細胞やCDX2陽性細胞の数に対するOCT4陽性細胞の割合が増加した。これらの結果から、*Nsun5*が正常な初期胚発生に不可欠であることが明らかとなり、*Nsun5*遺伝子の機能不全は、孵化が妨げられることによる早期胚死滅を招く可能性が示唆された。

■ 結語

ウシの卵母細胞や初期胚においてもsiRNA導入による*Nsun5*ノックダウンを試みたが、現在導入方法の検討段階であり今後も研究を進めていきたい。