

# ウシ受精卵の新しい遺伝子解析技術を開発

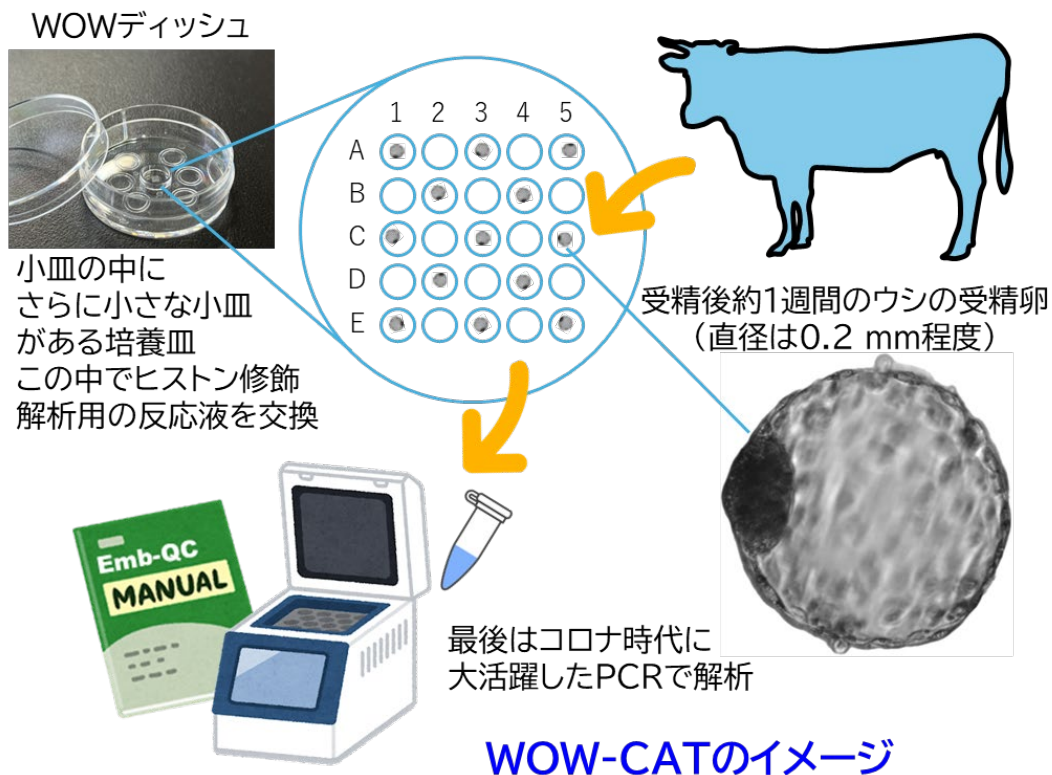
## — 遺伝子のヒストン修飾を簡易に診断 —

### 概要

哺乳動物の受精直後の受精卵は、直径が1ミリメートルにも満たない非常に小さなものです。受精卵の発生能力（妊娠のしやすさや生まれる産子の健康）には個々に差があることが知られており、正常な発生のためには遺伝子が適切に働くことが重要です。遺伝子の基本情報はDNAの塩基配列ですが、その遺伝子の働きがなぜ細胞や個体ごとに異なるかを塩基配列以外の情報で決めている仕組み（エピジェネティクス）があり、DNAが結合しているタンパク質であるヒストンの修飾もその一つです。ヒストン修飾の解析法はすでにありますが、1個1個の受精卵のヒストン修飾解析はその小ささや細胞の少なさから困難でした。

京都大学大学院 農学研究科 池田俊太郎教授、Zeng Yiren 同博士課程学生らのグループは、受精卵の個別培養に用いられている培養皿（WOW ディッシュ）上で、従来の少数細胞用のヒストン修飾解析を行うことによって、単一のウシ受精卵、さらにはその一部の細胞に対して、高感度なヒストン修飾解析が行えることを実証し、WOW-CAT と名付けました。今後、受精卵の発生能力に関連する修飾が見つければ、本法を用いて、受精卵の発生能力の予測や、受精卵の生産方法の品質管理が可能になることが期待されます。

本研究成果は、2024年1月18日に国際学術誌「*BMC Genomics*」にオンライン掲載されました。



## 1. 背景

哺乳動物では雌の体内で卵と精子が受精した後、卵は受精卵となって細胞分裂を繰り返し、やがて妊娠が成立します。現在では体外で卵と精子を受精させ受精卵を妊娠前まで体外で育てる体外受精技術も普及し、家畜生産では特にウシでその利用が進んでいます。色々な環境で育つ受精卵ですが、その発生能力（妊娠のしやすさや生まれる子牛の健康）には個々に差があることが知られています。一つ一つの受精卵の特徴を診断することができれば、子牛生産のための妊娠の成功率や子牛の健康を高めることが期待できます。受精卵の正常な発生のためには遺伝子が適切に働くことが重要ですが、遺伝子の働きに影響するものにヒストン修飾があります。ヒストン<sup>(注1)</sup>はDNAが結合しているタンパク質であり、ヒストンがメチル化やアセチル化といった化学修飾を受けることによって、その近くの遺伝子の働きが変化し、その変化が発生や成長中にヒストン修飾の維持によって継承されます。遺伝子の基本情報はDNAの塩基配列ですが、同じ個体であれば別々の細胞でも一部の例外を除いて同じ塩基配列を持っています。また、同じ生物種の別々の個体間でもDNAの塩基配列はほとんど同じです。ヒストン修飾は、その遺伝子の働きがなぜ細胞や個体ごとに異なるかを塩基配列以外の情報で決めている仕組み(エピジェネティクス<sup>(注2)</sup>)の一つです。ヒストン修飾を調べることは可能になっていますが、細胞数が100個程度しかない単一の受精卵や、その一部の細胞のヒストン修飾を調べることは困難でした。

## 2. 研究手法・成果

本研究では、受精卵の個別培養に用いられているWOWシステム<sup>(注3)</sup>による培養皿(WOWディッシュ)上で、少数細胞のヒストン修飾解析方法であるCUT&Tag<sup>(注4)</sup>を行うことによって、単一のウシ受精卵、さらには受精卵から切り取った一部の細胞に対して、より簡便に、かつ用いる試薬の量も節約した上で、高感度なヒストン修飾解析が行えることを実証しました。操作中に受精卵や細胞を視認しながら、解析に必要な反応液を細胞に触れずに交換できるので、細胞のロスが少ないのが大きな特徴です。この方法(WOW-CUT&Tag, WOW-CAT)は、これまで実施例のなかった単一の受精卵の中の複数のヒストン修飾の解析を可能にしたり、受精卵を切り取った一部の細胞について解析することにより、解析後の受精卵からの子牛生産を可能にするなど、柔軟な応用を可能にしました。WOW-CATを用いて、雌雄に特有なヒストン修飾を検出することにより受精卵の雌雄判定を行ったところ、従来の方法と同等に判定が可能であり、受精卵の特徴づけにWOW-CATが有用であることを実証しました。

## 3. 波及効果、今後の予定

私たちの生活に物心両面で恵みを与えてくれる資源動物について、ヒストン修飾のようなエピジェネティック修飾の解析が世界各地で進んでいます。今後、受精卵の発生能力に関連する修飾が見つければ、その修飾をマーカーとして診断することにより、受精卵の発生能力の予測や、受精卵の生産方法の品質管理が可能になることが期待されます。

## 4. 研究プロジェクトについて

本研究は令和3-5年度JRA畜産振興事業「牛受精卵生産工程の品質管理技術開発事業」、JSPS科学研究費助成事業(19H03104、23H02363)の支援を受けて実施されました。

### <用語解説>

注<sup>1</sup> **ヒストン**：細胞の核の中で DNA の折りたたみを担っているタンパク質。DNA が巻き付いているヒストン（コアヒストン）の様々な化学修飾が、その近くにある DNA の働きに関与している。

注<sup>2</sup> **エピジェネティクス**：細胞分裂を経ても継承可能な、DNA の塩基配列の変化を伴わない遺伝子機能の変化の仕組みやそれに関する学問。エピジェネティクスの一つにヒストンの化学修飾によるものがある。

注<sup>3</sup> **WOW システム**：WOW は the Well of the Well の略。ここでの Well は小さな穴のことで、the Well of the Well は「穴の中の穴」といった意味。一つの小さな培養皿の底面にさらに小さな培養皿があり、そこに 1 個ずつ受精卵を入れることで、一つの培養液の中で複数の受精卵を個別に識別しながら培養することができる。2000 年に Gábor Vajta 博士らが報告した。

注<sup>4</sup> **CUT&Tag**：Cleavage Under Targets and Tagmentation の略。ヒストン修飾に対する抗体の導入から、PCR 増幅に必要な DNA 配列（タグ）の付加までを、解析対象細胞の核内で行う、少数細胞用のヒストン修飾解析法。2019 年に Steven Henikoff 博士らが報告した。

### <研究者のコメント>

私たちは、資源動物の受精卵が持つ有用なエピジェネティック修飾を EMER (EMbryonic Epigenetic Resource の略でエメルと発音) と呼んでいます。今回、動物生産に利用可能な形で雌雄マーカーという EMER の検出ができることが分かりました。今後も引き続き EMER の探索とその利用方法の開発を目指します。

### <論文タイトルと著者>

タイトル： Evaluating histone modification analysis of individual preimplantation embryos  
(個々の着床前胚の評価的ヒストン修飾解析)

著者： Yiren Zeng, Yoichiro Hoshino, Kazuki Susami, Shinnosuke Honda, Naojiro Minami, Shuntaro Ikeda

掲載誌： *BMC Genomics*, 25, Article number: 75 (2024)

DOI：10.1186/s12864-024-09984-8

< 参考図表 >

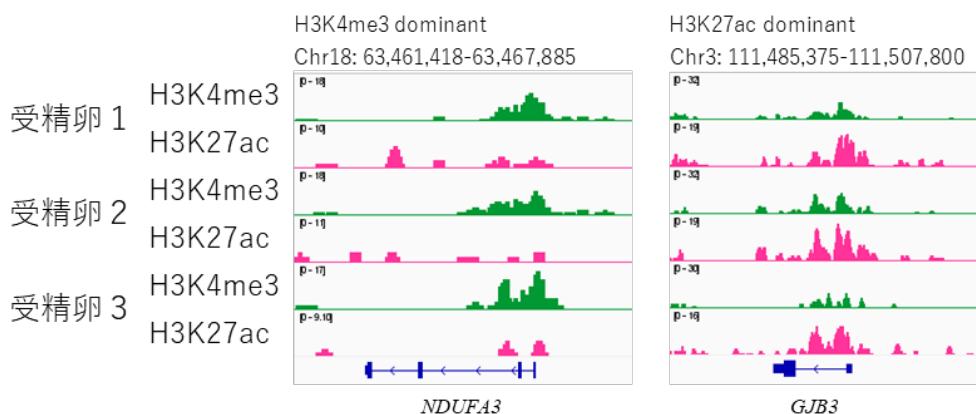


図1. WOW-CAT で可能になった単一受精卵中の異なる2つの種類のヒストン修飾解析。緑とピンクは修飾の場所と量を表す。

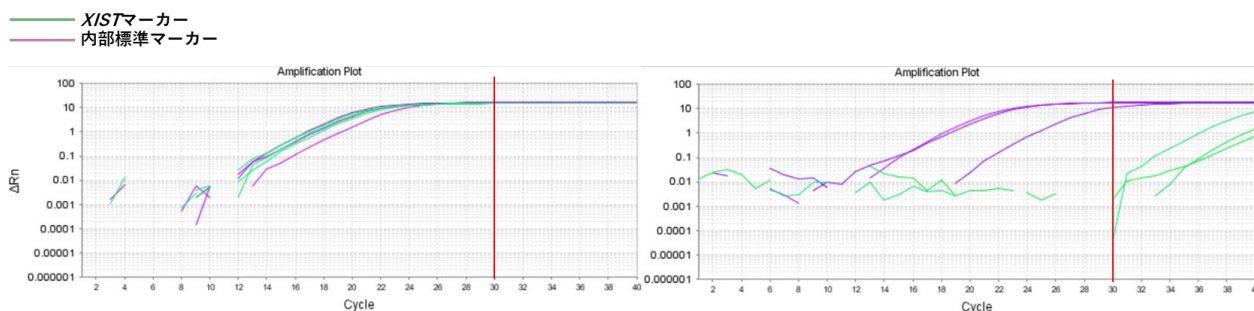


図2. 受精卵から切り取った一部の細胞に対するWOW-CATを使ったPCR結果。XISTという遺伝子にある雌で優勢なヒストン修飾が、左では早く増幅されている(緑の線)。左側の受精卵(3個)は雌と判定できる。