

家畜初期胚におけるニュートリエピジェネティクス

誌名	栄養生理研究会報
ISSN	02864754
著者名	池田,俊太郎
発行元	家畜栄養生理研究会
巻/号	60巻1号
掲載ページ	p. 1-11
発行年月	2016年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



家畜初期胚におけるニュートリエピジェネティクス — One-carbon metabolism の初期胚発生における役割 —

池田俊太郎

(京都大学大学院農学研究科)

1. はじめに

ニュートリエピジェネティクス (Nutriepigenetics) は Nutrition と Epigenetics を合わせた造語であり、簡潔には「エピジェネティクス修飾を介した栄養素の影響」と言うことができよう^{1,2)}。全ての細胞あるいは個体が同一の DNA 塩基配列を有しているながら、遺伝子の発現情報が細胞ごと個体ごとに異なり、そしてその発現情報が細胞分裂や個体の世代を超えて伝達される場合、そこには DNA あるいはクロマチン構造に刻印されたエピジェネティクス修飾が関与していると考えられる。ニュートリエピジェネティクスは、特定の時期の栄養環境がその後長期間にわたり遺伝子発現を介して個体の形質に影響を及ぼす場合に、その背景として考えられる機構の一つである。

メチオニン、葉酸、ビタミン B₁₂ などの栄養素は、葉酸とメチオニンの共役した代謝経路を軸とする one-carbon group (メチル基、メチレン基、メテニル基、ホルミル基、ホルムイミノ基) の相互変換・転移反応、すなわち one-carbon metabolism (OCM) を構成する (図 1A)。DNA やヒストンがメチル化を受ける際の唯一のメチル基源、S-adenosylmethionine (SAM) が、この経路によって産生されることから、OCM を構成する栄養素は、エピジェネティクス機構に影響を及ぼし得る栄養素として注目を集めてきた^{3,4)}。

本稿では、家畜を含む哺乳動物の受精卵 (ここでは受精から胚盤胞期まで) の発生とエピジェネティクスにおける OCM の役割について、筆者らの結果も含め関連する知見を紹介したい。また近年、

「胚、胎児、幼児が発生・成長する環境が、生涯にわたる健康と幸福あるいは非感染性疾患のリスクに影響する」という、DOHaD (Developmental Origins

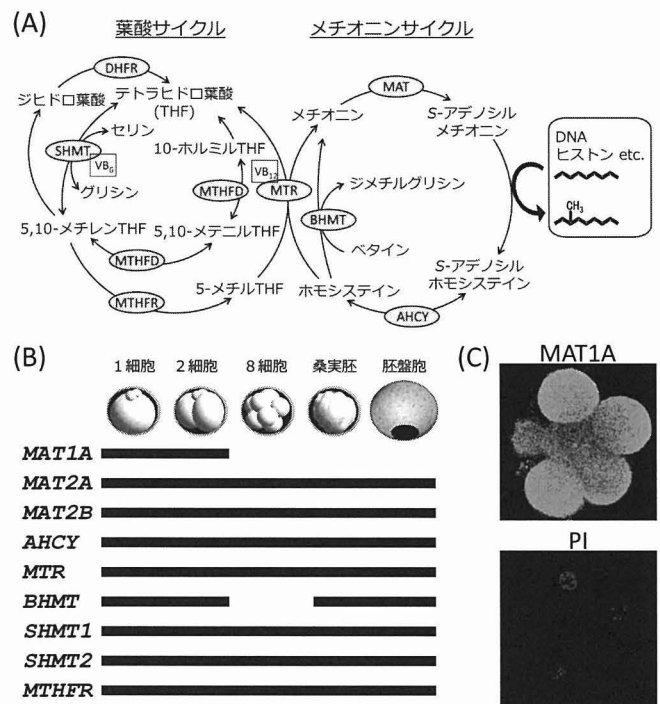


図 1. One-carbon metabolism と受精卵

(A) One-carbon metabolism の主要な経路と各代謝を担う酵素 (楕円)、補酵素 (四角) を示した。メチオニンの代謝によって作られる S-アデノシルメチオニンは、エピジェネティクスにおける代表的な修飾機構である DNA とヒストンのメチル化の際のメチル基源となる。(B) ウシ受精卵の各発生段階における (A) に示した酵素の mRNA 発現を示す (RT-PCR の結果)。黒線で示した時期に mRNA の発現が見られる。(C) ウシ 8 細胞期胚における MAT1A タンパク質の発現を免疫蛍光染色の上、レーザー顕微鏡で観察した。PI はヨウ化プロビジウムによる核染色像を示す。(文献²²⁾より改変引用)

of Health and Disease) の概念が確立され⁵⁾、個体発生
の早期に環境要因によってエピジェネティクス修飾
の形で形成された遺伝子発現情報が、その後の成長
を通じて伝達されることが、DOHaD の一つの要因
と考えられている⁶⁾。DOHaD の概念に基づいて、
肉質や乳量といった家畜の生産形質の素因の形成
(プログラミング) を、受精卵を含む胎仔期、新生仔
期あるいは育成期の栄養環境の制御によって行え
ないかという、その可能性を探る動きが国内外で見
られる^{7,8)}。そこで、受精卵期におけるニュートリ
エピジェネティクスを介した家畜の生産形質のプロ
グラミングの可能性についても言及したい。

2. 受精卵期 – エピジェネティクスがダイナミック に動く時 –

精子と卵子の融合すなわち受精によって出来た受
精卵は卵割を繰り返した後、例えばウシの場合受精

後6~7日ほどで、直径が0.2mm、細胞数が100個
程度になり内部に腔を形成した胚盤胞と呼ばれる発
生段階に達する(図2)。この受精から胚盤胞まで
の発生段階は、先人たちの努力の結果、実験動物か
ら家畜、ヒトに至るまで、哺乳動物の受精から出生
までの期間の中で実用化レベルでは唯一、母体の外
に取り出して培養皿の中で発生させることのできる
期間となっている。栄養環境を母体から切り離して
人為的に制御可能であるという理由から、筆者らが
ニュートリエピジェネティクスを介した形質プログ
ラミングの可能性のある介入期としても着目してい
る発生段階である。そこで本稿では受精卵期を、一
般に体外で培養可能な受精から胚盤胞期までとし
て論を進めたい。

エピジェネティクス修飾として代表的なものに
DNA のメチル化、そしてDNA とともにクロマチン
を形成するヒストンの翻訳後修飾(メチル化、アセ

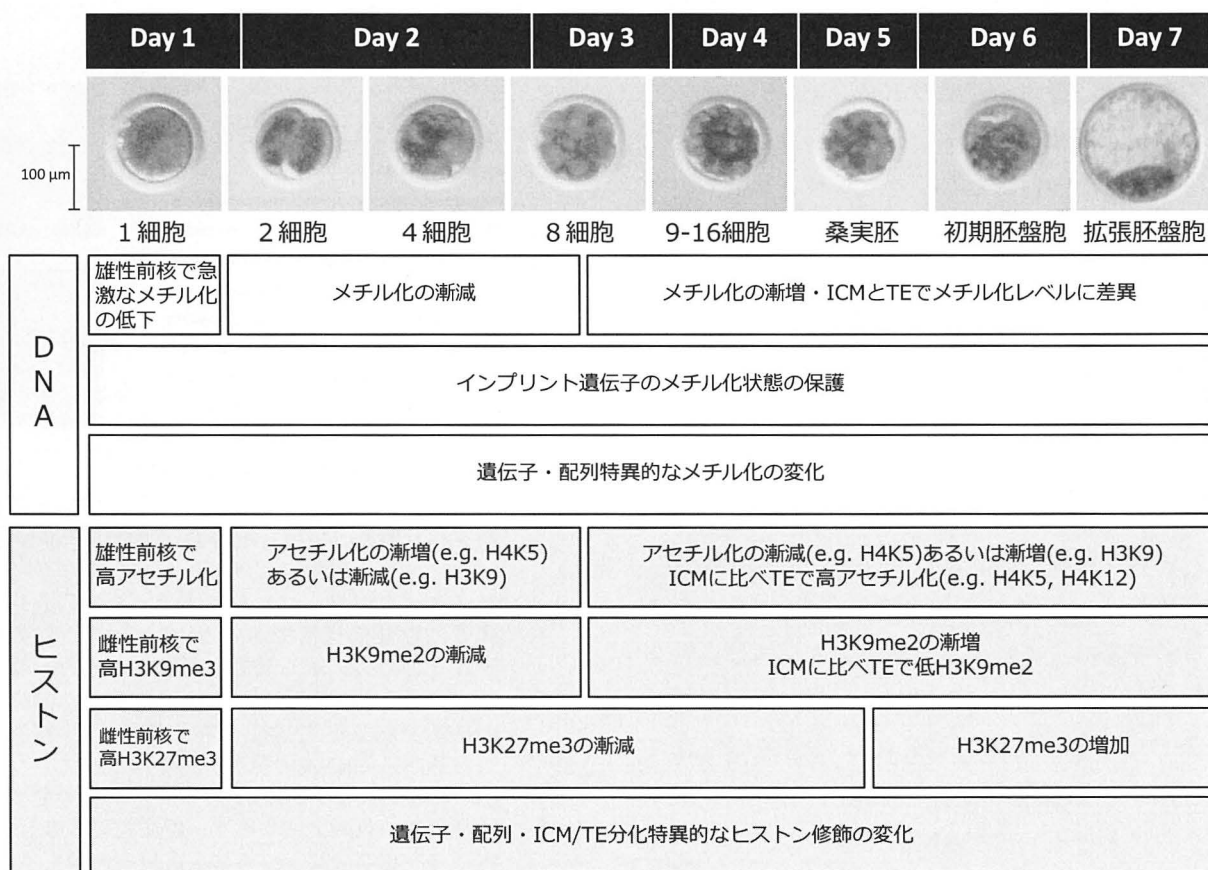


図2. 哺乳動物の受精卵の発生とエピジェネティクス機構のダイナミクス

受精からの経過日数によるウシ受精卵の発生段階と、受精卵の中で起こるエピジェネティクス機構の変化を、DNA のメチル化とヒストン修飾に限って示した。変化のタイミングやヒストン修飾の種類はウシでも報告されているもののみを示した^{9,53,54,55,56,57,58)}。ICM は内部細胞塊、TE は栄養外胚葉、ヒストン修飾の表記の例として、H4K5 は「ヒストン H4 の5 番目のリジン残基」についての変化を、H3K9me3 は「ヒストン H3 の9 番目のリジン残基のトリメチル化」を表す。

チル化等)があるが、受精卵期には、これらのエピジェネティクス修飾がダイナミックに変化する(図2)。DNAのメチル化(主としてCpG配列のシトシンがメチル化される)に関しては、生物種によってタイミングの差はあるものの受精後にゲノムワイドな脱メチル化が起こり、ゲノム全体で見るとメチル化の程度はいったん低下し、その後上昇する⁹⁾。一方で、インプリント遺伝子における父方と母方由来のゲノムのどちらか一方がメチル化されている領域が脱メチル化を免れたり(メチル化を維持する酵素の働きによる)^{10,11,12)}、インプリント遺伝子に限らず配列特異的なメチル化の制御も同時に起こる^{13,14)}。

もう一つの代表的なエピジェネティクス修飾であるヒストンの修飾について、受精卵期における変化を見てみる。精子のDNAに結合してクロマチンを形成しているタンパク質、プロタミンは受精直後に卵子由来のヒストンに置換される。この時に特定のヒストンバリエントが雄性ゲノムに優先的に取り込まれることも要因と考えられるが、卵子由来の核(雌性前核)と精子由来の核(雄性前核)では、ヒストンの特定のアミノ酸残基のアセチル化やメチル化のレベルに差異が見られる^{15,16)}。雌雄前核はやがて融合して受精卵は卵割を開始するが、卵割期から胚盤胞に至るまで、様々なヒストン修飾酵素の協調した発現変化とともにヒストン修飾は複雑に変化する^{16,17)}。またDNAメチル化の変化と同様に、ゲノム全体にわたる変化の中で、遺伝子(あるいは配列)特異的なヒストン修飾の変化があることも分かっている^{18,19,20)}。

以上のようなエピジェネティクス機構の動的変化ゆえに、受精卵期は外的な刺激によるエピゲノムの変化に関して脆弱な時期と考えられている^{17,21)}。

3. 受精卵における One-carbon metabolism 酵素群の発現

稿の初めで述べたように、エピジェネティクスの代表的な分子機構であるDNAとヒストンのメチル化においてメチル基源として機能するSAMは、OCMによって産生される。OCMは生体内組織に普遍的に存在するが、未分化な細胞からなる受精卵がこれを持つかは不明であった。2010年、哺乳動物

の着床前の受精卵においてOCMに關与する酵素群の遺伝子が発現していることが、筆者のグループを含む二つの研究室から相次いで報告された^{22,23)}(図1B,C)。

生体内でOCMの活性が高い組織として肝臓があるが、その原因として他組織においては発現が低い肝臓型のSAM合成酵素(*Mat1a*の遺伝子産物からなる)や、ホモシステインからメチオニンへのリサイクルをベタインの持つメチル基を用いて行う酵素すなわちBHMTの発現や活性が他組織に比べて高いことが挙げられる²⁴⁾。哺乳動物の受精卵はこれらの遺伝子あるいは酵素をも発現しており、ユニークなOCMを有していることが明らかになった^{22,23,25,26)}。

4. 胚盤胞発生における One-carbon metabolism の重要性

OCMに含まれる種々の栄養素やその代謝が受精卵の胚盤胞発生において重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。筆者らは、メチオニンサイクルにおけるメチオニン前駆物質であるホモシステインをウシ体外受精卵の培養液に添加すると胚盤胞発生が遅延することを報告した²²⁾。また、体外培養系においてウシ受精卵をメチオニンの代謝拮抗阻害剤であるエチオニンで処理すると、桑実胚から胚盤胞への発生が抑制される²⁷⁾。この抑制はSAMの同時添加によって一部回復すること、また、SAM合成酵素の特異性の高い阻害剤によっても同様の胚盤胞発生の抑制が起こる(投稿準備中)ことから、メチオニンのSAMへの代謝が胚盤胞発生に重要な役割を果たしていると考えられる。さらに他の研究グループからも葉酸サイクルの阻害によってウシ胚やマウス胚の胚盤胞発生が抑制されること^{23,25)}、BHMTの特異的阻害により、マウス胚においてやはり胚盤胞発生が抑制されること²⁵⁾が報告されており、正常なOCMは受精卵の発生、特に胚盤胞への発生に重要と考えられる。

5. One-carbon metabolism の阻害・攪乱が受精卵のエピジェネティクスに及ぼす影響

受精卵の発生におけるOCMの重要性について述べたが、エピジェネティクス機構への関与について

はどうだろうか。前述の受精卵の培養液へのホモシステインの添加やメチオニン代謝阻害剤の添加は、抗メチル化シトシン抗体を用いた免疫染色で測定可能な、グローバルな DNA のメチル化の増加あるいは低下をそれぞれもたらした (図3)^{22,27)}。マウス胚において葉酸サイクルと BHMT の阻害により胚盤胞発生の抑制を示したグループも、同様の手法でグローバルな DNA のメチル化の低下を示している²⁵⁾。主要な DNA メチル化酵素 (Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b) を全てノックアウトしたマウス胚でも正常に胚盤胞発生が起こるという事実²⁸⁾ に注意を払う必要があるが、ウシやヒツジの体外受精卵において Dnmt1 をノックダウンすると (ウシの報告では DNA のメチル化の低下も示している) 胚盤胞発生が著しく抑制されるという報告^{29,30)} やウシ体外受精卵の培養液に過剰のメチオニンを添加すると DNA のメチル化の増加とともに胚盤胞発生が低下するという筆者らの結果²⁷⁾ もあり、少なくともウシやヒツジ胚においては、OCM の阻害や擾乱による DNA のメチル化の変化は、胚盤胞発生の異常を引き起こす要因の一つと考えられる。

OCM が実際に受精卵のエピジェネティクス機構に関与していることが明らかとなったが、グローバルな DNA メチル化という、ゲノム全体にわたるエピジェネティクス修飾の変化では、特定の遺伝子に対する影響を説明することができない。胚盤胞発生も含め特定の形質への遺伝子発現を介した関与を考えた場合、遺伝子特異的なエピジェネティクス修飾について検討する必要がある。

胚盤胞発生の阻害という形態的な変化のみならず、胚の遺伝子発現を調べてみると、メチオニン代謝を阻害された胚では *Nanog* や *Tead4* といった胚盤胞における細胞系列分化を担う転写因子の遺伝子が異常な高発現を示していた (図4A)^{27,31)}。筆者らは、これらの転写因子の発現変化に着目して、遺伝子特異的なエピジェネティクス修飾における OCM の役割について研究を進めた。まず、上述したようなゲノム全体で見てもわかる DNA のメチル化の変化が、遺伝子特異的に見ても観察されるのではないかと予想し、発現の変化が現れた遺伝子のプロモーター領域について DNA のメチル化を解析した。予想に反

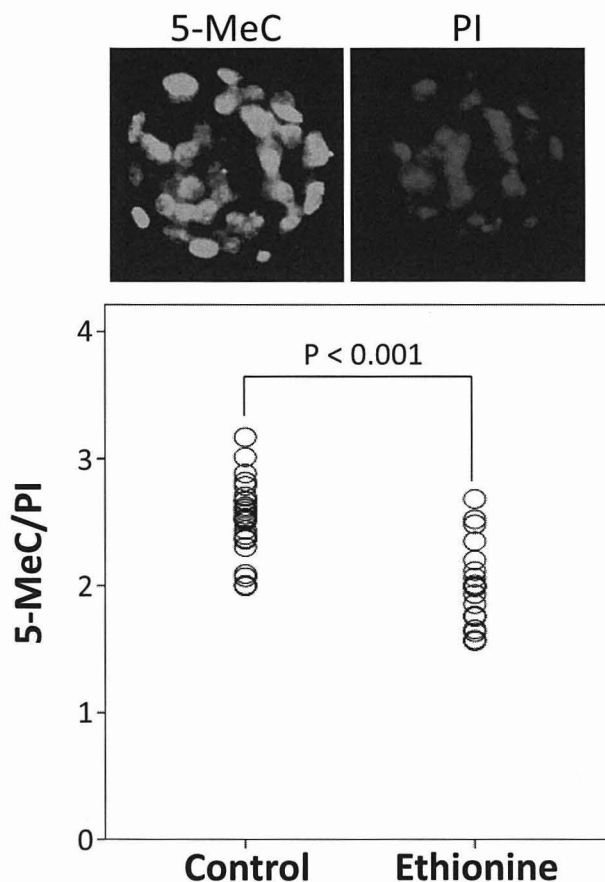


図3. メチオニン代謝の阻害がウシ受精卵の DNA メチル化に及ぼす影響

メチオニン代謝阻害剤 (エチオニン) を添加した培養液でウシ体外受精卵を 8 細胞期から培養し、受精後 6 日目の桑実胚を抗 5-メチルシトシン抗体を用いた免疫蛍光染色 (5-MeC) およびヨウ化プロピジウムによる核染色 (PI) に供した。PI の蛍光強度に対する 5-MeC の蛍光強度をエチオニンを含まない対照区と比較した。プロットは各胚の値を示す。エチオニン添加区でメチル化の低下が観察される (分散分析)。このようなゲノム全体にわたるメチル化の変化からは、遺伝子特異的なエピジェネティクスの変化を説明することができない。(文献²⁷⁾より改変引用)

し、メチオニン代謝阻害の有無によって、メチル化の程度に差は見られなかった (図4B)。そこで、各遺伝子のプロモーター近傍のヒストンについて、転写抑制性のヒストン修飾であるヒストン H3 の 9 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K9me3) の程度を調べた。その結果、メチオニン代謝の阻害によって当該遺伝子の H3K9me3 は低下し、それはメチオニンの添加により回復した (図4C)。この結果から、受精卵においてメチオニン依存的なヒストンのメチル化修飾が存在することが明らかになり、メチオニンがこの機構を介して特定の遺伝子の発現制御に関わって

いることが示唆された³¹⁾。ゲノムワイドにDNAの低メチル化が起こる受精卵期においては、DNAのメチ

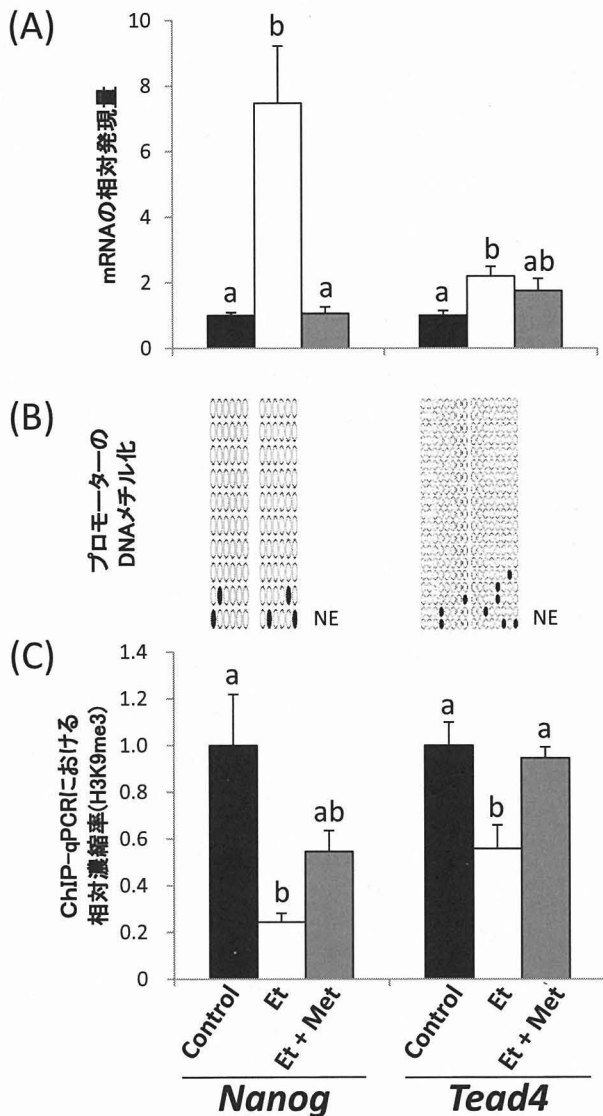


図4. メチオニン代謝の阻害がマウス胚盤胞における細胞系列分化関連遺伝子の発現およびエピジェネティクス修飾に及ぼす影響

マウス1細胞期胚をメチオニン代謝阻害剤であるエチオニン (Et) の添加あるいは過剰量のメチオニン (Met) を同時に添加した培養液で培養し、得られた胚盤胞において、細胞系列分化関連遺伝子 (ここでは *Nanog* と *Tead4* の結果を示す) の発現およびエピジェネティクス修飾について無添加対照区と比較した。(A) RT-qPCRにより各遺伝子の相対発現量を解析した。(B) バイサルファイトシークエンスを用いてプロモーター領域のDNAのメチル化を解析した。○は非メチル化CpG、●はメチル化CpG、NEは解析していないことを表す。(C) クロマチン免疫沈降 (ChIP)-qPCRによって解析したプロモーター近傍のヒストンH3の9番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K9me3) の程度を示した。a, b: 異符号間有意差あり。(Tukey-Kramer test, $P < 0.05$)。 (文献³¹⁾より改変引用)

ル化によらずヒストンの修飾によって遺伝子発現の制御が行われることを示す知見が、レトロトランスポゾン²⁰⁾、細胞系列分化関連遺伝子^{19,32,33)}、そして成長や代謝に関連する遺伝子³⁴⁾においても続々と報告されており、筆者らの結果は、受精卵期におけるヒストン修飾を介した遺伝子発現のエピジェネティクス制御へのOCMの関与を示すものと位置づけられる。先述のように、マウスの胚盤胞発生においてDNAメチル化機構が必須である可能性は低い²⁸⁾が、いくつかのヒストンメチル化酵素について、それらをノックダウンしたマウス胚では胚盤胞発生が抑制される^{20,35)}ことから、ヒストンのメチル化の正常性は、種を超えて胚盤胞発生において必須である可能性が高く、OCMがヒストンのメチル化制御に関わることは、その胚盤胞発生における重要性を示すものと考えられる。

6. 受精卵期の栄養環境と出生後の形質

前節で紹介した筆者らの研究では、胚盤胞発生において重要な役割を果たす遺伝子についてのみ解析を行っているが、エピジェネティクス機構を介した遺伝子発現情報の伝達という観点から見ると、受精卵を取り巻くOCMに関する環境が、長期にわたって個体の形質に影響を及ぼすことが考えられる。本節では、OCMも含め受精卵期の栄養環境が出生後の形質に及ぼす影響に関する知見を紹介したい。

受精卵期の栄養環境が出生後の形質に影響を及ぼす例には、母体の飼養環境制御によるものと受精卵の体外培養環境制御によるものがある。まず前者であるが、OCMに関連してはSinclairらによるランドマーク的な報告がある³⁶⁾。彼らは、ヒツジにおいて妊娠8週前から妊娠6日後という卵子の成長、受精、受精後の胚盤胞期までの発生に相当する限られた時期に、コバルトと硫黄を欠乏した飼料を与えることによりビタミンB₁₂、葉酸、メチオニンの体内レベルを低下 ('methyl-deficient' = MD群) させた。この試験では、食餌介入を前述の時期に限るために、妊娠6日目に回収した受精卵 (胚盤胞) を代理母畜に移植している。そして生まれてきた子畜であるが、対照群に比べてMD群では成長後に体重の増加、脂肪割合の増加と筋肉割合の低下、安静時血

庄（拡張期および平均）の増加、アンジオテンシン投与後の血圧上昇（拡張期、収縮期および平均）の増大、インスリン抵抗性、免疫応答の増大が見られ、これらの表現型はオスで特異的あるいは顕著であった。Zhang らも胚移植を用いて、受精卵で言えば胚盤胞期までの母ヒツジに対する摂取エネルギー制限によって、子畜において副腎の肥大と機能亢進が起こることを示した³⁷⁾。他にも、交配後数日間の母体への低タンパク質飼料の給餌が、性差はあるが子の出生体重の低下³⁸⁾あるいは増加³⁹⁾、増体の上昇^{38,39)}、収縮期血圧の増加^{38,39)}、肝重量体重比³⁸⁾や心重量体重比³⁹⁾の低下、腎重量体重比の増加³⁸⁾、自発行動の増加³⁹⁾をもたらす例がマウスやラットで報告されている。

一方、受精卵の培養に起因する、あるいはその培養条件の違いによる出生後の形質変化の例を挙げる。代表的なものとしてウシやヒツジの体外操作胚（体外受精卵、核移植胚を含む）由来の新生仔でしばしば見られる large offspring syndrome (LOS) があり、過体重、巨舌や内臓の肥大、呼吸困難、虚弱などを示す⁴⁰⁾。LOS は複数のインプリント遺伝子の loss of imprinting と当該遺伝子の発現異常を伴い、病態や発症メカニズムの面で、ヒトの生殖補助医療 (Assisted Reproductive Technology, ART) においてリスク増が指摘されている先天性インプリント疾患、Beckwith-Wiedemann 症候群との類似性が考察されている^{41,42)}。ART による出生児の多くは健康でありその恩恵は計り知れないが、ART において自然妊娠による出生児と比較した場合にリスク増が示された表現型としては、インプリント疾患を含む先天性異常だけでなく、低出生体重⁴³⁾、成長後の空腹時血糖の上昇⁴⁴⁾、血清中中性脂肪の増加⁴⁵⁾、拡張期および収縮期血圧の上昇^{44,45)}等が報告されている。また実験動物においても、体内由来胚と比較して、受精卵の体外培養によって変化が示された表現型として、収縮期血圧の上昇⁴⁶⁾、耐糖能の低下³⁴⁾、自発行動の増加や空間記憶能力の低下⁴⁷⁾、増体の低下あるいは増加^{34,48)}等がある。

家畜受精卵の培養液では、胚発生を促進するために血清が添加されたり、体細胞との共培養がしばしば行われるが、これらは LOS のリスク要因である

ことが明らかとなっている⁴⁹⁾。ヒトの ART においても、体外受精卵の培養に用いる培養液の違いが新生児の出生体重に違いをもたらすことが報告されている^{50,51,52)}。Rinaudo のグループは、マウス受精卵を組成が単純な Whitten 培地（無機塩類、グルコース、ピルビン酸、乳酸、ウシ血清アルブミンを含む水溶液）かつ気相の酸素濃度（20%）条件下で、あるいはより改良された KSOMaa 培地（上記の濃度が改変され、さらにアミノ酸等を含む）かつ低酸素（5%）条件下で培養し、その子宮内移植によって産仔を得た場合、生体内由来胚と比較して、前者由来の子マウスでは出生後の増体の低下と耐糖能の低下が、後者由来のメスでは、低出生体重、増体の上昇、脂肪蓄積の増加と耐糖能の低下が見られることを報告した。彼らは耐糖能の低下に関連して、胚盤胞における網羅的な遺伝子発現解析から可能性のある原因遺伝子として *Txnip* (thioredoxin interacting protein) に着目し、体外培養によって胚盤胞でその発現と転写促進性のヒストン修飾（ヒストン H4 のアセチル化）が増加することを示した。さらに興味深いことに、成長後の筋肉や脂肪においても組織特異的に *Txnip* の遺伝子発現情報が維持されていることを見出し（胚盤胞と個体成長後の間の状況については不明）、エピジェネティクス機構にまで踏み込んで、体外培養系を DOHaD の一つのモデルとして提唱している³⁴⁾。

受精卵の置かれた環境による出生後の形質変化の例を見てきたが、これらの研究で報告された形質は、DOHaD の概念が確立してきた背景とも関連して、非感染性疾患に関連するものが多い。しかし、中でも体重や代謝、体組成の変化は家畜の生産形質に密接に関連するものであり、受精卵期における出生個体の生産形質のプログラミングを考える上で興味深い。筆者らも、ウシ体外受精卵を用いた解析で、OCM 代謝の制御が、胚盤胞発生に関連する遺伝子のみならず、成長・代謝において重要な役割を担う遺伝子においてもヒストン修飾および遺伝子発現の変化を引き起こす結果を得ており（投稿準備中）、受精卵期における家畜の生産形質の素因形成を考えた場合に、OCM は有力なターゲットになり得ると考えている。

7. おわりに

筆者らの結果は、受精卵期のニュートリエピジェネティクスによる形質プログラミングのメカニズムについて、OCMの切り口からかすかな光を当てたに過ぎない。OCMの制御による受精卵のヒストン修飾がその後の細胞分裂を経て維持されるのか、またDNAメチル化を含む他のエピジェネティクス制御機構の素因になるのか、そしてそれは実際に出生後の形質の変化をもたらすのか、検討すべき課題は尽きないが今後も研究を進めていきたい(図5)。筆者らが行ったような限られた遺伝子のピンポイントな解析ではなく、ゲノム全体にわたる網羅的な解析もOCM制御による生産形質に関わるエピゲノムの変化を探る上で有力な手段と考えられる。また先にも述べたように、形質の変化を引き起こす栄養条件はOCMに関するものだけには限らない。受精卵の

培養液で言えば、各組成成分の組み合わせや濃度、血清やタンパク質添加の有無、母体の飼養条件に関しては低タンパク質、摂取エネルギー制限、高脂肪といったマクロな栄養条件の影響を説明し得るような理論の構築も、栄養環境制御による形質の変化のメカニズム解明とその応用を目指す上で重要であろう。

謝 辞

本稿を発表する機会を与えていただいた京都大学大学院農学研究科 久米新一教授に深謝いたします。また、本研究の遂行を支援していただいた研究室の諸氏に深く御礼申し上げます。本研究は、JSPS 科研費、一般財団法人旗影会、京都大学コアシテージバックアップ研究費の助成を受けて実施しました。

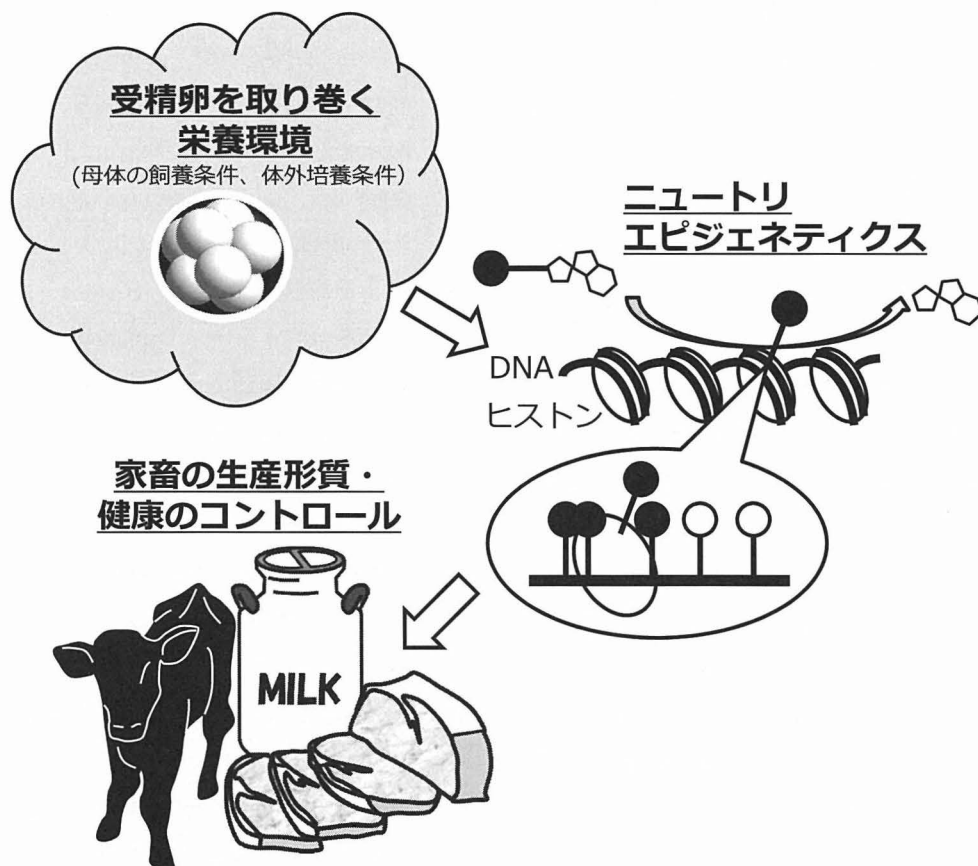


図5. 受精卵期におけるニュートリエピジェネティクスによる家畜の形質のプログラミング
受精卵を取り巻く栄養環境の制御によりDNAやヒストンの修飾をはじめとするエピジェネティクス機構が影響を受け、その影響が個体発生・成長を通じて伝達されることによって、出生後の家畜の生産形質や健康のコントロールにつながる概念を模式的に描いた。

[引用文献]

- 1) Remely M, Lovrecic L, de la Garza AL, Migliore L, Peterlin B, Milagro FI, Martinez AJ, Haslberger AG. 2015. Therapeutic perspectives of epigenetically active nutrients. *Br. J. Pharmacol.*, 172: 2756-2768.
- 2) Gerhauser C. 2013. Cancer chemoprevention and nutriepigenetics: state of the art and future challenges. *Top. Curr. Chem.*, 329: 73-132.
- 3) Janke R, Dodson AE, Rine J. 2015. Metabolism and Epigenetics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 31: 473-496.
- 4) Van den Veyver IB. 2002. Genetic effects of methylation diets. *Annu. Rev. Nutr.*, 22: 255-282.
- 5) International Society for Developmental Origins of Health and Disease The Cape Town Manifesto—November 2015 <https://dohadsoc.org/wp-content/uploads/2015/11/DOHaD-Society-Manifesto-Nov-17-2015.pdf> 2015年12月21日閲覧.
- 6) Hanson MA, Gluckman PD. 2014. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? *Physiol. Rev.*, 94: 1027-1076.
- 7) 後藤貴文. 2015. 代謝プログラミングによる和牛の体質制御に関する研究. *栄養生理研究会報*, 59: 69-78.
- 8) Chavatte-Palmer P, Richard C, Peugnet P, Robles M, Rousseau-Ralliard D, Tarrade A. 2015. The developmental origins of health and disease: importance for animal production. *Animal Reproduction*, 12: 505-520.
- 9) Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W. 2001. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98: 13734-13738.
- 10) Hansmann T, Heinzmann J, Wrenzycki C, Zechner U, Niemann H, Haaf T. 2011. Characterization of differentially methylated regions in 3 bovine imprinted genes: a model for studying human germ-cell and embryo development. *Cytogenet. Genome Res.*, 132: 239-247.
- 11) Hirasawa R, Chiba H, Kaneda M, Tajima S, Li E, Jaenisch R, Sasaki H. 2008. Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes Dev.*, 22: 1607-1616.
- 12) Zhao XM, Ren JJ, Du WH, Hao HS, Wang D, Liu Y, Qin T, Zhu HB. 2012. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on methylation of the putative imprinted control region of H19 during the in vitro development of vitrified bovine two-cell embryos. *Fertil. Steril.*, 98: 222-227.
- 13) Smith ZD, Chan MM, Humm KC, Karnik R, Mekhoubad S, Regev A, Eggan K, Meissner A. 2014. DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo. *Nature*, 511: 611-615.
- 14) Zhao MT, Rivera RM, Prather RS. 2013. Locus-specific DNA methylation reprogramming during early porcine embryogenesis. *Biol. Reprod.*, 88: 48.
- 15) Marcho C, Cui W, Mager J. 2015. Epigenetic dynamics during preimplantation development. *Reproduction*, 150: R109-120.
- 16) Beaujean N. 2014. Histone post-translational modifications in preimplantation mouse embryos and their role in nuclear architecture. *Mol. Reprod. Dev.*, 81: 100-112.
- 17) Chason RJ, Csokmay J, Segars JH, DeCherney AH, Armant DR. 2011. Environmental and epigenetic effects upon preimplantation embryo metabolism and development. *Trends. Endocrinol. Metab.*, 22: 412-420.
- 18) VerMilyea MD, O'Neill LP, Turner BM. 2009. Transcription-independent heritability of induced histone modifications in the mouse preimplantation embryo. *PLoS One*, 4: e6086.
- 19) Herrmann D, Dahl JA, Lucas-Hahn A, Collas P, Niemann H. 2013. Histone modifications and mRNA expression in the inner cell mass and trophectoderm of bovine blastocysts. *Epigenetics*, 8: 281-289.

- 20) Hatanaka Y, Inoue K, Oikawa M, Kamimura S, Ogonuki N, Kodama EN, Ohkawa Y, Tsukada Y, Ogura A. 2015. Histone chaperone CAF-1 mediates repressive histone modifications to protect preimplantation mouse embryos from endogenous retrotransposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 112: 14641-14646.
- 21) Fleming TP, Velazquez MA, Eckert JJ. 2015. Embryos, DOHaD and David Barker. *J. Dev. Orig. Health Dis.*, 6: 377-383.
- 22) Ikeda S, Namekawa T, Sugimoto M, Kume S. 2010. Expression of methylation pathway enzymes in bovine oocytes and preimplantation embryos. *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.*, 313: 129-136.
- 23) Kwong WY, Adamiak SJ, Gwynn A, Singh R, Sinclair KD. 2010. Endogenous folates and single-carbon metabolism in the ovarian follicle, oocyte and pre-implantation embryo. *Reproduction*, 139: 705-715.
- 24) Finkelstein JD. 1990. Methionine metabolism in mammals. *J. Nutr. Biochem.*, 1: 228-237.
- 25) Zhang B, Denomme MM, White CR, Leung KY, Lee MB, Greene ND, Mann MR, Trasler JM, Baltz JM. 2015. Both the folate cycle and betaine-homocysteine methyltransferase contribute methyl groups for DNA methylation in mouse blastocysts. *FASEB J.*, 29: 1069-1079.
- 26) Lee MB, Kooistra M, Zhang B, Slow S, Fortier AL, Garrow TA, Lever M, Trasler JM, Baltz JM. 2012. Betaine homocysteine methyltransferase is active in the mouse blastocyst and promotes inner cell mass development. *J. Biol. Chem.*, 287: 33094-33103.
- 27) Ikeda S, Sugimoto M, Kume S. 2012. Importance of methionine metabolism in morula-to-blastocyst transition in bovine preimplantation embryos. *J. Reprod. Dev.*, 58: 91-97.
- 28) Sakaue M, Ohta H, Kumaki Y, Oda M, Sakaide Y, Matsuoka C, Yamagiwa A, Niwa H, Wakayama T, Okano M. 2010. DNA methylation is dispensable for the growth and survival of the extraembryonic lineages. *Curr. Biol.*, 20: 1452-1457.
- 29) Golding MC, Williamson GL, Stroud TK, Westhusin ME, Long CR. 2011. Examination of DNA methyltransferase expression in cloned embryos reveals an essential role for Dnmt1 in bovine development. *Mol. Reprod. Dev.*, 78: 306-317.
- 30) Taylor J, Moore H, Beaujean N, Gardner J, Wilmut I, Meehan R, Young L. 2009. Cloning and expression of sheep DNA methyltransferase 1 and its development-specific isoform. *Mol. Reprod. Dev.*, 76: 501-513.
- 31) Kudo M, Ikeda S, Sugimoto M, Kume S. 2015. Methionine-dependent histone methylation at developmentally important gene loci in mouse preimplantation embryos. *J. Nutr. Biochem.*, 26: 1664-1669.
- 32) Nakanishi MO, Hayakawa K, Nakabayashi K, Hata K, Shiota K, Tanaka S. 2012. Trophoblast-specific DNA methylation occurs after the segregation of the trophectoderm and inner cell mass in the mouse periimplantation embryo. *Epigenetics*, 7: 173-182.
- 33) O'Neill LP, VerMilyea MD, Turner BM. 2006. Epigenetic characterization of the early embryo with a chromatin immunoprecipitation protocol applicable to small cell populations. *Nat. Genet.*, 38: 835-841.
- 34) Feuer SK, Liu X, Donjacour A, Lin W, Simbulan RK, Giritharan G, Piane LD, Kolahi K, Ameri K, Maltepe E, Rinaudo PF. 2014. Use of a mouse in vitro fertilization model to understand the developmental origins of health and disease hypothesis. *Endocrinology*, 155: 1956-1969.
- 35) Aoshima K, Inoue E, Sawa H, Okada Y. 2015. Paternal H3K4 methylation is required for minor zygotic gene activation and early mouse embryonic development. *EMBO Rep*, 16: 803-812.
- 36) Sinclair KD, Allegrucci C, Singh R, Gardner DS, Sebastian S, Bispham J, Thurston A, Huntley JF, Rees WD, Maloney CA, Lea RG, Craigen J, McEvoy TG, Young LE. 2007. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin

- and methionine status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104: 19351-19356.
- 37) Zhang S, Morrison JL, Gill A, Rattanatray L, MacLaughlin SM, Kleemann D, Walker SK, McMillen IC. 2013. Maternal dietary restriction during the periconceptional period in normal-weight or obese ewes results in adrenocortical hypertrophy, an up-regulation of the JAK/STAT and down-regulation of the IGF1R signaling pathways in the adrenal of the postnatal lamb. *Endocrinology*, 154: 4650-4662.
 - 38) Kwong WY, Wild AE, Roberts P, Willis AC, Fleming TP. 2000. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development*, 127: 4195-4202.
 - 39) Watkins AJ, Ursell E, Pantou R, Papenbrock T, Hollis L, Cunningham C, Wilkins A, Perry VH, Sheth B, Kwong WY, Eckert JJ, Wild AE, Hanson MA, Osmond C, Fleming TP. 2008. Adaptive responses by mouse early embryos to maternal diet protect fetal growth but predispose to adult onset disease. *Biol. Reprod.*, 78: 299-306.
 - 40) Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.*, 3: 155-163.
 - 41) Kalish JM, Jiang C, Bartolomei MS. 2014. Epigenetics and imprinting in human disease. *Int. J. Dev. Biol.*, 58: 291-298.
 - 42) Chen Z, Hagen DE, Elsik CG, Ji T, Morris CJ, Moon LE, Rivera RM. 2015. Characterization of global loss of imprinting in fetal overgrowth syndrome induced by assisted reproduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 112: 4618-4623.
 - 43) Schieve LA, Meikle SF, Ferre C, Peterson HB, Jeng G, Wilcox LS. 2002. Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *N. Engl. J. Med.*, 346: 731-737.
 - 44) Ceelen M, van Weissenbruch MM, Vermeiden JP, van Leeuwen FE, Delemarre-van de Waal HA. 2008. Cardiometabolic differences in children born after in vitro fertilization: follow-up study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 93: 1682-1688.
 - 45) Sakka SD, Loutradis D, Kanaka-Gantenbein C, Margeli A, Papastamataki M, Papassotiriou I, Chrousos GP. 2010. Absence of insulin resistance and low-grade inflammation despite early metabolic syndrome manifestations in children born after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 94: 1693-1699.
 - 46) Watkins AJ, Platt D, Papenbrock T, Wilkins A, Eckert JJ, Kwong WY, Osmond C, Hanson M, Fleming TP. 2007. Mouse embryo culture induces changes in postnatal phenotype including raised systolic blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104: 5449-5454.
 - 47) Ecker DJ, Stein P, Xu Z, Williams CJ, Kopf GS, Bilker WB, Abel T, Schultz RM. 2004. Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101: 1595-1600.
 - 48) Mahsoudi B, Li A, O'Neill C. 2007. Assessment of the long-term and transgenerational consequences of perturbing preimplantation embryo development in mice. *Biol. Reprod.*, 77: 889-896.
 - 49) Hill JR. 2014. Incidence of abnormal offspring from cloning and other assisted reproductive technologies. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 2: 307-321.
 - 50) Dumoulin JC, Land JA, Van Montfoort AP, Nelissen EC, Coonen E, Derhaag JG, Schreurs IL, Dunselman GA, Kester AD, Geraedts JP, Evers JL. 2010. Effect of in vitro culture of human embryos on birthweight of newborns. *Hum. Reprod.*, 25: 605-612.
 - 51) Eskild A, Monkerud L, Tanbo T. 2013. Birthweight and placental weight; do changes in culture media used for IVF matter? Comparisons with spontaneous pregnancies in the corresponding time periods. *Hum. Reprod.*, 28: 3207-3214.
 - 52) Kleijkers SH, van Montfoort AP, Smits LJ, Coonen E, Derhaag JG, Evers JL, Dumoulin JC. 2015. Age of G-1 PLUS v5 embryo culture medium is inversely

- associated with birthweight of the newborn. *Hum. Reprod.*, 30: 1352-1357.
- 53) Dobbs KB, Rodriguez M, Sudano MJ, Ortega MS, Hansen PJ. 2013. Dynamics of DNA methylation during early development of the preimplantation bovine embryo. *PLoS One*, 8: e66230.
- 54) Maalouf WE, Alberio R, Campbell KH. 2008. Differential acetylation of histone H4 lysine during development of in vitro fertilized, cloned and parthenogenetically activated bovine embryos. *Epigenetics*, 3: 199-209.
- 55) Wee G, Koo DB, Song BS, Kim JS, Kang MJ, Moon SJ, Kang YK, Lee KK, Han YM. 2006. Inheritable histone H4 acetylation of somatic chromatins in cloned embryos. *J. Biol. Chem.*, 281: 6048-6057.
- 56) Park JS, Jeong YS, Shin ST, Lee KK, Kang YK. 2007. Dynamic DNA methylation reprogramming: active demethylation and immediate remethylation in the male pronucleus of bovine zygotes. *Dev. Dyn.*, 236: 2523-2533.
- 57) Ross PJ, Ragina NP, Rodriguez RM, Iager AE, Siripattarapivat K, Lopez-Corrales N, Cibelli JB. 2008. Polycomb gene expression and histone H3 lysine 27 trimethylation changes during bovine preimplantation development. *Reproduction*, 136: 777-785.
- 58) Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Peters A, Jenuwein T, Wolf E, Reik W, Dean W. 2003. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr. Biol.*, 13: 1116-1121.