

## 論文題目

### Genome-wide replacement of histone H3 variants during mammalian oogenesis and preimplantation development

### 哺乳類生殖細胞と初期胚におけるヒストン H3 変異体の動態解析

氏名 秋山 智彦

#### 【序論】

我々の体を構成する 200 種類ともいわれる細胞は、受精卵というたった 1 つの細胞から発生・分化する。受精卵は分化における全能性を持っており、それは卵割の開始後も発生の初期段階では維持されるが、胚盤胞期になると栄養外胚葉と内部細胞塊という 2 つの細胞系列に分かれる。

この過程に遺伝子発現のダイナミックな変化が関与していると考えられている。すなわち、最終分化した細胞である卵が受精してそれまでの遺伝子発現プログラムをいったん初期化することで全能性を獲得し、さらに初期発生の過程で新たな遺伝子発現プログラムを進行させることにより未分化な状態から分化していくと考えられる (図 1)。ところが、これらの制御機構に関して現在のところまったく明らかになっていない。しかしながら、それが遺伝子発現調節機構の変化によるものであることから、エピジェネティクスが関与していることは疑いのないところである。

一般に分化した細胞がその性質を次世代の娘細胞に伝えるためにはエピジェネティックな情報を記憶しておく必要がある。遺伝子発現制御には DNA とヌクレオソームを構成するヒストン蛋白質の翻訳後修飾が関わっていることがよく知られているが、さらにヒストン自体がその役割を果たしていることが近年明らかにされた。すなわち、哺乳類のヒストン H3 には 3 つの変異体があり、その中の H3.3 はゲノムワイドに活性化した遺伝子の調節領域に局在し、その局在は分裂期においても維持され、次世代に受け継がれることが報告されている。すなわち、H3.3 は分化状態を維持するための「cell memory」として機能していると考えられている。さらに、DNA 複製時にクロマチンに組み込まれる H3.1 と H3.2 に関する翻訳後修飾が異なることから機能的に異なるゲノム領域に分布している可能性が示されている。

したがって、受精前後における分化した卵から全能性を持つ胚への初期化機構、そしてその後、初期発生過程で未分化な状態から分化した状態に変化させる分化調節機構において、ゲノム上でのヒストン H3 変異体のダイナミックな置換が関わっている可能性がある。

そこで本研究では、マウスの卵形成および受精後の初期胚発生におけるヒストン H3 変異体の動態解析を行うことで、分化全能性の獲得、未分化性の維持、および未分化から分化への進行を制御する分子メカニズムの解明を試みた。

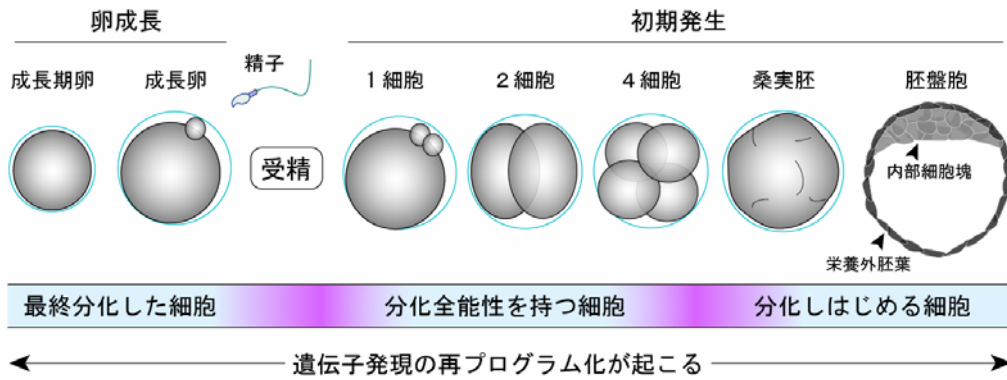


図1 受精前後における遺伝子発現の再プログラム化

## 【結果と考察】

### 1. 受精前後の初期化機構における H3.3

マウスの卵巣より成長卵を回収し、Flag-H3.3 mRNA を細胞質にマイクロインジェクションしてから抗 Flag 抗体で免疫染色したところ、翻訳された Flag-H3.3 が核内に移行していることを確認した。そこで、この卵を培養し第 2 減数分裂中期に達した後に *in vitro* で受精させた。その結果、未受精卵の染色体上に局在していた Flag-H3.3 は受精直後に形成された雌性前核からグローバルに消去されていることが明らかとなった。

しかしながら、この実験系において DNA に組み込まれた Flag-H3.3 が卵特異的に発現する遺伝子の調節領域に正確に局在しているのかどうか、という疑問が残った。なぜなら、成長卵にインジェクションした Flag-H3.3 が核に局在していたとはいえ、上述したようにこの時期にはすでに転写が停止しており、核に組み込まれた Flag-H3.3 の配置が遺伝子発現していたときの調節領域を反映しているのかわからないからである。そこで *in vivo* の卵成長過程で形成されるゲノム上の H3.3 の置換を確認するために、転写が活発に行われている卵成長期に Flag-H3.3 を発現するトランスジェニックマウスの作製を試みた。トランスジーンとしては、卵成長期に特異的に発現する *Zp3* プロモーターの下流に Flag-H3.3 をつなげたものを用いた。このトランスジェニックマウスから卵を採取し解析した結果、卵成長期に発現して核に組み込まれた Flag-H3.3 は成長卵にも維持されていることがわかった。さらに、mRNA マイクロインジェクションの結果と同様に、受精前までにクロマチンを構成していた H3.3 は受精後に雌性前核から抜けていくことが明らかとなった(図 2)。以上の結果から、遺伝子発現の cell memory として機能する H3.3 が受精後にゲノムワイドに消去され、そのことが遺伝子発現プログラムの初期化機構に関与していることが強く示唆された。

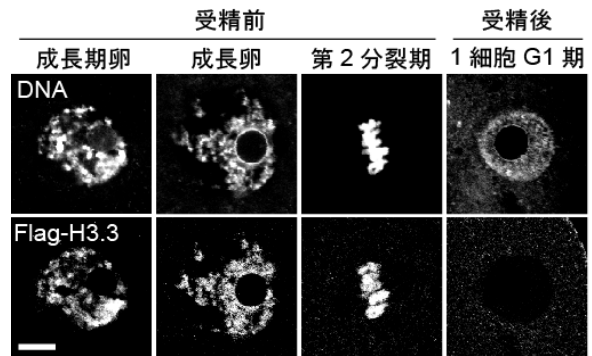


図2 受精前後における Flag-H3.3 の動態  
Zp3-Flag-H3.3 トランスジェニックマウスより回収した卵を、*in vitro* で受精させたときの免疫染色像。  
スケールバー：10 μm.

### 2. 受精後の初期胚におけるヒストン H3 変異体の動態

マウスの卵管から第 2 減数分裂中期に達した卵を採取し、Flag タグを付加したそれぞれのヒストン H3 変異体の mRNA を細胞質にマイクロインジェクションしたあとに *in vitro* で受精させ培養を行った。その結果、Flag-H3.1 は 1 細胞期および 2 細胞期で起こる 2 回の DNA 複製期を介しているにもかかわらず、この時期に核への局在はみられなかった(図 3A)。ところが、4 細胞期以降になると核に Flag-H3.1 の強いシグナルを確認できたことから(図 4A)、H3.1 は初期胚では 4 細胞期になってはじめて核へ組み込まれていくことがわかった。一方、Flag-H3.2 は受精後の 1 細胞期の DNA 複製期を過ぎるとどの時期の核にも局在がみられた(図 3B、4B)。また、Flag-H3.3 は 1 細胞期の G1 期に雄性前核に観察された(図 3C)。この結果、精子ゲノムを構成するプロタミンが卵由来のヒストンに置換され、雄性前核を形成するときに使われるヒストン H3 変異体は H3.1 や H3.2 ではなく H3.3 であることがわかった。その後 Flag-H3.3 は 1 細胞期の DNA 複製期に雌雄の両前核に組み込まれたあと、すべての初期発生過程において核に局在することが明らかとなった(図 3C、4C)。

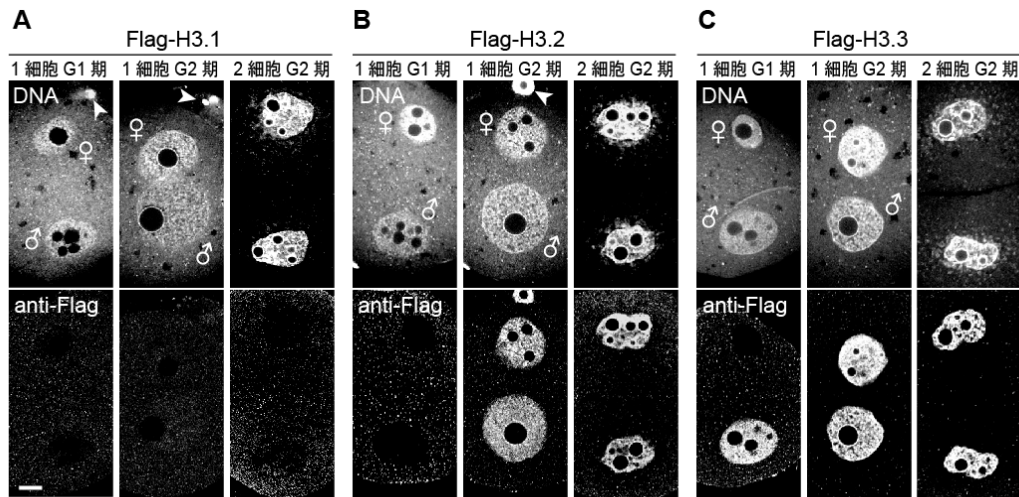


図3 1細胞期および2細胞期におけるヒストン H3 変異体の動態  
 3週齢雌マウスの卵管から第2減数分裂中期の卵を回収し、(A) Flag-H3.1、(B) Flag-H3.2、(C) Flag-H3.3 の mRNA をマイクロインジェクションした。その卵を *in vitro* で受精させて培養した1細胞期および2細胞期における免疫染色像。受精後に精子ゲノムと卵ゲノムはそれぞれ雄性前核 (♂) と雌性前核 (♀) に分かれて存在する。矢頭は極体の DNA を示す。スケールバー: 10  $\mu$ m。

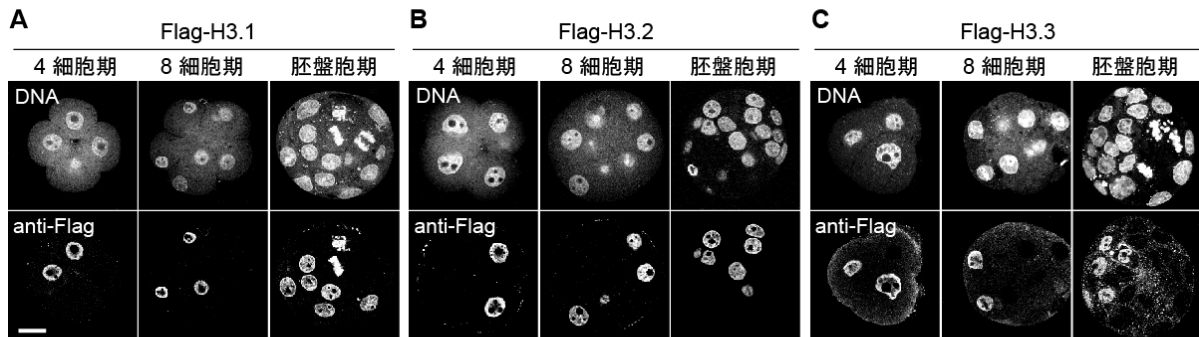


図4 4細胞期以降におけるヒストン H3 変異体の動態  
*In vitro* で受精させ2細胞期になった胚の片側の割球に (A) Flag-H3.1、(B) Flag-H3.2、(C) Flag-H3.3 の mRNA をマイクロインジェクションし、培養した4細胞期、8細胞期、胚盤胞期の免疫染色像。スケールバー: 20  $\mu$ m。

初期胚では発生が進行するにしたがって、未分化な状態から分化した状態へと変化する。その変化にクロマチン構造が関与している可能性があるため、初期胚におけるヒストン H3 変異体の核内局在をクロマチン形態の観点から調べた。クロマチンの形態は、不活性化された領域が多く存在する密に凝集したクロマチンであるヘテロクロマチンと、活性化した遺伝子領域が多く存在する緩んだクロマチンであるユークロマチンとに大別される。本実験では未分化な状態である2細胞期胚と、分化が起こっている状態の胚盤胞期胚を比較した。クロマチン形態の区別は DNA 染色によってヘテロクロマチン領域が濃く染色されるので明瞭に見分けることができる。その結果、Flag-H3.1 は前述したように2細胞期までには核に局在せず、どのクロマチン領域にも局在しなかった (図 5A)。ところが胚盤胞期になると Flag-H3.1 はユークロマチンおよびヘテロクロマチン領域にシグナルが観察された。Flag-H3.2 は2細胞期と胚盤胞期のどちらの時期も両方のクロマチン領域に局在していた。また Flag-H3.3 は2細胞期ではユークロマチンおよびヘテロクロマチン領域の両方に検出されたが、胚盤胞期ではユークロマチン領域に多く局在しており、ヘテロクロマチン領域にはほとんど局在が見られなかった (図 5B)。近年、H3.3 は遺伝子の活性化にかかわるヒストン修飾がなされ、いわゆる「ゆるんだ」状態のクロマチン構造を作り、逆に H3.1 は遺伝子の不活性化にかかわる修飾を受けて凝集したクロマチン構造を作るという報告がなされている。したがって、発生初期には H3.3 がゲノム上のどの領域にも存在することで可塑性を持つ、すべてのゲノム領域で「ゆるんだ」クロマチン構造を形成していると考えられる。さらに、発生が進行するにつれて H3.1 が新たにゲノムに組み込まれていき、その一方で H3.3 がヘテロクロマチン領域から消失していくというダイナミックなヒストン変異体置換がゲノム領域のサイレンシングに関与していることが示唆された。

以上の結果から4細胞期以降に核に組み込まれる H3.1 が初期胚における分化調節機構に関与していることが示されたため、RNA 干渉法により H3.1 の特異的ヒストンシャペロンである CAF-1A (Chromatin assembly factor 1A) の発現をノックダウンした。その結果、4細胞期以降の H3.1 の核への局在が抑制され、桑実胚期の前後で発生を停止し、胚盤胞期まで正常に到達したものはほとんどい

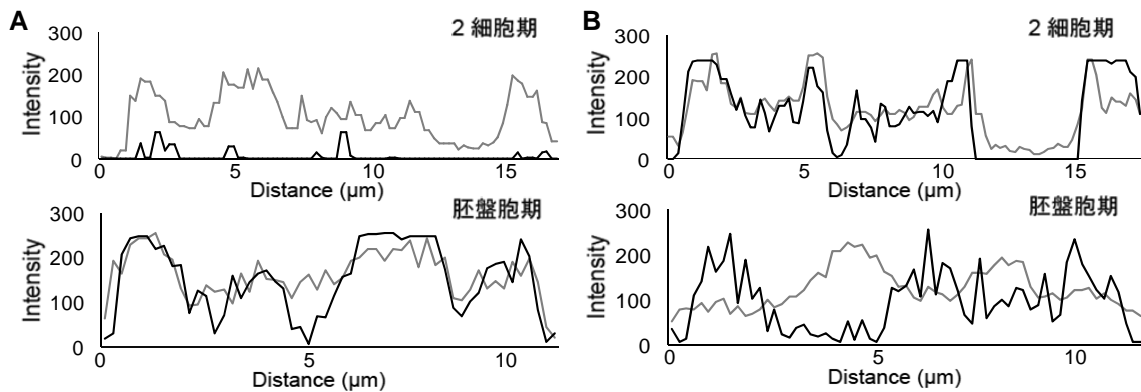


図5 2細胞期および胚盤胞期におけるヒストン H3 変異体の核内局在  
2細胞期および胚盤胞期における (A) Flag-H3.1、(B) Flag-H3.3 の核内における蛍光強度のプロファイル (黒) を DNA 染色 (グレー) と比較した。DNA 染色による蛍光強度が高いほどヘテロクロマチン化された領域であることを示している。

なかった (図 6)。したがって、H3.1 が 4 細胞期以降のゲノムワイドなヘテロクロマチン形成に深く関与していることが示唆され、その正しい形成過程が初期発生に必須であると考えられる。

以上より H3.3 が 2 細胞期ではクロマチン全体に存在し、胚盤胞期になるとユークロマチン領域のみに局在することと、さらに H3.1 が 4 細胞期以降に核に組み込まれていくことを合わせて、分化能の視点から考えると次のようなモデルが提唱できる。1 細胞期や 2 細胞期には H3.1 がクロマチンに組み込まれないために、H3.3 がゲノム上のどの領域にも存在することが可能となり、あらゆる遺伝子発現パターンが可能な未分化の状態が維持されている。そして 4 細胞期以降に新たに H3.1 がゲノム上に組み込まれることによりヘテロクロマチン化される領域が決定していき、同時に H3.3 がユークロマチンに限定して配置されることで分化能が制限されていくと考えられる。

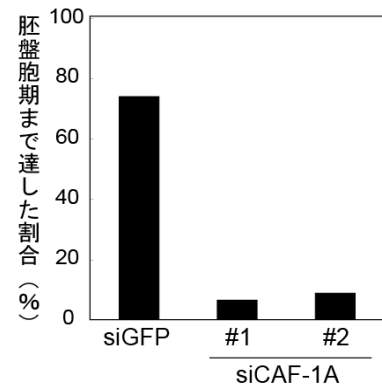


図6 H3.1 の核への局在を阻害したときの発生率への影響  
CAF-1A に対する siRNA (small interfering RNA) により 4 細胞期以降の H3.1 の核への組み込みを阻害したときの胚盤胞期までの発生率。コントロールとして EGFP に対する siRNA を用いた。

### 【結論】

本研究では、哺乳類の卵発生および初期発生過程におけるヒストン H3 変異体の動態を解析し、ゲノム上におけるそのダイナミックな置換が分化全能性の獲得や未分化から分化への進行の制御機構に関与している可能性があることを示した。今後は遺伝子ごとの調節領域におけるヒストン H3 変異体の動態を調べるとともに、その機構を作動させる制御因子を明らかにすることが重要になってくると考えられる。このように遺伝子発現およびクロマチン構造の変化を司る因子について詳細な機能解析を進めることで、同一の DNA 配列を持つ細胞がどのように未分化状態を獲得し、そして再び分化した状態へと運命付けられていくのかを分子レベルで解明できると確信する。

### 【発表論文】

1. Akiyama, T., Kim, J.-M., Nagata, M., and Aoki, F. (2004) Regulation of histone acetylation during meiotic maturation in mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 69, 222-227.
2. Akiyama, T., Nagata, M., and Aoki, F. (2006) Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103, 7339-7344.
3. Matushashi, T., Akiyama, T., Aoki, F., and Sakai, S. (2007) Changes in histone modification upon activation of dormant mouse blastocysts. *Anim. Sci. J.*, 78, 575-586.
4. Inoue, A., Akiyama, T., Nagata, M., and Aoki, F. (2007) The perivitelline space-forming capacity of mouse oocytes is associated with meiotic competence. *J. Reprod. Dev.*, 53, 1043-1052.
5. Ooga, M., Inoue, A., Kageyama, S. I., Akiyama, T., Nagata, M., and Aoki, F. Changes in H3K79 methylation during preimplantation development in mice. *Biol. Reprod.*, in press.