

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04752

研究課題名(和文) 遺伝子発現リプログラミングへのクロマチン構造とヒストン変異体の関与について

研究課題名(英文) Involvement of chromatin structure and histone variants in reprogramming of gene expression

研究代表者

青木 不学 (Aoki, Fugaku)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・客員共同研究員

研究者番号：20175160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,500,000円

研究成果の概要(和文)：受精によって、分化した卵から全能性を持つ受精卵へと変化するが、その際にクロマチン構造の変化を伴う遺伝子発現のリプログラミングが起こる。本研究では、クロマチン構造および遺伝子発現の調節に関わっていることが知られているヒストン変異体に着目し、遺伝子発現リプログラミングを調節するメカニズムの解明を目指した。その結果、全能性を持つ受精直後の胚においては、H3、H2AそしてH1変異体ではそれぞれH3.3、H2A.XとTH2A、そしてH1fooとH1aが大部分を占めていることが分かった。さらに、それ等によって構成されるクロマチンは緩んだ構造をしており、散財的な遺伝子発現を起こしていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本来、遺伝子発現のプログラムは不可逆的なものであるが、受精の前後で一度だけリセットされる必要がある。これにより、分化した卵から全能性のある受精卵へと変化する。このように生命を次世代に引き継ぐために起こる重要な生命現象が遺伝子発現のリプログラミングであるが、本研究の学術的意義は、このメカニズムの一端を明らかにしたことである。また、現在のところiPS細胞およびクローン動物作成の成功率が低い、これはリプログラミングに異常があることがその主な原因と考えられる。したがって、本研究の成果は効率的なiPS細胞およびクローン動物の作成法に新たな途を開くものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：After fertilization, differentiated oocytes are transformed to totipotent zygotes. In this process, reprogramming of gene expression accompanied with the change in chromatin structure occurs. The purpose of this project is to clarify the mechanism of regulating reprogramming by focusing histone variants which are involved in the regulation of chromatin structure and gene expression. The results showed that H3.3, H2A.X/TH2A and H1foo/H1a as the variants of H3, H2A and H1, respectively, are abundant in totipotent 1-cell stage embryos. The chromatin structure composed of these variants are loosened, which caused a promiscuous gene expression.

研究分野：動物育種繁殖学

キーワード：遺伝子発現リプログラミング ヒストン変異体 全能性 受精卵

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子発現のリプログラミングについて

生命の誕生は、分化した卵と精子が接合し、全能性を持つ受精卵を生じることから始まる。そして、その際に遺伝子発現のリプログラミングが起こる。すなわち、成長中の卵は分化した細胞であり、生殖細胞特異的な遺伝子発現パターンを示す。その後、成長期の終盤になって一旦遺伝子発現を停止し、そのまま減数分裂を進行させて未受精卵となる。そして、受精後に全能性を持つ 1 細胞期胚となって遺伝子の発現を開始し、新しい遺伝子発現プログラムが始まる。この様に、分化した卵と精子が接合し全能性を持つ 1 細胞期胚を生じるということは、遺伝子発現の面から見ると、受精の前後で遺伝子発現のリプログラミングが行われているということを示している。実際に、RNA シーケンス (RNAseq) を用いた最近の研究により、受精前後で著しい遺伝子発現パターンの変化が起こっていることが明らかとなった。すなわち、受精後の 1 細胞期においては、遺伝子の大部分が転写されているだけでなくトランスポゾンを含む遺伝子間領域までもが転写されていた (文献 1)。一方で、興味深いことに卵特異的遺伝子の多くは逆にほとんど転写されていないことが示された。また、このようなゲノム広範な転写はエンハンサーを必要としない、所謂「無分別な転写制御」によることが明らかとなっている。しかし、このような著しい遺伝子発現の変化を引き起こすメカニズムについては、これまでにほとんど明らかにされていない。そこで、本研究の学術的な「問い」は、遺伝子発現リプログラミングがどのように調節されているのか、というものである。

(2) クロマチン構造と遺伝子発現について

元来、コアヒストンとリンカーヒストンによって構成されるクロマチン構造は、転写因子が DNA へアクセスすることを阻害し、転写に対して抑制的に働くものと考えられている。そこで、実際に転写が起こる際には、エンハンサーにクロマチン構造を変化させる作用を持つ転写因子が結合し、その働きにより転写開始付近のクロマチン構造が緩むことで基礎転写因子がプロモーター配列に結合することが可能となり、転写が起こる。このことから、上述したような 1 細胞期のエンハンサーに依存しないゲノム広範からの無分別な転写は、クロマチン構造全体がすでに緩んでいることによるものではないかとの仮説が成り立つ。そして、実際に受精後に著しくクロマチン構造が緩むことが fluorescence recovery after photobleaching (FRPP) 法により明らかにされている (文献 2、3)。

(3) ヒストン変異体によるクロマチン構造と遺伝子発現の調節について

近年、遺伝子発現の調節にヒストン変異体が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。すなわち、ヌクレオソームを構成する 4 種類のコアヒストンのうち、特に H3 と H2A には様々な変異体が存在し、それぞれがクロマチン構造やその特異的修飾を変化させることで遺伝子発現のオン/オフに関与していることが報告されている。例えば、ヒストン H3 には、主として H3.1、H3.2、H3.3 の 3 種類の変異体があるが、それぞれアセチル化やメチル化などの異なる修飾が入ることで、遺伝子発現の調節に異なる役割を果たしている (表 1)。さらに、H3.1 と H3.2 はクロマチン構造を締めることで転写を抑制し、逆に H3.3 はそれを緩めることで活性化させる働きがあることが知られている。また、H2A にも様々な変異体

が存在し、例えば、H2A.Z は転写の活性化に、macroH2A はヘテロクロマチン形成による遺伝子のサイレンシングに関わっている。したがって、これらのヒストン変異体が互いに置き換わることで、遺伝子発現のオン/オフがダイナミックに切り替えられる。

さらに、これらの変異体以外に、ヌクレオソームを折り畳みクロマチン構造を形成する役割があるリンカーヒストン H1 にも多数の変異体が存在する。その多くは、体細胞で様に発現しほぼ同様の機能を持つが、H1foo は卵および 1 細胞期胚において特異的に発現する。これまでの研究で H1foo は緩んだクロマチン形成に関与することが明らかになっている。

以上のように、ヒストン変異体はそれぞれその修飾およびクロマチン構造への役割が異なり、それらの大規模な置換により受精前後における遺伝子発現のリプログラミングが調節されていることが考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではヒストン変異体の動態に着目し、受精前後における遺伝子発現リプログラミングのメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究の全体計画は、次の 2 つのステップから成っている。

(1) 受精前後におけるヒストン変異体の置換を CUT&RUN-sequencing (CUT&RUN-seq) によって詳細に解析し、RNAseq のデータから得られた転写活性化遺伝子の変化との関連を明らかにする。

(2) ヒストン変異体のノックダウン、あるいはその過剰発現により置換を阻害し、クロマチン構造および遺伝子発現のリプログラミングへの影響をそれぞれ塩析法および RNAseq により解析する。

上記(1)、(2)のそれぞれについて、以下に具体的な実験計画を記す。尚、実験動物としてはマウスを用いる。マウスは、古くから卵形成および受精後の初期発生に関する研究に多く用いられており、その調節機構に関する知見が集積している。さらに全ゲノムが解読され、分子生物学的な解析が容易であることから、本研究に最適の実験動物であると考えられる。

(1)受精前後の卵および1細胞期胚におけるヒストン変異体の解析

受精前に活発に転写を行っている成長期卵、転写を停止した成長卵、未受精卵および1細胞期胚について、ゲノム上におけるヒストン H3、H2A および H1 の変異体の局在を、CUT&RUN-seq によって網羅的に解析する。この方法は、従来用いられていたクロマチン免疫沈降に比べて少量のサンプルで実行可能であり、バックグラウンドノイズを大幅に減らすという利点がある(文献4)。

クロマチン構造の解析法として、これまでにヒストンの交換速度を指標とした FRAP 法、DNA 切断酵素の DNA へのアクセシビリティを指標とした手法(DNase sensitivity assay, ATAC など) が用いられてきた。しかし、FRAP 法はゲノム全体でのクロマチンの緩みを解析する手法であり、ゲノム上の個々の領域を解析できない。また、DNA 切断酵素を用いる方法は、基本的に DNA 切断酵素がアクセスできる場所を緩んだ領域と解釈しているが、実際にはそこに転写因子などのタンパク質が結合していることで逆に酵素がアクセスできないという逆の結果になるケースがある。そこで本研究では、塩析によるヌクレオソームからのヒストンの離脱を指標とする塩析法を用いて、クロマチン構造を解析することを試みる。すなわち、クロマチン構造が緩い領域では低い濃度の塩でヒストンが離脱することが知られているからである。

これまでの実験で、初期胚の膜を Triton X で可溶化したのち、NaCl の濃度を変化させて一部のヒストンをクロマチンから離脱させ、それぞれの変異体に対する抗体を用いてその離脱の状態を解析したところ、変異体によって離脱する NaCl 濃度が異なっていた(未発表データ)。また、いくつかのヒストン修飾の抗体を用いて解析したところ、ヒストン修飾の種類によってクロマチンからのヒストンの離脱の状態が異なっていることが明らかとなった。尚、この解析では、核全体を免疫染色で調べたものであるが、塩析を行った後に、CUT&RUN-seq を行うことで、ゲノム上でのクロマチン構造が緩い領域と各ヒストン変異体あるいは修飾との関連がダイレクトに解析できるという画期的な新手法と考えられる。

これまでに申請者の研究室で得られた RNAseq のデータを用いて、受精前後で発現パターンが変化する遺伝子を探索する。次いで、探索された遺伝子のゲノム領域でのヒストン変異体の動態およびクロマチン構造の緩みを上記 で得られた CUT&RUN-seq、塩析法のデータを用いて調べる。この解析により、受精前後にクロマチン構造および発現量が変化するゲノムの領域において、その局在が同時に変化する変異体を同定し、これを遺伝子発現リプログラミングに関与するヒストン変異体の候補とする。

(2)発現抑制あるいは過剰発現による遺伝子発現リプログラミングに関与する変異体の同定

上記の実験でリプログラミングへの関与が考えられたヒストン変異体について、RNAi による発現抑制、あるいは crRNA の導入による過剰発現によってそれらが実際にリプログラミングに関与しているかどうかを明らかにする。尚、1細胞期胚にヒストン変異体の crRNA を顕微注入して過剰発現させることで、本来クロマチンへの局在が少ない変異体でもその取り込み量が大きく増加することが申請者の研究室で明らかにされている(未発表データ)。

変異体の発現抑制あるいは過剰発現を行った1細胞期胚について、塩析法および RNAseq でクロマチン構造および遺伝子発現の変化を解析する。その結果、変異体の局在変化と関連のあった遺伝子の発現パターンが受精前の卵型の発現パターンを示した時、この変異体は遺伝子発現のリプログラミングに関与している可能性が高いものと考えられる。

上記の変異体の発現を抑制した際におけるカウンターパートとなる変異体のゲノム上における局在を CUT&RUN-seq で解析し、それらが1細胞期胚においても卵型の局在パターンに留まっていることを確認する。上記に加えて、この確認がなされた場合、候補とされた変異体は遺伝子発現のリプログラミングに関与しているものと考えられる。

4. 研究成果

2021年度は、受精前後におけるヒストン変異体の置換とクロマチン構造の変化との関連を明らかにすることを目的とした。これまでの研究では、ヒストン変異体のゲノム上の配置については、ChIP や CUT & RUN による解析が行われてきているが、これらは単に配置を調べるだけで、クロマチン構造との関連は明らかにできない。そこで、塩析を行った後に CUT & RUN を行うことでこれらの関連を解析する手法を考案した。すなわち、塩析によるヌクレオソームからのヒストンの離脱を指標としたクロマチン構造の解析と CUT&RUN による配置の解析を複合させた手法である。そこでまず予備段階として、EGFP を結合させた H2B を 1、2 細胞期胚に取り込ませ、塩濃度を変化させてそのクロマチンからの乖離を調べたところ、クロマチン構造が緩んでいる 1 細胞期胚では、2 細胞期胚と比較して低い塩濃度から乖離が始まっていた。また、H3 変異体の特異抗体による免疫染色での検出では、変異体間で乖離が起こる塩濃度に違いが見られた。さらに H3 変異体に依存するヒストン修飾に関しても、それらの間で乖離度に違いがあった。しかし、まだ乖離が始まる前の低い塩濃度で処理した際に、未処理のものよりも H3 変異体や修飾のシグナルが増加するという現象が見られ、これらは解析の精度に悪影響をもたらすものと考えられ、その改善が必要と考えられた。

受精後の 1 細胞期胚での全能性に関わる遺伝子発現の特徴として、緩んだクロマチン構造に依存するゲノム全域からの広範な転写が起こることをこれまで報告者は明らかにしてきた。そこで、2022 年度は、そのメカニズムの解明のため、クロマチンの構成要素であるリンカーヒストン H1 に着目して研究を行った。すなわち、ヒストン H1 には多数の変異体があり、それぞれがクロマチン構造及び遺伝子発現の調節に異なった役割を持つことが明らかとなっている。そして受精後に全能性を獲得した 1 細胞期胚では、それら変異体の中でクロマチンの緩みに関わっていると考えられている H1foo と H1a のみが多く発現しており、これらがこの時期の遺伝子発現の調節に関わっていることが考えられた。しかし、これまでの研究で H1foo をノックダウンしても発生に影響が見られなかったことから、そこで、本年度は H1a のノックアウト (KO) マウスを CRISPR/Cas9 法によって作成し、その発生を調べると共に H1foo のクロマチンへの取り込みの影響を調べた。その結果、H1a 遺伝子を欠損したマウスの作製に成功し、ヘテロ KO マウス同士の交配したところ、誕生したホモ KO マウスの割合がメンデル比で期待されるものよりの少なかった。さらに、H1a KO の初期発生への影響を調べたところ、2 から 4 細胞期への発生率がやや低下し、さらに胚盤胞期までの発生率が大きく低下していた。この低下は、母性のみでの欠損においても完全欠損のものと同程度に見られたことから、H1a は母性因子として初期発生に機能していることが示された。また、H1a KO 胚において H1foo のクロマチンへの取り込みの増加は見られなかったことから、H1a の機能を H1foo が相補してはいないことが示唆された(文献 5、6)。

これまでの研究で、分化した受精前の卵から全能性を持つ初期胚への遺伝子発現パターンの変化、すなわち遺伝子発現のリプログラミングは、次のようなプロセスを経て起こることが明らかとなっている。すなわち、卵特異的な転写因子などによる卵特異的な遺伝子発現(成長期卵)、エンハンサー非依存な promiscuous な遺伝子発現(1 細胞期~2 細胞前期)、そしてエンハンサー依存的に調節された遺伝子発現(2 細胞中期以降)となる変化である。このプロセスにおける 1 細胞期から 2 細胞後期にかけての著しい遺伝子発現パターンの変化には、クロマチン構造の変化(緩んだクロマチン構造から締まった構造への変化)が関与していることが示唆されている。また、1 細胞期から 2 細胞後期にかけて遺伝子発現の調節に重要な働きを持つヒストン変異体である H3.1/3.2 が急激にクロマチンに取り込まれることが明らかにされている。

そこで 2023 年度は、H3.1/3.2 が各遺伝子領域で実際にクロマチン構造の変化とその発現にどのように関与しているかを網羅的に解析することで、2 細胞前期から後期にかけての遺伝子発現リプログラミングへの H3.1/3.2 の役割を明らかにしていくことにした。まず、2 細胞前期胚、2 細胞後期胚、そして H3.1/3.2 をノックダウン (KD) した 2 細胞後期胚のクロマチン構造を Hi-C 法で解析したところ、2 細胞前期から後期にかけて形成される Topologically Associating Domain (TAD) が H3.1/3.2 の KD により形成されなくなることが分かった。また、FRAP 法および DNA sensitivity assay により、H3.1/3.2 を KD された 2 細胞後期胚では前期胚同様にクロマチン構造が緩んだままであることが分かった。さらに、H3.1/3.2 の ChIP データを解析したところ、2 細胞後期に発現が抑制される遺伝子群に H3.1/3.2 が多く取り込まれていることが明らかとなった。そして、これらの遺伝子の発現が H3.1/3.2 の KD によって十分に抑制されないままであることが分かった。これらの結果より、受精後の 1 細胞期から 2 細胞後期にかけての遺伝子発現のリプログラミングに H3.1/3.2 のクロマチンへの取り込みが重要な役割を果たしていることが強く示唆された(文献 7)。

以上の研究成果をまとめると次のようになる。受精によって、分化した卵から全能性を持つ受精卵へと変化するが、その際にクロマチン構造の変化を伴う遺伝子発現のリプログラミングが起こる。本研究では、クロマチン構造および遺伝子発現の調節に関わっていることが知られているヒストン変異体に着目し、遺伝子発現リプログラミングを調節するメカニズムの解明を目指した。その結果、全能性を持つ受精直後の胚においては、H3、H2A そして H1 変異体ではそれぞれ H3.3、H2A.X と TH2A、そして H1foo と H1a が大部分を占めていることが分かった。さらに、それ等によって構成されるクロマチンは緩んだ構造をしており、散財的な遺伝子発現を起こしていることを明らかにした。

<引用文献>

- (1)Abe et al., EMBO J. 34:1523-1537, 2015. (2)Ooga et al., Epigenetics 11:85-94, 2016.
- (3)Ooga et al., Biochem Biophys Res Commun 500:583-588, 2018. (4)Skene et al., Nat Protoc 13:1006-1019, 2018. (5)Funaya et al., Reproduction 164:19-29, 2022. (6)Funaya et al., J Reprod Dev 69: 178-182, 2023. (7)Funaya et al., Nuc Acids Res Epub ahead of print (<https://doi.org/10.1093/nar/gkae214>).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 FUNAYA Satoshi、WANG Yuan、SUZUKI Masataka G.、IKAWA Masahito、AOKI Fugaku	4. 巻 69
2. 論文標題 Involvement of linker histone variant H1a in the regulation of early preimplantation development in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 178 ~ 182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2023-013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Funaya Satoshi、Kawabata Yuria、Sugie Kenta、Abe Ken-ichiro、Suzuki Yutaka、Suzuki Masataka G.、Aoki Fugaku	4. 巻 164
2. 論文標題 Involvement of the Linker Histone H1Foo in the Regulation of Oogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 19-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/REP-21-0233	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wang Yuan、Oda Shoji、Suzuki Masataka G.、Mitani Hiroshi、Aoki Fugaku	4. 巻 117
2. 論文標題 Cell cycle-dependent radiosensitivity in mouse zygotes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103370 ~ 103370
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dnarep.2022.103370	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 AOKI Fugaku	4. 巻 68
2. 論文標題 Zygotic gene activation in mice: profile and regulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 79 ~ 84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2021-129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawamura Machika, Funaya Satoshi, Sugie Kenta, Suzuki Masataka G, Aoki Fugaku	4. 巻 4
2. 論文標題 Asymmetrical deposition and modification of histone H3 variants are essential for zygote development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202101102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件(うち招待講演 3件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Wang Y, Aoki F
2. 発表標題 Involvement of H2A variants in DNA damage response of zygotes
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Funaya S, Aoki F
2. 発表標題 H3.1/3.2 regulate the establishment of zygotic gene expression
3. 学会等名 56th Annual meeting of Society for the Study of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青木不学
2. 発表標題 胚性遺伝子発現プログラムにおけるダブルホメオボックス遺伝子の役割
3. 学会等名 公開シンポジウム「全能性プログラム：デコーディングからデザインへ」
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Aoki F, Funaya S
2. 発表標題 Involvement of histone variants H3.1/3.2 in the progression of gene expression program in early mouse embryos
3. 学会等名 The International Symposium "Totipotency and Germ Cell Development" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木不学
2. 発表標題 マウス発生におけるH2A変異体の関与
3. 学会等名 全能性プログラム：デコーディングからデザインへ(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木不学
2. 発表標題 受精前後における遺伝子発現リプログラミングに関する研究
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 船屋智史, 青木不学
2. 発表標題 マウス受精後における遺伝子発現リプログラミングへのH3.1/3.2の関与
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuan WANG, Fugaku AOKI
2. 発表標題 Cell-cycle phase dependent radiosensitivity of zygotes
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井上 梓 (Inoue Azusa) (60814910)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・ チームリーダー (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------