

令和 4 年 4 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H03970

研究課題名(和文) 受精前後における遺伝子発現リプログラミングへのヒストン変異体の関与について

研究課題名(英文) Involvement of histone variants in the reprogramming of gene expression before and after fertilization

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・教授

研究者番号：20175160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 27,900,000円

研究成果の概要(和文)：受精前後において遺伝子発現リプログラミングが起こるが、本研究ではヒストン変異体の動態に着目し、そのメカニズムの解明を目指した。

研究の成果として、受精直後のマウス1細胞期胚において、H3変異体においてはH3.1/H3.2が極端に少なく、ほぼH3.3のみがクロマチンに存在し、またH2A変異体についてはH2A.XとTH2Aのみが多く存在していることが明らかとなった。ノックダウン/アウトおよび過剰発現によって、遺伝子発現およびクロマチン構造の変化が確認されたことから、これらがリプログラミングに関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、クローン動物やiPS細胞の作製成功により、リプログラミングについて高い関心が寄せられている。しかし、これまでのところ、受精前後におけるリプログラミングについては、その調節機構を調べた研究は極めて少ない。本研究により、リプログラミングの調節機構が明らかになることで、発生あるいは細胞分化を人為的に支配する途が新たに開けることが期待される。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、これはゲノムのリプログラミングが正常に進行していない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)：The purpose of this project is to elucidate the mechanism regulating the reprogram of gene expression after fertilization by analyzing the dynamics and the function of histone variants. First, I found that H3.3 but not H3.1/H3.2 is abundant in the nuclei of 1-cell stage embryos in mice. Regarding H2A variants, only H2A.X and TH2A is abundant. Knock-down/out and overexpression of these proteins caused the developmental delay and/or arrest and the changes in the expression of some stage specific genes and chromatin structure, suggesting that these histone variants are involved in the regulation of reprogramming.

研究分野：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 初期胚 卵 クロマチン構造

1. 研究開始当初の背景

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。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。

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、それぞれがその特異的修飾やクロマチン構造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った修飾が入ることで、遺伝子発現の調節に異なった役割を果たしている。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。

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

本研究計画は、次の **2** つのステップから成っている。

(1)ヌクレオソームを形成するコアヒストンの中で変異体を多く持つヒストン **H2A** と **H3** について、各変異体の核局在量の変化を免疫染色により受精前の卵、受精後の着床前初期発生過程の胚について解析する。

(2)(i)上記の解析により、受精前後あるいは受精後に多く発現し核局在量が大きく変化することが明らかとなった変異体をリプログラミングに関わっている因子の候補と考え、それらの発現を抑制し、その後の発生、遺伝子発現およびクロマチン構造の変化を解析することで実際の機能を明らかにする。

ii)核局在量が著しく低い、その前後の発生時期で急激に変化する変異体が存在した場合、これについてもリプログラミングに関与している可能性があるため、その強制発現により核局在量を増加させ、発生、遺伝子発現およびクロマチン構造の変化を解析する。

尚、具体的な方法としては、発現抑制に関しては、まず **siRNA** によるノックダウンを試みる。すなわち、受精直後に発現しているタンパク質は、受精前の卵において発現した母性 **mRNA** 由来のものが大部分であるため、**siRNA** は受精前の卵で作用させる必要がある。そこで、成長卵に **siRNA** を顕微注入し、**in vitro** での卵成熟および受精を行い、その後の解析を行う。ただし、タンパク質の中には半減期の長いものも存在し、それらは例え成長卵でその **mRNA** がすべて壊されたとしても、成長期に合成されたものが受精後まで残存することが考えられる。この場合、上記の **siRNA** を用いた方法では十分にノックダウンできないことから、**CRISPR-Cas9** によってノックアウトマウスを作成し、そこから得られた卵を用いて実験を行う。

また、発現増加については、目的の変異体の **crRNA** を作成し、これを未受精卵に顕微授精することで行う。

遺伝子発現については、各発生時期のマーカーとなる遺伝子を **RT-PCR** によって解析する。クロマチン構造の解析は、**fluorescent recovery after photobleaching (FRAP)** 法を用いて行う。

4. 研究成果

(1)**H3** 変異体

これまでに、受精前の卵および受精直後の **1** 細胞期胚では著しく緩んだクロマチン構造をしており、そこから **2** 細胞後期にかけてクロマチン構造が締まっていくことが明らかとなっている。そして、このようなクロマチン構造の変化が受精前後における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あることから、その変化を引き起こす因子として、ヒストン **H3** 変異体に着目した。すなわち、**H3.1/3.2** は所謂締まったクロマチン構造を形成し遺伝子発現に対して抑制的に機能することが報告されている。一方で **H3.3** はクロマチン構造を緩めることで遺伝子発現の活性化に関与することが知られている。

そこでまず、ヒストン **H3** 変異体について、受精前後におけるクロマチンへの局在の変化とその発生への役割を調べた。まず、**H3** 変異体の免疫染色を行うことに際し、**H3.1** と **H3.2** はアミノ酸が **1** 残基しか異なっておらずこれを区別できる抗体が存在しないため、この両方を認識する抗体を用いることにした。その結果、**H3.3** は受精前後およびその後の初期発生過程においてほぼ一定の割合で核局在が認められたのに対し、**H3.1/H3.2** は受精前から受精後の **1** 細胞期まで核内に非常に低いレベルでしか検出されなかった。その後 **2** 細胞期中期から次第に核局在が増加していくことが分かった。ただし、検出感度を上げてさらに詳細に解析したところ、**1** 細胞期胚では **H3.1/H3.2** は雌性前核にのみ核小体付近のヘテロクロマチン領域に比較的多く局在していることが明らかとなった。

次に、**1** 細胞期で **H3.1/H3.2** の核局在レベルが低いことの生物学的意義を明らかにするために、**H3.1**、**H3.2** および **H3.3** の **cRNA** を作成しこれを **1** 細胞期胚に顕微注入した。その結果、**H3.3** の **cRNA** を顕微注入した胚は正常に胚盤胞期まで発生したが、**H3.1** あるいは **H3.2** の **cRNA** を顕微注入したものでは、胚盤胞期への発生率が著しく低下した。したがって、**1** 細胞期胚の特に雄性前核のヘテロクロマチン領域において **H3.1/H3.2** が低レベルであることが初期発生に重要であることが明らかとなった。

また、**1** 細胞期から **2** 細胞期にかけて遺伝子発現のリプログラミングが起こっていることが知られていることから、**RNAi** による **H3.1/3.2** の発現抑制を行い、クロマチン構造及び遺伝子発現への影響を調べた。その結果、コントロール胚では **1** から **2** 細胞期にかけてクロマチンが締まるのに対し、発現抑制胚では緩んだ状態のままであった。さらに、**1** 細胞期で一過的に発現するが **2** 細胞期で発現が著しく低下する遺伝子を **RT-PCR** で解析したところ、**H3.1/3.2** の発現抑制胚では **2** 細胞期における発現低下が十分に起こらなかった。したがって、**H3.1/3.2** のクロマチンへの取り込みによるクロマチン構造の変化が、**1** 細胞期から **2** 細胞期にかけての遺伝子発現のリプログラミングに関与していることが示唆された。

(2)H2A 変異体

上記のようにヒストン **H3** がリプログラミングに関与していることが示唆されたが、コアヒストンを構成する他のヒストンである **H2A** も **H3** 同様にクロマチン構造および遺伝子発現の調節に重要な役割を果たしていることが知られている。また、**H3** と **H2A** 変異体の組み合わせが、実際のクロマチン構造の調節に関わっているという報告もある。さらに、これまでの当研究室の研究結果で、受精前後で **H2A** 変異体の構成が著しく変化することが明らかとなっている。そこで受精前後における **H2A** 変異体の動態を解析することにした。受精前はすべての **H2A** 変異体がクロマチンに取り込まれているが、受精後には **H2A.X** と **TH2A** が大部分となるように変化することから、これらのノックアウトマウスを作成してその機能を解析した。その結果、これらの変異体それぞれのノックアウトでは受精後の発生に顕著な影響は見られなかったが、この **2** 者のダブルノックアウトでは発生の停止が起こった。また、**TH2A** のノックアウトによって、**2** 細胞期に特異的に発現する一部の遺伝子に発現異常が見られた。したがって、受精後における **H2A** 変異体の大規模な置換がリプログラミングに関与していることが示唆された。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

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/lsa.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 -
1. 著者名 Sugie K, Funaya S, Kawamura M, Nakamura T, Suzuki MG, Aoki F 1	4. 巻 10
2. 論文標題 Expression of Dux family genes in early preimplantation embryos	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 19396
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-76538-9	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 Fugaku Aoki	4. 巻 100
2. 論文標題 Regulation of H3K9me3 during preimplantation development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 13-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/iory201.	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 Abe, K.-I., Funaya, S., Tsukioka, D., Kawamura, M., Suzuki, Y., Suzuki, M.G., Schultz, R.M. and Aoki, F.	4. 巻 115
2. 論文標題 Minor zygotic gene activation is essential for mouse preimplantation development.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA	6. 最初と最後の頁 E6780-E6788
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1804309115	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 該当する

1. 著者名 Funaya, S., Ooga, M., Suzuki, M.G. and Aoki, F.	4. 巻 592
2. 論文標題 Linker histone H1F00 regulates the chromatin structure in mouse zygotes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	6. 最初と最後の頁 2414-2424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13175	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

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」公開シンポジウム (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 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

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 船屋智史, 青木不学
2. 発表標題 マウス着床前初期発生における遺伝子発現プログラムへのヒストン変異体H3.1/3.2の関与
3. 学会等名 第113回 日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青木不学
2. 発表標題 全能期における遺伝子発現プログラムの調節機構の解明
3. 学会等名 キックオフシンポジウム「全能性プログラム：デコーディングからデザインへ」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Dai Tsukioka, Fugaku Aoki
2. 発表標題 H2A variants are involved in reprogramming of gene expression in preimplantation embryos and primordial germ cells.
3. 学会等名 52nd Annual conference of Society for the Study of Reproduction
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Funaya, Yuria Kawabata, Fugaku Aoki
2. 発表標題 Involvement of linker histone variants in oogenesis
3. 学会等名 52nd Annual conference of Society for the Study of Reproduction
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉江拳太、青木不学
2. 発表標題 着床前初期胚におけるDux familyの発現とその機能
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 船屋智史
2. 発表標題 マウス1細胞期胚のクロマチン構造へのリンカーヒストン変異体への関与
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019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とヒストン変異体の変化について
3. 学会等名 第41回分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 青木不学 他26名	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社インターズー	5. 総ページ数 351
3. 書名 繁殖生物学	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------