

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05978

研究課題名(和文) 受精卵におけるヒストンH2A.Z除去機構の解明とリプログラミング支援技術の開発

研究課題名(英文) Study on the mechanism of histone H2A.Z remodeling and development of a novel reprogramming technology

研究代表者

三谷 匡 (MITANI, Tasuku)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：10322265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：受精卵におけるゲノムワイドなヒストンH2A.Zの選択的除去の仕組みを明らかにすることを目的とする。活性化をトリガーとするヒストンH2A.ZとmacroH2Aの分解については分解応答性が異なることが明らかとなった。さらに、活性化に伴う母性転写物の新規翻訳やユビキチン・プロテアソーム系(UPS)による分解機構は関与しない可能性が示された。体細胞核移植においてH2A.Zの除去を誘導するHDAC阻害剤について相互作用因子の探索を行い、UPSを制御する分子の関与の可能性が示唆された。今後、ヒストンH2A.Zの除去の仕組みを明らかにし、さらにその仕組みを利用した新規リプログラミング支援技術の開発をめざす。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で提案する受精卵における“場の調整機構の理解と人為制御”は、“役者”となる初期化プレイヤーの活動を促す“舞台装置”をつくり出し、リプログラミングを促進する新技術の開発に繋がる。これまで、クローン技術やiPS細胞でのリプログラミングについては転写因子等プレイヤーに焦点があてられているが、“役者が演じる舞台環境”に対する理解は重要である。本研究が狙う舞台装置の制御はプレイヤーの能力を最大限に引き出すものであり、リプログラミング技術を飛躍的に向上させるものとして期待される。また、受精卵の全能性獲得基盤の理解は、現在注目される人工胚研究においても重要なカギを握るものとなる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the mechanism of genome-wide removal of histone H2A.Z in fertilized eggs. (1) It was revealed that the degradation kinetics of histone H2A.Z and macroH2A triggered by oocyte activation is different. Furthermore, it was indicated that de novo translation of maternal transcripts or a degradation mechanism by the ubiquitin-proteasome system (UPS) may not be involved in H2A.Z degradation. (2) We investigated for maternal factors interacted with HDAC inhibitors that induce H2A.Z removal in somatic cell nuclear transplantation. The results suggest the possible involvement of molecules that regulate UPS. In the future, we elucidate the mechanism of genome-wide histone H2A.Z removal and to develop a novel reprogramming technology.

研究分野：生殖生物学

キーワード：ヒストンH2A.Z 受精 クロマチンリモデリング 全能性獲得 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 リプログラミング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

受精卵の初期発生過程は、ゲノムワイドなエピジェネティック制御を受けており、染色体レベルでのダイナミックな構造変換が重要な役割を果たしている。ヒストンとエピジェネティクスの研究については、ヒストン H3 ではヒストン修飾による側面が強いのに対し、H2A ではバリエーションによるクロマチン領域の形成や DNA 修復等の側面が強く多彩である。これまで、体細胞核移植や iPS 細胞でのリプログラミングについては、転写因子等プレイヤーに焦点があてられているが、“役者が演じる舞台環境”に対する理解は重要である。とりわけヒストン H2A.Z は受精後急速に消失し、初期卵割期において一時的に欠如する(Nashun *et al.*, 2010)。その間、ゲノム全体が弛緩し、特にヒストン H2A.Z の集積によりヘテロクロマチン化しているセントロメア近傍領域が緩み、そこに配置される発生関連遺伝子群(Hamatani *et al.*, 2008)や non-coding RNA の発現が誘導される(Probst *et al.*, 2008, 2010, Romeo *et al.*, 2015)。この点に着目し、申請者は、体細胞核移植卵子では、体細胞核から持ちこまれるヒストン H2A.Z が全能性の再獲得に大きく干渉するとの仮説を立てた。そこで、体細胞核移植卵子の発生能を改善する HDAC 阻害剤(HDACi)に着目し、ヒストンアセチル化を介したヌクレオソームのリモデリングについて検討した結果、HDACi 処理によりドナー細胞核から持ち込まれるヒストン H2A.Z が選択的に除去されることを見出した。HDACi は HDAC 以外の低分子化合物を基質とし、その基質が疾患に関与する例もあり(Weight *et al.*, 2016)、HDACi によるヒストン H2A.Z の除去能は卵子でしかみられないことから、卵子には全能性の獲得に必要な特殊なクロマチンリモデリング機構が存在するとの着想に至り、本研究を立案した。本研究は、卵子に特徴的に備わるヒストン H2A.Z ならびに HDACi と相互作用する分子をあぶり出し、それらを足掛かりにヒストン H2A.Z の除去の仕組みを明らかにすることにより、受精卵の全能性獲得の構造的環境を理解する。さらに、その仕組みに基づくクロマチンリモデリングを介した新規リプログラミング支援技術への展開をめざすものである。

2. 研究の目的

本研究は、受精卵や体細胞クローン卵子のゲノムワイドなエピジェネティック制御を導く土台となる染色体全体で起こるダイナミックなクロマチン構造変換に着目し、そのカギとなるヒストン H2A.Z の除去機構を明らかにするとともに、その仕組みを利用して新規リプログラミング支援技術を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 受精卵におけるヒストン H2A.Z の除去過程で相互作用する因子の探索と機能解析

1. 活性化卵への mRNA の導入と GFP-H2A.Z の局在

受精後、ヒストン H2A.Z は一過的に消失するが、桑実期までに局在が回復してくる。そこで、H2A.Z の分解機構が受精後どれくらいの期間働いているのかを確認するため、活性化後 6 時間(6hpa)の 1 細胞期胚と 48 時間後(48hpa)の 4 細胞期胚に GFP-H2A.Z mRNA を電気穿孔法で導入し局在について観察した。卵の活性化処理は、mCZB-Ca²⁺-free+10mM SrCl₂, 5µg/mL CB 培地により行い、その後、KSOM+AA 培地にて体外培養した。次に、ヒストン H2A.Z と macroH2A はどちらも受精後急速に消失するが、これらが同じ挙動をとるかは明らかではない。そこで、GFP-H2A.Z mRNA と mCherry-macroH2A mRNA を 1 細胞期(6hpa)に導入し局在について経時的に観察した。対照として mCherry-H2B mRNA を用いた。

2. 活性化卵における UPS の阻害が GFP-H2A.Z の局在に及ぼす影響

H2A バリエーションの応答のトリガーとして卵の活性化が必要である。受精卵における急速なタンパク質分解機構としてユビキチン・プロテアソーム系(UPS)やオートファジー系などが考えられる。そこで、プロテアソーム阻害剤である MG132 (5 μ M)を用いて、GFP-H2A.Z の局在について検討した。実験区は未処理区、6~12hpa 処理区、12~24hpa 処理区、6~24hpa 処理区とした。

3. ヒストン H2A.Z の分解における活性化後の母性由来転写物の新規翻訳の関与

受精後、卵の活性化により母性由来転写物の新規翻訳が生じることから、これが H2A.Z の分解に関与しているのかについて検討した。活性化処理後 0~6 時間、シクロヘキシミド処理 (10 μ g/mL) を行った。活性化後 6 時間で GFP-H2A.Z mRNA を電気穿孔法で導入し、GFP-H2A.Z の局在について経時的に観察した。

(2) 受精卵における HDAC 阻害剤と相互作用する因子の探索と機能解析

1. Chemical pulldown および質量分析による HDACi の相互作用因子の探索

磁気ビーズにリガンドとして HDACi (SAHA)を固定し、線維芽細胞と MII 期卵、活性化卵 (6hpa)から抽出したタンパク質を用いて chemical pulldown を行った。線維芽細胞は 400 μ g、MII 期卵と活性化卵はそれぞれ 100 個分(3 μ g 相当)を抽出した。それらを作製した SAHA 誘導体固定化ビーズと反応させ chemical pulldown を行った。アフィニティ精製後、ウエスタンブロット解析により SAHA の既知のターゲットである HDACs の検出を試みた。Chemical pulldown の条件を設定後、同様にして調製したサンプルで質量解析を行い、SAHA との相互作用因子の探索を行った。

2. HDACi 処理が Dtx2 の作用に及ぼす影響

卵子で SAHA と相互作用する候補分子とした Dtx2 について、線維芽細胞、MII 期卵、活性化卵(6hpa)および精巣(陽性対照区)での発現を RT-PCR により検討した。次に、Dtx2 と SAHA との直接的な相互作用について検証するために、in vitro 転写により合成したリコンビナント Dtx2 を SAHA 固定化ビーズで反応後 (SAHA 誘導体による競合阻害区あり)、chemical pulldown、精製後、銀染色により評価した。さらに、Dtx2 の阻害による基質となるリボシル化タンパク質の蓄積について検証するため、NIH/3T3 細胞と MII 期卵(100 個)を用いて、未処理区、H₂O₂ 処理区 (細胞 : 1mM, 30min; 卵 : 20 μ M, 30min)、SAHA 処理区 (細胞 : 10 μ M, 6h, 12h, 24h; 卵 : 10 μ M, 活性化処理 6h+培養 4h) についてウエスタンブロット解析を行った。

3. ポリ ADP リボースポリメラーゼ(PARPs)の発現解析

卵子で SAHA と相互作用する新たな候補分子とした PARPs について、線維芽細胞、MII 期卵での発現を RT-PCR により検討した。NIH/3T3 細胞および MII 期卵の処理は上記 2 と同様に行った。

4. 研究成果

(1) 受精卵におけるヒストン H2A.Z の除去過程で相互作用する因子の探索と機能解析

GFP-H2A.Z mRNA を 1 細胞期(6hpa)で導入したところ、9~24hpa において核全体において局在が維持された。これは、先行研究 (Nashun *et al.*, 2010) と一致しており、外来性のヒストン H2A.Z に対しても卵が備えている除去機構が作用していることが示された。一方、mCherry-H2B mRNA が導入された活性化卵では、胚盤胞 (96hpa) まで核全体に強い傾向が認められた。次に、GFP-H2A.Z および GFP-H2A.X の C 末端 23 個のアミノ酸を付加した GFP-H2A.Z_XC23 mRNA を導入し局在について解析した。その結果、GFP-H2A.Z は 24hpa から急速に消失する

一方、GFP-H2A.Z_XC23 は 48hpa まで核内に維持され、H2A.X の C 末端領域がヒストン H2A バリエーションの除去の制御に関わっていることが示唆された。また、GFP-H2A.Z_XC23 の発現により発生遅延や発生停止が観察された。この除去能力の発動時間を検証するために 4 細胞期 (48hpa) に GFP-H2A.Z mRNA を導入したところ、核で弱い局在が認められ、その後 72~96hpa まで徐々に蛍光が減弱しながらも維持された。活性化卵において、GFP-H2A.Z mRNA を 1 細胞期で導入したもの、4 細胞期で導入したもののいずれも約 4 割が胚盤胞に発生しており、導入時期による発生能への影響に差はないことが示された。4 細胞期に導入したものは 1 細胞期に導入したものとは核局在が長く維持されることから、1 細胞期導入卵における GFP-H2A.Z の分解・消失は、受精直後に起こる特異的な現象であることが明らかとなった。

マウス受精卵では、ヒストン H2A.Z と macroH2A はどちらも受精後急速に消失する。そこで、H2A.Z と macroH2A の分解応答性について検討するため、活性化卵における GFP-H2A.Z および mCherry-macroH2A の局在について観察した。その結果、活性化卵(6hpa)において GFP-H2A.Z mRNA を導入し発現させたところ、9~24hpa において核全体に局在を示し、36hpa の mid-2-cell からシグナルは消失した。同様に、mCherry-macroH2A mRNA を導入し発現させたところ、9~48hpa の 4-cell まで核全体に強いシグナルが検出され、その後シグナルは減弱し消失した。これらの結果から、ヒストン H2A.Z と macroH2A の分解応答性について、macroH2A の分解の速さは H2A.Z より遅い可能性が示された。

受精をトリガーとして起きるヒストン H2A.Z の除去機構について、活性化に伴う新規の翻訳に着目し、シクロヘキシミド添加培地を使用することで母性由来の新規翻訳産物がヒストン H2A.Z の分解に関与するかを検討した。その結果、シクロヘキシミド添加培地では、活性化後 9~24h まで GFP-H2A.Z の局在が核に認められたが、36hpa では蛍光が減弱し消失した。これらの結果より、活性化後の母性由来の新規翻訳産物はヒストン H2A.Z の除去に関与していないことが示唆された。しかしながら、本研究で用いた実験系では、可視化するために蛍光標識した H2A.Z や macroH2A は活性化後 6h で導入発現させており、活性化直後にはたらいっている内在性の H2A バリエーションの分解工程を正確にとらえているとはいえない。今後は、母性由来の新規転写産物が H2A.Z の除去機構に関与しているのかを解析するため、MII 期卵の段階で GFP-H2A.Z mRNA を導入・発現させる方法で検討する。

ヒストン H2A.Z の除去機構におけるユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) の関与について調べる目的で、プロテアソーム阻害剤 MG132 を用いて GFP-H2A.Z の局在を検討した。MG132 未処理区では 12~24hpa までヒストン H2A.Z の核局在が維持され、その後 36hpa で除去された。6~12hpa 処理区、12~24hpa 処理区では、ヒストン H2A.Z の核局在は 36~48hpa ごろまで維持され 72hpa 以降は消失した。6~24hpa 処理区では、ヒストン H2A.Z は 36hpa ごろまで核局在が維持されたが、48hpa にはほとんど除去された。GFP-H2A.Z は核での局在が維持される一方、細胞質での滞留がみられなかったことから、UPS はヒストン H2A.Z の消失に関与していない可能性が考えられた。初期発生におけるタンパク質分解システムには、オートファジーシステムやユビキチンプロテアソームがあることから (Satouh Y *et al.*, 2023)、今後オートファジーシステムについて検討する。

(2) 受精卵における HDAC 阻害剤と相互作用する因子の探索と機能解析

小分子化合物の相互作用因子を精製する手法のひとつである chemical pull down を用いて哺乳動物卵子のような微量サンプルから既知の相互作用因子を検出できるかを検討した。卵子 100 個分のタンパク質から SAHA 固定化ビーズを用いて精製したタンパク質中に、SAHA のターゲット

ットである HDACs が検出される条件を設定した。そこで、SAHA 固定化ビーズを用いて chemical pulldown と質量解析を行った。その結果、線維芽細胞から 864 因子、MII 期卵から 139 因子、活性化 6 時間後(6hpa)の卵から 101 因子が検出された。先行研究を参考に、MII 期から 2 細胞期にかけて HDACi が作用する共通の因子が存在していると仮定し、MII 期卵と 6hpa 卵で共通して検出され、線維芽細胞では検出されない因子として 16 因子を絞り込んだ。そのうち Isoform 2 of Probable E3 ubiquitin-protein ligase, DTX2 が MII 期卵でも 6hpa 卵でも高頻度に検出されていた。DTX2 は Deltex ファミリーのユビキチンリガーゼの 1 つであり、WWE domain、RING E3 finger domain、DTC により構成されている。RING finger domain は Zn finger の一種であり、SAHA の metal binding region の作用部位となり得ることから、体細胞核移植卵子の発生能改善に繋がる HDACi のターゲットとして Dtx2 を候補分子の一つとした。

Dtx2 の発現動態について RT-PCR を行った結果、Dtx2 は線維芽細胞では発現しておらず、卵子において発現していた。そこで、Dtx2 が SAHA と直接相互作用しているか検討するために、in vitro 転写により作製した Dtx2 タンパク質を SAHA 固定化ビーズで反応後アフィニティ精製を行った結果、Dtx2 が検出された。さらに SAHA 誘導体の共存による競合阻害により Dtx2 の検出がみられなくなったことから、SAHA は Dtx2 と直接相互作用していることが示された。Dtx2 の RING finger domain に結合した E2 リガーゼは、WWE ドメインに結合したリボシル化タンパク質を基質としてユビキチン化し、プロテアソームによる分解を導く。そこで、RING finger domain に結合した HDACi が E2 リガーゼの結合を阻害することで、リボシル化タンパク質がユビキチン化を免れ蓄積するのではないかと仮定し、NIH/3T3 細胞と活性化卵(10hpa)を用いてウエスタンブロット解析により検討した。NIH/3T3 細胞では、H₂O₂ 処理によりリボシル化タンパク質の蓄積が認められた。それに対して、活性化卵においては、HDACi 未処理区でリボシル化タンパク質がわずかに認められたが、HDACi 処理した活性化卵では検出されなかった。このことから、活性化卵において HDACi はタンパク質のリボシル化にも影響を与えている可能性が示された。

質量解析の結果から、リボシル化酵素について PARP ファミリーの 1 つである TCDD-inducible poly [ADP-ribose] polymerase (PARP7)が活性化卵で高頻度に認められた。さらに、Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP1)と Poly [ADP-ribose] polymerase 12 (PARP12)も検出されていた。これらの PARPs には Zn finger domain が存在し(Challa *et al.*, 2021, Suskiewicz *et al.*, 2023)、SAHA がこれらの PARPs に直接作用して阻害する可能性が考えられた。ことから、HDACi は卵子の PARPs の機能阻害によりタンパク質のリボシル化が抑制された可能性がある。そこで、PARPs の発現について RT-PCR で半定量的に検討したところ、NIH/3T3 細胞、活性化卵ともに PARP ファミリーの発現が認められた。NIH/3T3 細胞では、特に PARP9 の発現が高い傾向が認められたが、活性化卵では Zinc finger domain をもつ PARP1, 7, 12 の発現がいずれも高く、PARP2, 9, 14 の発現はほとんど見られなかった。

以上の結果から、仮説として、HDACi は Dtx2 によるユビキチン化と PARPs によるリボシル化を並行して阻害することで、UPS の基質となるタンパク質 (母性因子) の卵子内での保存時間を延伸し、リプログラミング効率の改善に繋がっている可能性が考えられた。

本研究の成果を足掛かりに、受精卵が有する全能性獲得機能の理解が進み、再生医療や不妊領域における有用なツールの開発への繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山中康平, 岡崎祐樹, 妻木孝憲, 杉浦麻妃瑠, 大下莉奈, 大矢部和胡, 山本真穂子, 種子田妃良, 和田菜那美, 曾炫凱, 黒坂哲, 中家雅隆, 三谷匡.
2. 発表標題 マウス受精卵におけるCyclin T1, T2の過剰発現が転写活性に及ぼす影響.
3. 学会等名 第40回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉浦麻妃瑠, 岡崎祐樹, 山中康平, 妻木孝憲, 大下莉奈, 大矢部和胡, 山本真穂子, 種子田妃良, 和田菜那美, 曾炫凱, 黒坂哲, 中家雅隆, 三谷匡.
2. 発表標題 マウス受精卵におけるCyclin T2a, T2bの発現解析.
3. 学会等名 第40回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本真穂子, 和田菜那美, 杉浦麻妃瑠, 大下莉奈, 種子田妃良, 黒坂哲, 中家雅隆, 三谷匡.
2. 発表標題 マウス活性化卵子におけるヒストンH2A. Zの除去に対する新規転写の関与.
3. 学会等名 第41回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 和田菜那美, 妻木孝憲, 杉浦麻妃瑠, 山本真穂子, 大下莉奈, 種子田妃良, 黒坂哲, 中家雅隆, 三谷匡.
2. 発表標題 マウス卵子におけるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の標的分子の探索.
3. 学会等名 第41回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉浦麻妃瑠, 岡崎祐樹, 和田菜那美, 山本真穂子, 大下莉奈, 種子田妃良, 黒坂哲, 中家雅隆, 三谷匡.
2. 発表標題 マウス受精卵におけるpositive transcription elongation factor b (P-TEFb)の相互作用因子の探索.
3. 学会等名 第41回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松島秀斗, 大野優芽, 山本真穂子, 中野志保, 山下幸軌, 黒坂哲, 中家雅隆, 三谷匡.
2. 発表標題 マウス活性化卵子におけるヒストンH2A.Zの除去に対する新規転写の関与.
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中野志保, 和田菜那美, 山下幸軌, 松島秀斗, 黒坂哲, 中家雅隆, 三谷匡.
2. 発表標題 マウス卵子におけるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の標的分子の探索.
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山下幸軌, 杉浦麻妃瑠, 中野志保, 松島秀斗, 黒坂哲, 中家雅隆, 三谷匡.
2. 発表標題 マウス受精卵におけるpositive transcription elongation factor b (P-TEFb)の相互作用因子の探索.
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松島秀斗, 中野志保, 山下幸軌, 大野優芽, 山本真穂子, 黒坂哲, 中家雅隆, 三谷匡.
2. 発表標題 マウス活性化卵でのヒストンH2A.Zの分解における母性mRNAの翻訳およびユビキチン・プロテアソーム系の関与について.
3. 学会等名 第42回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中野志保, 松島秀斗, 山下幸軌, 和田菜那美, 黒坂哲, 中家雅隆, 三谷匡.
2. 発表標題 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤がマウス卵におけるADP-リボシル化反応に及ぼす影響.
3. 学会等名 第42回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 山下幸軌, 中野志保, 松島秀斗, 杉浦麻妃瑠, 黒坂哲, 中家雅隆, 三谷匡.
2. 発表標題 マウス受精卵におけるPositive transcription elongation factor b複合体のアイソフォーム.
3. 学会等名 第42回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2024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	田辺 秀之 (TANABE Hideyuki) (50261178)	総合研究大学院大学・先導科学研究科・准教授 (12702)	

6. 研究組織（つづき）

	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	岡村 大治 (OKAMURA Daiji) (80393263)	近畿大学・農学部・講師 (34419)	

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