

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15022

研究課題名（和文）マウス受精後の遺伝子発現およびクロマチン構造変化へのリンカーヒストン変異体の関与

研究課題名（英文）The involvement of linker histone variants in the changes of gene expression and chromatin structure in mouse embryo.

研究代表者

船屋 智史（Funaya, Satoshi）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究者番号：80939687

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：マウス初期発生におけるリンカーヒストンの機能を調べるため、CRISPR/Cas9 システムを用いてH1a遺伝子を欠損したマウスを作成した。その結果、H1a欠損マウスは正常に生まれてきたが、このH1a欠損雌マウスでは産子数が減少していた。さらに母性H1aを欠損した胚では着床前初期発生率が低下していた。しかしこの胚では内部細胞塊や栄養外胚葉への分化には異常が見られなかった。本研究よりリンカーヒストン変異体H1aは着床前初期発生において重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在iPS細胞などのリプログラミングについて非常に多くの研究が行われている。その一方で、受精後に起こる遺伝子発現リプログラミングおよびクロマチン構造変化については、その制御機構がほとんど解明されていない。本研究によりマウス受精後の初期発生にリンカーヒストン変異体H1aが重要であることが明らかにされた。今後本研究を進展させ、受精後の遺伝子発現およびクロマチン構造変化におけるリンカーヒストン変異体の機能を詳細に解析していくことにより、これら受精後におけるリプログラミングの実態の解明、さらにはiPS細胞の作成効率などの改善に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：To investigate the function of linker histone variants in mouse preimplantation development, H1a knockout (KO) mice were generated using the CRISPR/Cas9 system. The results showed that H1a KO mice were born without abnormalities, but the litter size was decreased in H1a KO female mice. H1a maternal KO had a detrimental effect on the preimplantation development, but not differentiation of the inner cell mass or trophectoderm. This study suggests that linker histone variant H1a is required for preimplantation development.

研究分野：繁殖生物学

キーワード：リプログラミング リンカーヒストン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物の初期発生はある一定のプログラムにしたがって進行していくと考えられている。マウスでは受精後のしばらくは転写が停止した状態にあるが、1細胞のS期中頃より受精後初めての胚由来の遺伝子発現が起こる。このイベントはZygotic genome activation(ZGA)と呼ばれており、1から2細胞前期における活性化はminor ZGA、2細胞後期における活性化はmajor ZGAと呼ばれており、このminorからmajor ZGAにかけては遺伝子発現パターンが大きく切り替わることが報告されている。この受精後のminorからmajor ZGAの遺伝子発現の切り替わりは、遺伝子発現プログラムの最初のステップであり、その後の初期発生に非常に重要であると考えられるが、その制御機構についてはほとんどわかっていない。クロマチン構造は遺伝子発現調節に重要な役割を果たすことが、体細胞などを用いた実験より報告されている。マウス受精後において、クロマチン構造は遺伝子発現同様大きく変化しており、minor ZGAが起こる1から2細胞前期では体細胞と比較して非常に緩いクロマチン構造を有しており、2細胞後期になると急激にクロマチン構造が締まることが報告されている。このminorからmajor ZGAの時期におけるクロマチン構造変化に関わる因子として、申請者のこれまでの研究よりリンカーヒストン変異体H1fooを明らかにしている。siRNAを用いたH1fooのノックダウン実験よりH1fooは1細胞期の緩いクロマチン構造形成に関与していること、1から2細胞期にかけてその核局在量が急激に減少することにより、クロマチン構造が締まることが明らかにした。しかしながらH1fooを欠損した胚では2細胞期への卵割にわずかな遅延が見られるものの、胚盤胞期胚までの発生率には影響が見られなかった。リンカーヒストン変異体のノックアウトマウスはそのほとんどが致死にならないことから、リンカーヒストン同士は機能の相補性が非常に高いことが報告されている。H1foo以外のリンカーヒストンの中で、リンカーヒストン変異体H1aはH1fooを除く他のリンカーヒストン変異体よりもクロマチンの凝集能力が弱いことが報告されている。このことから、H1aはクロマチン構造を緩める機能をもち、H1fooを欠損した初期胚においてH1fooの機能を相補していることが考えられる。また過去にH1aのノックアウトマウスについての報告があり、H1aホモ欠損マウスは生存率などに異常が見られなかったという報告がされているが、H1aの欠損が雌マウスの生殖能力や着床前初期発生に与える影響についてはほとんど解析がなされていない。

2. 研究の目的

このような背景より申請者はH1aのノックアウトマウスを作製し、着床前初期発生におけるH1aの役割を調べる。さらにH1fooのノックダウンと合わせて、これらリンカーヒストン変異体の両欠損が着床前初期発生に与える影響について調べる。

3. 研究の方法

CRISPR/Cas9システムを用いて、H1aの遺伝子領域大部分を欠損するようなgRNAを設計してH1aノックアウトマウスを作成した。

4. 研究成果

まずH1aの欠損がマウスの発生に与える影響を調べるために、H1aヘテロ欠損マウスの雌雄を交配し、H1aホモ欠損マウスが正常に生まれてくるかどうか調べた。その結果ヘテロ欠損個体同士の交配から生まれた子供の遺伝型比はメンデルの法則に従っていた。また出生21日後の体重は、野生型マウス、ヘテロ欠損マウス、ホモ欠損マウスの間で差は見られなかった。これらの結果は、H1aホモ欠損マウスは正常に生まれてくることを示した先行研究と一致していた。次にH1aの欠損が雌雄の生殖能力に及ぼす影響を調べた。H1aホモ欠損雄と野生型雌の交配における産子数は野生型の雄雌の交配における産子数と同程度であった。しかし、H1aホモ欠損雌を野生型の雄と交配させると、産子数は減少していた。このことからH1aは雌の生殖能力に重要であることが明らかとなった。H1aホモ欠損雌から採取できる卵の数は野生型の雌と同程度であったことから、次に着床前初期発生におけるH1aの機能を調べた。H1aホモ欠損雌マウスから得た卵子を野生型雄の精子と体外受精させ、その後の胚(母性H1a欠損胚)の初期発生を観察した。その結果、母性H1a欠損胚では着床前初期発生、特に桑実胚期から胚盤胞期にかけての発生率が、野生型の胚と比較して減少していた。母性H1aは着床前初期発生に重要であり、桑実胚期以降の発生が損なわれていたことから、母性H1aを欠損した胚では内部細胞塊と栄養外胚葉への分化に異常が生じていることが考えられた。そこで内部細胞塊のマーカーであるNANOGと栄養外胚葉のマーカーであるCDX2について、免疫染色を行った。その結果母性H1aを欠損した胚では、野生型胚と比較して内部細胞塊と栄養外胚葉の細胞数に差が見られなかった。このことから母性H1aは着床前初期発生には重要であるが、内部細胞塊と栄養外胚葉への分化には重要でないことが示された。

H1aは着床前初期発生に重要であることが明らかとなったので、次に着床前初期発生におけるH1aとH1fooの両欠損を行うことにした。H1aホモ欠損雌マウスより採取した卵に、H1fooに対するsiRNAを顕微注入し、1細胞期におけるこれら両変異体の欠損を行なった。このH1aおよび

H1foo の両欠損胚の初期発生を調べたところ、胚盤胞期胚までの発生率が野生型と比較して減少していたものの、H1a 単独欠損した胚と比較して発生率に違いは見られなかった。そこで H1a の欠損が 1 細胞期における H1foo の局在量に影響を及ぼすかどうかを調べるために、母性 H1a を欠損した 1 細胞期胚で H1foo の免疫染色を行った。その結果、H1foo の核局在量は母性 H1a 欠損胚と野生型の 1 細胞期胚で変化が見られず、母性 H1a の欠損は 1 細胞期における H1foo の局在に影響を与えないことが示唆された。

以上の結果より、H1a は雌マウスの生殖能力および着床前初期発生に重要であることが示された。また H1a および H1foo の両欠損胚では他のリンカーヒストン変異体が機能を相補していることが考えられる。本研究より、マウス着床前初期発生におけるリンカーヒストン変異体の重要性が初めて示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2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, Takahashi Yusuke, Suzuki Masataka G, Suzuki Yutaka, Aoki Fugaku	4. 巻 -
2. 論文標題 H3.1/3.2 regulate the initial progression of the gene expression program	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	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） 10.1093/nar/gkae214	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 Satoshi Funaya, Yuria Kawabata, Kenta Sugie, Ken-Ichiro Abe, Yutaka Suzuki, Masataka G Suzuki, Fugaku Aoki	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 船屋智史, 青木不学
2. 発表標題 Involvement of histone variants H3.1/3.2 in the reprogramming of gene expression during mouse preimplantation development
3. 学会等名 有性生殖における染色体・クロマチン・核動態に関する若手研究者の会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 船屋智史, 青木不学
2. 発表標題 マウス初期胚における遺伝子発現プログラムの進行におけるヒストン変異体 H3.1/3.2 の 関与
3. 学会等名 第3回有性生殖研究会
4. 発表年 2023年

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

1. 発表者名 船屋智史
2. 発表標題 H3.1/3.2 は Minor から Major ZGA への切り替わりに重要である
3. 学会等名 全能性プログラム:第5回公開シンポジウム
4. 発表年 2023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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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