

論文の内容の要旨

論文題目 Involvement of histone variants in the change of chromatin structure during early preimplantation development

(着床前初期発生におけるクロマチンリモデリングへのヒストンバリエントの関与)

氏名 船屋 智史

[序論]

受精直後の胚は遺伝子発現を完全に停止しているが、一定時間が経つと胚由来の初めての発現が起こる。その後は定められたプログラムにより遺伝子発現パターンが変化し、初期発生が進行していく。マウスでは1細胞中期に初めての胚性の遺伝子発現が起こり、その後2細胞後期にかけて、遺伝子発現パターンが劇的に変化することが知られている。遺伝子発現はクロマチン構造により

制御されるが、1細胞期には非常に緩んだ状態にあり、2細胞期に急激に締まった構造に変化することが知られている。また、遺伝子発現の制御に関しては、レポーター遺伝子を用いた実験により、1細胞期ではエンハンサー非依存の転写が起こり、2細胞期にはこれがエンハンサー依存性のもに変わることが示されており、この変化にクロマチン構造変化が関与していることが示唆されている (Fig. 1)。さらにこの時期、クロマチン構造に関わるいくつかのエピジェネティック因子も大きく変化しており、これらを含めた変化はクロマチンリモデリングと呼ばれている。しかし、この変化を調節するメカニズム、そしてそれが実際の遺伝子発現パターンの変化にどのように関わっているのかについてはほとんど明らかになっていない。

クロマチン構造は、コアヒストン8量体からなるヌクレオソームと、ヌクレオソーム間のDNAに結合するリンカーヒストンで構成されている。コアヒストン、リンカーヒストンにはそれぞれ異なる遺伝子からコードされるヒストンバリエントが存在し、クロマチンの高次構造に深く関与することが知られている。しかしながら、これらバリエントの1、2細胞期胚のクロマチン構造変化への関与はほとんど明らかになっていない。そこで本研究では着床前初期発生、特に1、2細胞期の遺伝子発現プログラムを制御するメカニズムの解明を最終目標とし、クロマチンリモデリングへのヒストンバリエント、特にクロマチン構造に深く関与することが知られているリンカーヒストンH1とコアヒストンH3バリエントに着目し、それらの関与について解析を行った。

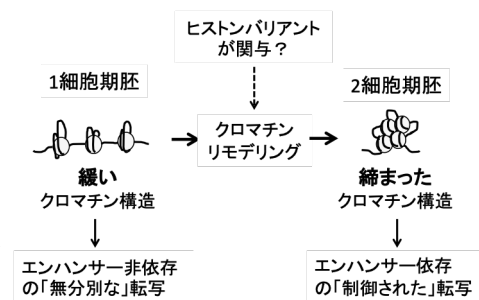


Fig. 1 1、2細胞期胚における
クロマチンリモデリング

[結果・考察]

1 細胞期胚の緩いクロマチン構造への H1foo の関与

RNA シーケンスデータにより、着床前初期発生における全リンカーヒストンバリエーションの発現挙動を解析したところ、リンカーヒストンバリエーション H1foo は 1 細胞期で高く発現しており、1 から 2 細胞期にかけて急激な発現減少が見られた。そこで H1foo が 1 細胞期胚の緩いクロマチン構造に関与しているのではないかと考え、siRNA により H1foo をノックダウン(KD)して Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)法を用いてクロマチン構造解析を行った。その結果、H1foo を KD した 1 細胞期胚の雄性前核においては、Mobile fraction の値が減少し、緩いクロマチン構造が失われていることが示唆された (Fig.2)。

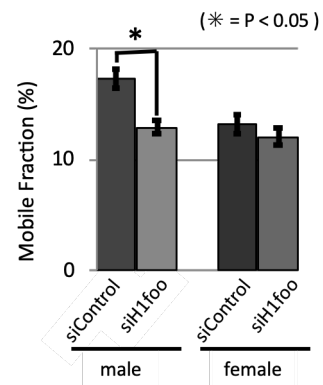


Fig. 2 H1foo KD による 1 細胞期胚の緩いクロマチン構造への影響

また 2 細胞期に急激にクロマチン構造が締まることに H1foo の核局在量の減少が関与しているのではないかと考え、H1foo を過剰発現させた 2 細胞期胚において FRAP 法による解析を行なった。その結果、H1foo を過剰発現した胚ではコントロールの胚と比較して 1 から 2 細胞期にかけて緩んだクロマチン構造が維持されていた。これらの結果より、H1foo は 1 細胞期胚の雄性前核における緩いクロマチン構造に関与していること、また 1、2 細胞期胚における H1foo の核局在量の急激な減少により、クロマチン構造が締まることが示唆された。

H1foo の KD が着床前初期発生に与える影響

H1foo を KD した 1 細胞期胚において緩いクロマチン構造が失われていたため、次にその着床前初期発生に与える影響を解析したところ、H1foo を KD した 1 細胞期胚は 2 細胞期胚への卵割のタイミングが遅延していた (Fig.3)。

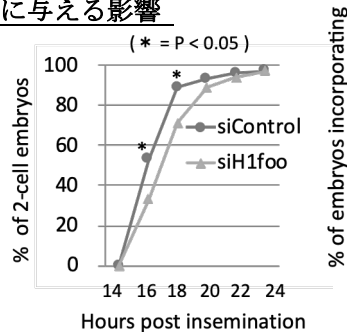


Fig. 3 H1foo KD による卵割のタイミングへの影響

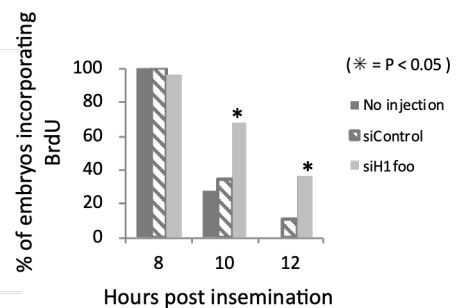


Fig. 4 H1foo KD による 1 細胞期胚雄性前核における DNA 複製のタイミングへの影響

この遅延が 1 細胞期胚のどの細胞周期で起こっているのかについて調べるため、S 期に着目し、H1foo を KD した 1 細胞期胚において BrdU を用いて DNA 複製のタイミングについて解析を行なった。その結果、H1foo を KD した 1 細胞期胚の雌雄前核の核小体周辺における DNA 複製の完了が遅延していた (Fig.4)。

H1foo の KD が H3.1/3.2 の局在に与える影響

当研究室の先行研究より、1 細胞期胚の雄性前核の核小体周辺においては締まったクロマチン構造に関与するコアヒストン H3 バリエーション H3.1/3.2 がほとんど存在しておらず、1 細胞期胚において H3.1/3.2 を過剰発現させると、核小体周辺に H3.1/3.2 が集積し、DNA 複製の完了が遅延することが明らかになっている。H1foo KD 1 細胞期胚で同様のパターンの遅延が見られたこと

から、H1foo KD 胚における H3.1/3.2 の局在パターンを解析した。その結果、H1foo を KD した 1 細胞期胚雄性前核の核小体周辺において H3.1/3.2 の局在が顕著な胚の割合が増加していた (Fig.5)。これらの結果より H1foo は締まったクロマチンに關与する H3.1/3.2 の核局在を抑制することにより、DNA 複製を速やかに進行させる働きがあることが示唆された。

2 細胞期胚の締まったクロマチン構造への H3.1/3.2 の関与

クロマチン構造に深く關与する因子としてコアヒストン H3 バリエント H3.1/3.2 が知られている。H3.1/3.2 は締まったクロマチン構造に關与するヒストン修飾を受けやすいことが明らかとなっている。また当研究室の先行研究より、H3.1/3.2 は 1 細胞期胚において核局在量が少なく、1 から 2 細胞期にかけて核局在量が急激に増加することが報告されている。そこで H3.1/3.2 が 1 から 2 細胞期胚にかけて核局在量が増加することにより、クロマチン構造が締まるのではないかという仮説を立て、siRNA を用いて 2 細胞期胚での H3.1/3.2 の KD を行ない、FRAP 法を用いてクロマチン構造解析を行なった。その結果、H3.1/3.2 を KD した 2 細胞期胚は、1 から 2 細胞期にかけて緩いクロマチン構造が維持されていた (Fig.6)。この結果より 1 から 2 細胞期にかけて、H3.1/3.2 の核局在量が増加することにより締まったクロマチン構造が形成されることが明らかになった。

H3.1/3.2 の KD が 1、2 細胞期の遺伝子発現変化に与える影響

1 から 2 細胞期の急激なクロマチン構造変化は、この時期の遺伝子発現変化に大きく關与すると考えられている。すなわち千数百の遺伝子において、1 から 2 細胞前期にかけて発現量が増加し、2 細胞後期では発現量が減少するという一過的な発現が見られる。そこで、このような発現パターンを示す Eif1a、Zfp352、Zscan4d の発現を RT-PCR を用いて解析した。その結果 H3.1/3.2 を KD した胚では、これらの遺伝子は 1 から 2 細胞後期にかけて、その発現量の減少がコントロールと比較して小さくなっていった (Fig.7)。また興味深いことに遺伝子だけではなくレトロトランスポゾンの 1 つである LINE も 1 から 2 細胞前期における一過的な発現が見られるが、H3.1/3.2 を KD した 2 細胞後期では、他の遺伝子同様に発現量の減少割合が低下していた (Fig.7)。これらの結果より、1 から 2 細胞期胚にかけてクロマチンに取り込まれる H3.1/3.2 は、2 細胞後期におけるいくつかの遺伝子やレトロトランスポゾンの発現抑制に關与することが示唆された。

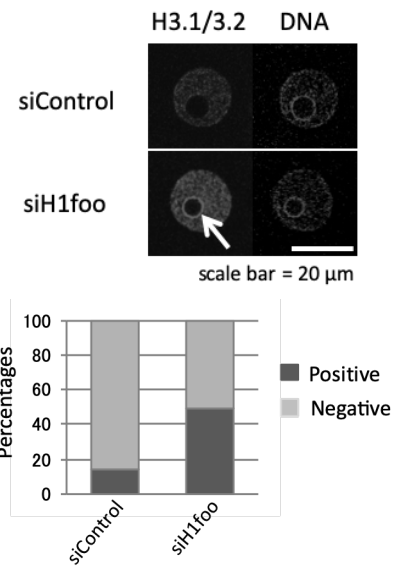


Fig. 5 H1foo KD による 1 細胞期胚雄性前核における H3.1/3.2 の局在パターンへの影響 矢印は核小体を示す。

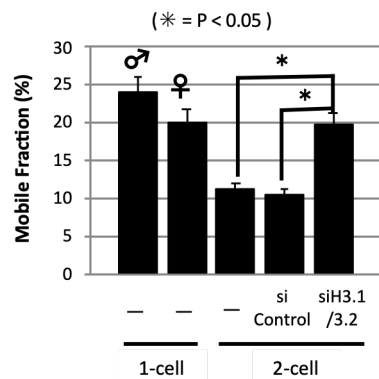


Fig. 6 H3.1/3.2 KD による 1、2 細胞期胚のクロマチン構造変化への影響 —は siRNA を顕微注入していない群を示す。♂は雄性、♀は雌性前核を示す。

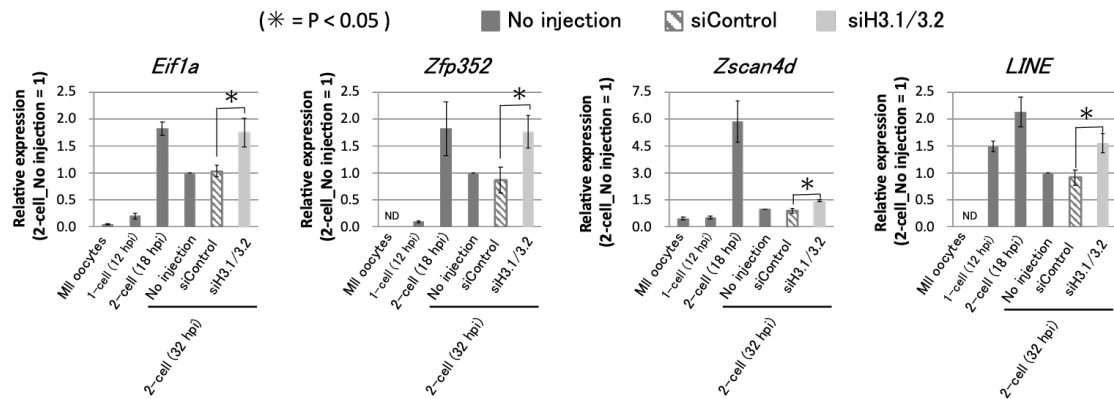


Fig. 7 H3.1/3.2 KDによる1、2細胞期の遺伝子発現変化への影響
(hpi = hours post insemination, ND = Not Detected)

H3.1/3.2のKDが着床前初期発生に与える影響

最後にH3.1/3.2のKDが着床前初期発生に与える影響を解析したところ、H3.1/3.2をKDした胚はコントロール胚と比較して2細胞期以降の胚発生率が減少していた(Fig.8)。このことから2細胞期におけるH3.1/3.2のクロマチンへの取り込みは、着床前初期発生に重要であることが示された。

[結論]

1細胞期胚では緩いクロマチン構造に関与すると考えられているH1fooやH3.3が多く核局在しており、一方で締まったクロマチン構造に関与するH3.1/3.2の核局在量が少ないことが明らかになった。そして、これらにより1細胞期胚の緩いクロマチン構造が形成されていることが示唆された。また1細胞期胚においてH3.1/3.2の核局在量が少ない理由の一つとして、H1fooがH3.1/3.2の核局在を抑制していることが考えられる。1から2細胞期胚にかけてH1fooの核局在量が急激に減少し、一方で体細胞で広く発現している体細胞型リンカーヒストンバリエーションやH3.1/3.2の核局在量が増加することにより締まったクロマチン構造が形成されること、またそれにより一部の遺伝子の発現を抑制することが示唆された(Fig.9)。本研究により、1、2細胞期胚におけるクロマチンリモデリングの制御機構の一端を明らかにし、このクロマチンリモデリングにより1、2細胞期胚の遺伝子発現プログラムの一部が制御されていることが明らかになった。

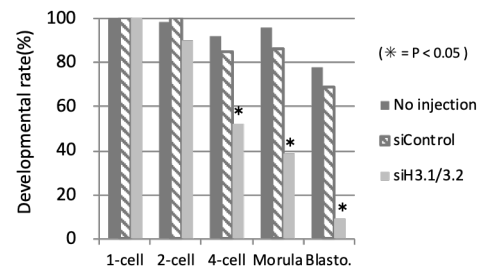


Fig. 8 H3.1/3.2 KDによる着床前初期発生への影響