
博士論文

マウス発生における H2A 変異体の役割

月岡 大

目次

要旨	1
総合緒言	3
図表	8
第1章:マウス発生における TH2A の役割	
緒言	11
結果	13
考察	20
図表	24
第2章:マウス発生における H2A.X の役割	
緒言	36
結果	38
考察	43
図表	47
第3章:母性 TH2A/母性 H2A.X 両欠損による着床前発生への影響	
緒言	57
結果	59
考察	64
図表	70
総合考察	81
図表	85
材料と方法	88
参考文献	100
謝辞	111

要旨

哺乳類ではその生活環の中で様々な発生イベントが起きることが知られている。受精後の着床前発生期では全能性を獲得した後、最初の分化が起き、着床後発生期では様々な器官の形成や生殖細胞の分化などが起きる。生後では性成熟などが起き、生殖が可能となり次世代に自身の遺伝情報を受け継がせることができるようになる。このような発生イベントはその時期や場所における適切な遺伝子発現により支持されている。遺伝子発現制御機構の一つとしてクロマチン構造の変化がある。さらにクロマチンの構成因子であるコアヒストンにはアミノ酸配列が異なるヒストン変異体が複数存在し、いくつかのヒストン変異体は他のヒストン変異体と置換することによってクロマチン構造に変化をもたらすことが知られている。コアヒストンの1つであるH2A変異体の中では、TH2AとH2A.Xのマウス発生における役割やクロマチン構造に対する機能はこれまで十分には明らかにされていない。そこで本研究では、TH2A欠損マウスとH2A.X欠損マウスを用いて、マウス発生への寄与について明らかにすることとした。

その結果、まずTH2A欠損により雌マウスの生殖能力が低下することが分かった。しかし、TH2A欠損による卵形成や子宮機能の異常は見られなかった。そして卵由来の母性TH2Aを欠損した1細胞期胚においてエピジェネティック修飾であるDNAのメチル化レベルやH3K27me3レベルの減少が見られたが、着床前発生の異常は見られなかった。影響が見られたこれらエピジェネティック修飾はインプリンティングを含む遺伝子発現制御に関与し、また着床以前でこれらエピジェネティック修飾に影響があると着床後の発生不良が起こることが報告されていることから、TH2A欠損による雌の生殖能力の低下は着床以前のDNAのメチル化とH3K27me3の異常による着床後の発生不良が原因であると考えられた。一方で、H2A.Xの欠損は着床後発生期で致死を起

こし、また体重の減少や眼球の形成異常も起きることが明らかになった。H2A.X 欠損によるこれら表現型の有無は、遺伝背景に依存して変化することが明らかになり、遺伝背景によってマウス発生への H2A.X の寄与の強度は異なることが示された。また、母性 H2A.X 欠損胚は、胚盤胞期胚まで発生したことから、母性 H2A.X は着床前発生に関与していないことが示唆された。着床前初期胚である 1 細胞期胚では TH2A と H2A.X は核に多く局在しており、着床前発生期において互いに機能を補償し合っている可能性が考えられた。母性 TH2A と母性 H2A.X の両方を欠損した結果、発生不良が起きることが明らかとなった。

発生不良が起きた原因を明らかにするため、1 細胞期胚における他のヒストン変異体の核局在量、クロマチン構造の緩みと遺伝子発現への影響を解析した。母性 TH2A 欠損や母性 H2A.X 欠損胚では見られなかったが、両欠損胚において H3 変異体 H3.1/H3.2 と H3.3 の核局在量が減少しており、総ヌクレオソーム数が減少していることが示唆された。クロマチン構造の緩みの解析では母性 H2A.X のみがクロマチン構造を緩める機能を持つことが明らかとなった。さらに、遺伝子発現解析では母性 TH2A が遺伝子間領域からの転写の促進に関与していることが示された。しかし、クロマチン構造の緩みと遺伝子発現の解析では両欠損胚特異的な影響は見当たらなかった。これらの結果から TH2A は少なくとも遺伝子間からの転写の促進に、一方で H2A.X は緩いクロマチン構造の形成に関与しそれぞれ異なる作用を持つことが示されたことから 1 細胞期胚において TH2A と H2A.X は必ずしも互いに機能を補償し合っているわけではないことが示唆された。また、母性 TH2A/H2A.X 欠損による発生不良は、総ヌクレオソーム数の減少や母性 TH2A または母性 H2A.X の欠損によるそれぞれの影響が両欠損胚において重なった結果によって生じたものと考えられた。本研究において、TH2A と H2A.X は様々な発生のプロセスに寄与していることが明らかとなった。

総合緒言

哺乳類ではその生活環の中で様々な発生イベントが起きることが知られている。受精後の着床前発生期では全能性を獲得した後、最初の分化が起き、着床後発生期では様々な器官の形成や生殖細胞の分化などが起きる。また生後では性成熟により、生殖が可能となり次世代に自身の遺伝情報を受け継がせることができるようになる。このような発生イベントはその時期や場所における適切な遺伝子発現により制御されている (Fig. GI1, Wang *et al.*, 2006, Saitou *et al.*, 2012, Sasaki *et al.*, 2008)。

遺伝子発現を制御する機構の一つとしてクロマチン構造の変化がある。一般的に緩いクロマチン構造が形成されるとその領域にある遺伝子発現は活性化され、一方で締まったクロマチン構造の形成は遺伝子発現を抑制することが知られている (Boyle *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 1993)。

クロマチンはヌクレオソームを最小単位として DNA と 4 種類の 2 量体コアヒストンの八量体から構成されている。ヒストン H4 を除くすべてのコアヒストンにアミノ酸配列が異なるヒストン変異体があり、各ヒストン変異体によってゲノム上の局在の様式の違い、翻訳後修飾の種類と部位の違い、さらに各ヒストン変異体に特異的なドメインがあることから、それぞれが異なった性質、機能を持つことが明らかになっている (Hake *et al.*, 2006a, Hake *et al.*, 2006b, Biterge *et al.*, 2014, Bannister *et al.*, 2011)。また、いくつかのヒストン変異体は他のヒストン変異体と置換することでクロマチン構造に変化をもたらすことが明らかになっている (Jin and Felsenfeld, 2007, Lin *et al.*, 2013, Shinagawa *et al.*, 2014, Funaya *et al.*, 2018)。

コアヒストンの中でもヒストン H2A には多くのヒストン変異体が存在し、一部の H2A 変異体でマウス発生やクロマチン構造への寄与が報告されている。哺乳類のヒストン H2A には、H2A を含む TH2A、H2A.X、H2A.Z、macroH2A などの H2A 変異体が存在し (Fig. GI2,

Huh *et al.*, 1991, Kamakaka and Biggins, 2005, Pusarla and Bhargava, 2005)、それぞれ発生に重要な役割を果たしていることが示されている。例えば、H2A.Z は着床前発生期の胚盤胞期に起こる透明帯からの初期胚の脱出や着床後の胚発生に関与し、H2A.Z ヘテロ変異マウス間から H2A.Z ホモ変異マウスを獲得する事ができないことが明らかになっている (Faast *et al.*, 2001)。さらに、H2A.Z は H3 変異体との組合せにより、クロマチン構造への機能的性質を変えることが明らかになっている (Jin and Felsenfeld, 2007)。macroH2A の欠損は胎児期の発生率の低下を引き起こさないが、胎児の体サイズが減少し、生後の一部の macroH2A 欠損マウスは致死することや生殖能力が低下することが知られている (Pehrson *et al.*, 2014)。さらに、macroH2A はクロマチン構造を締める機能を持ち、これにより遺伝子発現を抑制している (Abbott *et al.*, 2004, Douet *et al.*, 2017)。しかし、TH2A と H2A.X についてはマウス発生において不明瞭な部分が多く、その役割が詳細には明らかになっていない。TH2A に関連する過去の研究において、TH2A と H2B 変異体である TH2B の両欠損、または過剰発現の解析により TH2A と TH2B は着床前発生や体細胞における緩いクロマチン構造の形成や雄マウスの妊性に関与していることが報告されている (Shinagawa *et al.*, 2014, Shinagawa *et al.*, 2015)。また、TH2A/TH2B 両欠損マウスでは雄不妊になるが、TH2B 単独欠損マウスではそれが起きないことが報告されており (Montellier *et al.*, 2013)、TH2A が雄の妊性に関与していることが考えられる。しかし TH2A のみを欠損したマウスはこれまで作製されておらず、TH2A 単体にそれらの役割があるかどうかについては明らかになっていない。また、H2A.X の過去の研究では、マウスにおける H2A.X の欠損はマウスの体サイズの減少や雄マウスにおいて生殖細胞の減数分裂の停止による不妊を引き起こすことが報告されている (Celeste *et al.*, 2002)。一方、雌マウスの妊性については産子数が減少するというだけの記述はあるが実際に産子数が少ないことを示すデータは記載されていない (Celeste *et al.*, 2002)。また、他の発生時期における H2A.X の詳細な解析はなされていない。また、*in*

in vitro による解析で H2A.X は、クロマチン構造を緩める機能を持つことが明らかになっているが (Li *et al.*, 2010)、生体内で実際にどのように機能しているかについては明らかになっていない。

マウスの発生において着床前発生は重要な発生イベントの一つである。受精後に 1 細胞期胚は全能性を獲得し、その後、分化能を失いながら多能性を獲得していく。胚盤胞期には、受精後初めての分化が起き胎児に発生する inner cell mass と胎盤への発生する trophoblast の 2 つの細胞系譜に分化する (Niwa, 2007, Strumpf *et al.*, 2005, Adjaye *et al.*, 2005)。この着床前発生期では、リプログラミングと呼ばれる現象が起きることが知られており、大規模な遺伝子発現、エピジェネティック修飾、クロマチン構造の緩みの変化が起きることが知られている (Ooga *et al.*, 2016, Abe *et al.*, 2015, Yamamoto *et al.*, 2016, Yamamoto *et al.*, 2017, Saitou *et al.*, 2012, Li, 2002)。

受精前後を含め着床前発生期における遺伝子発現パターンの変化については、多くの報告がある。成長期卵と呼ばれる初期の卵は配偶子として未成熟であり、受精能と発生能の獲得に向けて細胞の体積を増加させながら成長していく。成長期卵では、減数分裂の進行と受精後の初期胚発生に必要な卵特異的遺伝子の転写が行われている (Wu *et al.*, 2017, Miyano *et al.*, 2007)。卵成長を終えた卵は成長卵と呼ばれ、成長卵では転写活性が完全に停止していることが明らかになっており (Bouniol-Baly *et al.*, 1999)、ここまでに卵中に蓄積された RNA や蛋白質が母性因子としてその後の減数分裂の進行と初期胚発生の制御に関与している (Wu *et al.*, 2017)。成長卵は次に卵成熟過程に入り、第 2 減数分裂中期に達した卵は受精能を獲得し、精子と接合することで 1 細胞期胚となって胚ゲノムから初めての転写が起きる (Aoki *et al.*, 1997)。1 細胞期胚では他の細胞では見られない遺伝子発現パターンが見られ、90%以上の遺伝子領域から転写が起きており、さらにレトロトランスポゾンを含む遺伝子間領域からの転写が起きている。しかし、卵と 2 細胞期以降の初期胚では発現し

ている遺伝子数は 80%以下になり、遺伝子間領域からの転写が著しく減少する(Abe *et al.*, 2015, Yamamoto *et al.*, 2016, Yamamoto *et al.*, 2017)。その後、4 細胞期胚以降では多能性の獲得や受精後の最初の分化に必要な遺伝子の発現が起き、様々な発生イベントが引き起こされている。

着床前初期胚における様々なエピジェネティック修飾の変化の中で最も知られている一つは DNA のメチル化レベルの変化である。一般的に DNA のメチル化は遺伝子発現を抑制する作用を持つ。着床前発生期では DNA の複製後にグローバルな新規の DNA メチル化が行われなため、1 細胞期胚から胚盤胞期胚にかけて DNA 複製依存的に DNA メチル化レベルが減少する受動的 DNA 脱メチル化を起さる。しかし、1 細胞期胚において雄性ゲノムは能動的な DNA 脱メチル化を受け、雌性ゲノムより早期に DNA メチル化レベルが急激に低下するため、1 細胞期胚では前核間で非対称的な DNA メチル化状態となる(Santos *et al.*, 2002)。

着床前発生期におけるクロマチン構造の緩みの変化では、1 細胞期において最も緩いクロマチン構造が形成されており、発生の進行と共に締まったクロマチン構造になることが知られており、このクロマチン構造の緩みの変化は着床前発生に重要であると考えられている(Ooga *et al.*, 2016)。着床前発生期のクロマチン構造の緩みには、リンカーヒストン H1 の変異体である H1FOO が 1 細胞期の緩いクロマチン構造に関与することが明らかになっているが(Funaya *et al.*, 2018)、コアヒストンの関与は明らかになっていない。一方、上で述べたように、H2A 変異体である TH2A と H2A.X は緩いクロマチン構造の形成に関与することが示唆されている(Li *et al.*, 2010; Shinagawa *et al.*, 2014)。さらに TH2A と H2A.X は 1 細胞期胚に多く核局在していることが分かっているが(Shinagawa *et al.*, 2014; Nashun *et al.*, 2010)、これらの着床前におけるクロマチン構造の形成や発生への役割は明らかになっていない。

従って、本研究ではマウス発生における TH2A と H2A.X の役割について明らかにするこ

ととした。そのために、TH2A または H2A.X を欠損させ、そのマウス発生への影響を幅広く解析した。さらに、マウス発生の中でも特に重要な役割を果たしていることが予想される着床前発生期において TH2A と H2A.X の役割について詳細な解析を行った。

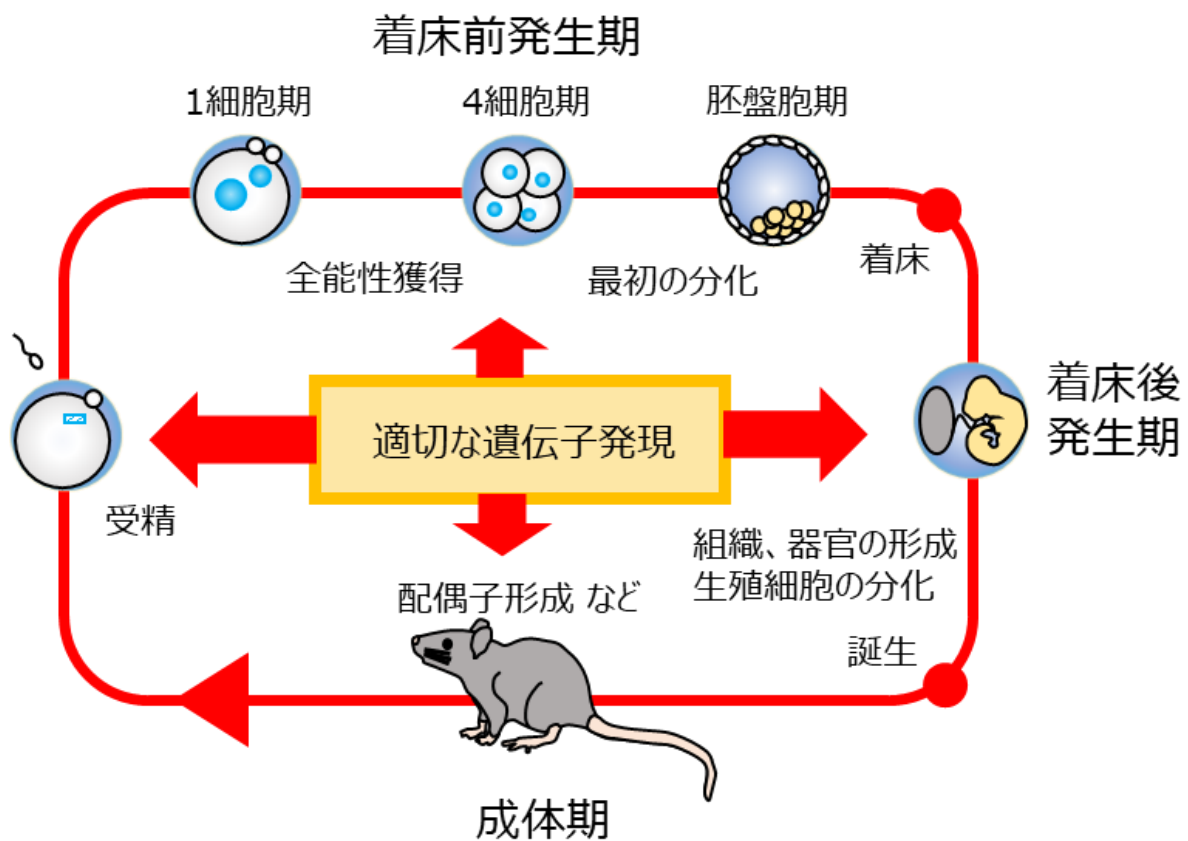


Fig. GI1. マウス発生の概略図

哺乳類ではその生活環の中で様々な発生イベントが起きることが知られている。受精後の着床前発生期では全能性を獲得した後、最初の分化が起き、着床後発生期では様々な器官の形成や生殖細胞の分化などが起きる。また生後では性成熟により、生殖が可能となり次世代に自身の遺伝情報を受け継がせることができるようになる。このような発生イベントはその時期や場所における適切な遺伝子発現により制御されている。

H2A変異体	クロマチン構造への機能	ヒストン変異体欠損の影響		
		胚発生	生後の成長	生殖能力
TH2A	緩める	?	?	?
H2A.X	緩める	?	体サイズの減少	雄不妊、 雌生殖能力 低下
H2A.Z	緩める & 締める	胚性致死 (E7.5)		
macroH2A	締める	胎児の体サイズの 減少	体サイズの減少、 生後の致死	

Fig. G12. 各 H2A 変異体の機能と欠損時の発生における影響

表は H2A 変異体である TH2A、H2A.X、H2A.Z、macroH2A のクロマチン構造への機能とそれぞれを欠損したマウスにおける発生への影響をまとめたものである。

第1章

マウス発生における TH2A の役割

緒言

TH2A はラットにおいて精巣特異的に発現する H2A 変異体として発見されたが、(Huh *et al.*, 1991)、その後、他の動物種(マウス、ヒト)にも存在していることが明らかとなった。さらに TH2A は精巣だけでなく卵でも高く発現しており、母性因子として受精後の着床前初期胚にも引き継がれていることが示された (Shinagawa *et al.*, 2014)。

体細胞で広く発現している H2A は、マウスゲノム上に多くの遺伝子があるのに対し、TH2A は 13 番染色体に 1 つのみ存在する (*Hist1h2aa*; Mouse Genome Informatics)。TH2A は H2A と同様に DNA 複製依存的な遺伝子発現調節領域を持ち、培養細胞では DNA 複製依存的に発現することが明らかになっており、さらに、TH2A mRNA の 3' 非翻訳領域には DNA 複製依存的に RNA を安定化する配列をもつことが知られている。(Huh *et al.*, 1991)。蛋白質構造では、TH2A の C-terminal domain は H2A と比較して明瞭に異なることが知られている (Hada *et al.*, 2017a)。さらに、ヌクレオソームの中で TH2A と他のヒストンまたは DNA との間で形成される水素結合の数は H2A と比較して少なく、TH2A を含むクロマチンは緩んだ構造を形成していると考えられているが (Shinagawa *et al.*, 2014)、着床前初期胚において TH2A が緩いクロマチン構造に関与するのかを明確にした研究はなされていない。

過去の研究で TH2A と *Th2a* のすぐ上流にある H2B 変異体である TH2B を両方欠損したマウスが作出されており、TH2A/TH2B 両欠損は、雄マウスの不妊を引き起こすことが報告されている (Shinagawa *et al.*, 2014)。この雄マウスの不妊は、TH2A/TH2B が欠損したことにより雄性生殖細胞が第一減数分裂の時点で停止していることが原因である事が明らかになっている (Shinagawa *et al.*, 2015)。ところが、TH2B を単独で欠損した雄マウスでは、不妊にならない (Montellier *et al.*, 2013)。したがって、雄の生殖能力には、TH2B ではなく TH2A のみに関与しているか、あるいは TH2A と TH2B の両方が必要とされるかのいずれかと考えられる。そこで、このいずれかを明らかにするためには TH2A を単独で欠損した際の雄の生

殖能力への影響を調べる必要があるものと考えられる。また、卵由来の母性 TH2A/TH2B を両方欠損した着床前初期胚では、その発生が遅延または停止することが明らかになっているが (Shinagawa *et al.*, 2014)、これについても TH2A 単独での着床前発生への役割については調べられていない。

TH2A の C-terminal domain には他の H2A 変異体にはない、TH2A 特異的なアミノ酸配列が存在し、その箇所に翻訳後修飾が施されることが知られている。TH2A の C-terminal domain にある N 末から 127 番目のスレオニンはリン酸化 (pTH2A) されることが報告されており、pTH2A は雌雄生殖細胞の減数分裂中におけるセントロメアや 1 細胞期胚の有糸分裂中におけるペリセントロメアヘテロクロマチンと呼ばれるクロマチン構造が凝集したゲノム領域に局在することが明らかになっている (Hada *et al.*, 2017a, Hada *et al.*, 2017b)。また、精母細胞では pTH2A は H3 変異体である H3.3 と共にゲノム上で転写開始点周辺に局在しており、特に発生に関連する遺伝子上に多く局在していることが示されている (Hada *et al.*, 2017b)。これらの研究から pTH2A は配偶子形成や着床前発生に関与することが予想されていたが、TH2A の 127 番目のスレオニンに変異の入ったマウスでは、pTH2A の欠乏による雌雄の妊性への影響が観察されなかった。

これまでに、TH2A に関する多数の研究が行われてきたが、どの研究においても TH2A がマウスの発生に寄与していることが明らかにされていない。そこで、この章では TH2A を欠損したマウスを用いてマウス発生における TH2A の役割を明らかにすることとした。

結果

TH2A 変異マウスの作製

マウス発生への TH2A の役割を明らかにするため、*Th2a* 変異マウスを CRISPR/Cas9 系を用いて作製した。TH2A は N-terminal tail、Globular domain と C-terminal tail の3つのドメインを持つが、その中で Globular domain をコードするゲノム上に11塩基対の欠損を持つ *Th2a* 変異マウスを得た (Fig. 1-1A、B)。このマウスの *Th2a* は、フレームシフト変異によりタンパク質に翻訳された時に TH2A の Globular domain 以降の構造を持たず、クロマチン構造に取り込まれないことが予想された。*Th2a* ホモ変異マウスにおける TH2A 蛋白質の欠損を確認するため、TH2A が高発現していることが知られている成長卵に対して、C-terminal domain を認識する抗 TH2A 抗体 (Shinagawa *et al.*, 2014) による免疫染色を行った。その結果、野生型と *Th2a* ヘテロ変異型の卵では TH2A を検出することはできたが、*Th2a* ホモ変異型卵では検出できなかった (Fig. 1-1C)。この実験により、変異した *Th2a* を両アレルで持つマウスでは、TH2A 蛋白質が欠損していることが確認された。以降、TH2A 蛋白質を欠損する *Th2a* ホモ変異マウスを TH2A 欠損マウスと呼ぶこととする。

TH2A 欠損によるマウス発生への影響

マウス発生における TH2A の役割を明らかにするため雌雄の *Th2a* ヘテロ変異マウスの間において交配を行い、それらから得られた仔の遺伝型の出現比率について解析した。その結果、その仔の遺伝型比は予想される比率 (+/+ : +/- : -/- = 1 : 2 : 1) と有意な差はなかった (Table. 1-1)。次に、TH2A 欠損による体サイズへの影響を明らかにするため、生後 21 日目の各遺伝型のマウスの体重を測定した。その結果、TH2A を欠損しても体重への影響はないことが分かった (Fig. 1-1D)。これらの結果から次世代の仔において TH2A を欠損しても初期胚発生やその後の成長に関与していないことが明らかになった。

TH2A 欠損による生殖能力への影響

次に TH2A 欠損による生殖能力への影響を調べるため、雌雄の TH2A 欠損変異マウスを用いて *Th2a* ヘテロ変異マウスと交配実験を行い、得られる仔の数について解析した。その結果、TH2A 欠損雄マウスから得られた仔の数はコントロールと比して有意な差はなかったが、TH2A 欠損雌マウスでは得られる仔の数が減少することが分かった (Fig. 1-2)。この実験で、雌マウスから得られる仔の数が減少した原因として次の2つの可能性が考えられる。1つは、母側の TH2A とその胎仔の TH2A の両方が欠損したことにより発生不良が起きたという可能性と、もう1つは、胎仔の TH2A の欠損は関係なく母側の TH2A が欠損したことで、母側の何かの異常により発生不良が引き起こされた可能性である。これら2つの可能性を検証するため、TH2A 欠損雌マウスと *Th2a* ヘテロ変異マウス間から得られた仔の遺伝型比を明らかにした。もし、胎仔における TH2A 欠損が発生不良に関わっているのであれば、予想される比率 (+/-:-/- = 1:1) よりも -/- 型の比率が低くなるものと考えられた。しかし、実際には、その比率は (+/-:-/- = 1:1) と有意な差はなかった (Table. 1-2)。したがって、TH2A 欠損マウスの産子数の減少は胎仔側の欠損が原因ではなく、母側のみの TH2A の欠損が起因していることが示された。

TH2A 欠損による卵形成への影響

上記の結果から TH2A は雌の生殖能力に関与していることが示唆されたが、雌の生殖能力低下の原因として、卵形成、胎児の発生を支持する子宮機能の異常、卵由来の母性 TH2A が欠損したことによる着床前の発生不良が考えられた。そこで、これらの可能性について検討していくことにした。

まず、TH2A 欠損による卵形成への影響について明らかにすることにした。卵形成への影響による卵の欠乏は卵巣の重量を減少させることがあることが知られていることから (Yin, *et*

al., 2017, Yeung *et al.*, 2017)、TH2A 欠損による卵巣の重量への影響について解析した。その結果、TH2A 欠損雌マウスから摘出した卵巣の重量はコントロールと比較して有意な差はなかった (Fig. 1-3A)。次に卵巣の HE 染色による切片像 (Fig. 1-3B) を用いて卵巣に含まれる卵胞数や発達した卵胞である胞状卵胞の数をカウントし、TH2A 欠損による卵巣数と胞状卵胞数への影響について解析した。その結果、TH2A 欠損マウス由来の卵巣に含まれる卵胞数と胞状卵胞数はコントロールと比較して有意な差はなく、TH2A 欠損による影響は見られなかった (Fig. 1-3C, D)。これらの結果から、TH2A を欠損した雌マウスでは正常に卵が作られていることが分かった。

TH2A 欠損雌マウスの卵巣中では正常に卵は作られていたが、作られた卵において卵の質に異常が起きている可能性が考えられた。卵は始原生殖細胞から分化し、減数分裂を進行させながら成長期卵、成長卵、そして受精が可能な成熟卵となる (Ikami *et al.*, 2017)。成長卵には 2 種類の卵が存在しており、それらは核内の DNA の局在様式から定義されている。核内において DNA が核小体周辺に凝集している卵を surrounded nucleolus (SN) 卵と呼び、核内で DNA が一様に散在している卵を non-surrounded nucleolus (NSN) 卵と呼ばれている (Zuccotti *et al.*, 1998, Fig. 1-4A)。これら 2 種類の卵はそれぞれ性質が異なり、SN 卵は成熟能および発生能を持つが、NSN 卵は成熟能が著しく低く、また成熟卵まで達しても受精後、2 細胞期で停止し発生能も低いことが明らかになっている (Zuccotti *et al.*, 1998, Inoue *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2002)。そこで、次に、TH2A 欠損が及ぼす卵の質への影響について明らかにするため、TH2A 欠損マウス由来の成長卵に含まれる SN 卵の数について解析した。その結果、TH2A 欠損卵における SN 卵の数はコントロールと比較して有意な差はなかった (Fig. 1-4A)。次に TH2A 欠損による卵成熟への影響を明らかにするため、排卵された卵における極体放出率を解析した。その結果、TH2A 欠損卵の極体放出率はコントロールと比較して有意な差はなく (Fig. 1-4B)、TH2A の欠損は卵成熟に影響しないことが明らかにな

った。次に TH2A 欠損による受精への影響を明らかにするため、採取した成熟卵を用いて体外受精させ、前核の有無で受精の判定を行った。その結果、TH2A 欠損卵の受精率はコントロールと比較して有意な差はなかった (Fig. 1-4C)。これらの結果から、TH2A の欠損により卵形成の異常が起きてないことが示され、TH2A 欠損雌マウスの産子数の減少は卵形成の異常が原因でないことが分かった。

TH2A 欠損による子宮機能への影響

着床前発生期を終えた胚は透明帯から脱出し、子宮に着床する。その後、胎盤形成が起き、着床した胚と子宮の間では様々なやり取りが行われ、胚は正常に発生していく (Lim *et al.*, 2010)。このことは、母体が胎児の発生に及ぼす影響を考えると、子宮の機能がその大きな要素となることを示している。そこで、TH2A 欠損による子宮機能への影響を明らかにするため、TH2A を欠損した偽妊娠マウスに対し、野生型の 2 細胞期胚を胚移植した。胚移植後 18 日目に子宮に着床している胎児の数について調べた。その結果、TH2A 欠損雌マウスに着床した胎児の数はコントロールと比較して有意な差はなかった (Fig. 1-5)。この結果から TH2A の欠損は子宮機能へ影響を及ぼさないことが示された。

母性 TH2A 欠損による着床前発生への影響

着床前初期胚は卵由来の mRNA や蛋白質などの母性因子と受精後に発現してくる胚性因子より発生制御されていることが知られている (Lu *et al.*, 2017, Jukam *et al.*, 2017)。TH2A は卵や 1 細胞期胚で高発現しており、着床前発生の進行に伴い発現量が減少することが明らかになっている (Shinagawa *et al.*, 2015) が、着床前発生期において発現している TH2A が母性または胚性由来なのかについては明らかになっていない。そこで初めに、TH2A 欠損卵と野生型の精子を体外受精して得られた着床前初期胚における TH2A の発現について

抗 TH2A 抗体を用いた免疫染色により解析した。その結果、野生型胚では TH2A は 1 細胞期胚、2 細胞期胚で強く検出され、4 細胞期胚以降に TH2A のシグナルは減少した。一方、TH2A 欠損卵由来の胚では着床前発生期を通して TH2A のシグナルは検出されなかった (Fig. 1-6)。このことから着床前発生期において発現している TH2A のほとんどは卵から由来する母性因子であることが示唆された。次に、母性 TH2A による着床前発生への影響を明らかにするため、野生型あるいは TH2A 欠損卵と野生型精子を用いて体外受精を行い、得られた着床前初期胚の発生について観察した。その結果、母性 TH2A 欠損胚の発生率は、野生型胚と比較して有意な差はなく、胚盤胞期胚まで発生し (Fig.1-7)、着床前の発生不良が TH2A 欠損雌マウスの生殖能力の低下の原因ではないことが示された。

母性 TH2A 欠損によるエピジェネティック修飾への影響

ここまでの解析で、雌マウスにおける TH2A の欠損は、卵形成、子宮機能に影響与えず、また、母性 TH2A の欠損も着床前発生には影響を与えないことが分かった。これらの結果から、TH2A 欠損雌マウスにおける生殖能力の低下は、着床後の発生不良が原因と考えられた。

過去の研究では、ゲノムインプリンティングの異常と着床後の発生不良が関連するような報告がされている (Khosla *et al.*, 2001, Branco *et al.*, 2016, Kaneda *et al.*, 2004, , Inoue *et al.*, 2018, Matoba *et al.*, 2018, Inoue *et al.*, 2020)。インプリンティングは生殖細胞形成過程で確立され、さらに受精後の着床前発生期ではインプリンティングの維持機構が働いていることが明らかになっている (Saitou *et al.*, 2012, Hirasawa *et al.*, 2008, Takahashi *et al.*, 2015, Nakamura *et al.*, 2007)。インプリンティング遺伝子の発現は DNA のメチル化や H3K27me3 (ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のトリメチル化) のエピジェネティック修飾によって制御されていることが明らかになっている (Inoue *et al.*, 2017, Kobayashi *et al.*, 2012)。また、DNA メ

チル化は非インプリンティング遺伝子の発現制御にも関与しており、これら遺伝子の DNA メチル化レベルが着床以前に減少すると、着床後で発現が増加し胎盤形成の不良による胚の発生不良が起きることが明らかになっている (Branco *et al.*, 2016)。これらエピジェネティック修飾の制御にはヒストン変異体が関与していることが報告されている (Shinagawa *et al.*, 2014, Hake *et al.*, 2006b)。

これらのことから 1 細胞期胚において高発現している TH2A はエピジェネティック修飾に関与していることが考えられ、母性 TH2A の欠損により、インプリンティングを含む遺伝子発現制御に関与するエピジェネティック修飾に影響し、着床後の発生不良を引き起こしている可能性が考えられた。そこで初めに母性 TH2A 欠損 1 細胞期胚においてインプリンティングや遺伝子発現の抑制に関与することが明らかになっているエピジェネティック修飾の一つである DNA のメチル化 (5mC) レベルについて抗体を用いて免疫染色により解析した。その結果、母性 TH2A 欠損胚において DNA のメチル化のシグナルは 1 細胞期胚の雌雄前核において減少していた (Fig. 1-8A)。しかし、DNA のメチル化のシグナルの減少は DNA 複製の不良による DNA 量の減少によって引き起こされた可能性が考えられた。そこで、母性 TH2A 欠損胚対し DAPI 染色し DNA 量を定量した結果、野生型胚と比較して母性 TH2A 欠損胚の DNA 量に有意な差はなかった (Fig. 1-8B)。これらの結果から母性 TH2A 欠損 1 細胞期胚では DNA のメチル化レベルが減少していることが示された。さらに、1 細胞期時に DNA の脱メチル化の阻害に関与する H3K9me2 の局在レベルについても解析したところ、母性 TH2A 欠損 1 細胞期胚において DNA のメチル化と同様に H3K9me2 レベルも雌雄前核において減少していた (Fig. 1-8C)。

次に、インプリンティングに関与するもう一つのエピジェネティック修飾である H3K27me3 の局在レベルについて免疫染色により解析した。H3K27me3 レベルは、母性 TH2A が欠損することで雌性前核において減少した (Fig. 1-9A)。次に H3K27me3 と互いに修飾を促進す

ることが分かっている H2AK119ub (ヒストン H2A の 119 番目のリジン残基のユビキチン化) についても解析した。その結果、H3K27me3 レベルへの影響と同様に、母性 TH2A を欠損した 1 細胞期胚では雌性前核において H2AK119ub レベルが減少していた (Fig. 1-9B)。

母性 TH2A 欠損 1 細胞期胚では、遺伝子発現抑制やインプリンティングに關与する DNA のメチル化と H3K27me3 レベルが減少しており、それぞれに關連する H3K9me2 と H2AK119ub レベルにも影響があった。これらの結果から、母性 TH2A 欠損は様々なエピジェネティック修飾に影響を与えることが分かり、エピジェネティック修飾の機能の一部であるインプリンティングや着床後発生期で抑制されている遺伝子の活性に影響を及ぼしていることが示唆された。

考察

TH2A は着床前発生期、生殖細胞形成期で高く発現していることや、TH2A 特異的な翻訳後修飾が付加されていることが知られている (Shinagawa *et al.*, 2014、 Hada *et al.*, 2017a, Hada *et al.*, 2017b)。また、TH2A と TH2B の両方を欠損されたマウスを用いた研究では、雄マウスにおける減数分裂停止による不妊や母性 TH2A/母性 TH2B 欠損による着床前の発生遅延および停止が引き起こることが明らかになっている (Shinagawa *et al.*, 2014)。これらの報告からマウス発生において TH2A は何かしらの機能を果たしていると考えられてきたが、これまでに発生における TH2A のみの寄与については明かされてこなかった。本研究では、マウス発生における TH2A の役割を明らかにするため、TH2A 欠損マウスを用いて発生への影響を解析した。その結果、個体における TH2A の欠損はその発生や成長に影響を与えることはなかったが、雌の生殖能力の低下を引き起こすことが明らかになった。しかし、雄の生殖能力への影響は見られなかった。これらの解析により、TH2A は雌の生殖能力を支える要素に関与していることが示唆された。

マウス発生における TH2A の寄与について

Th2a ヘテロ変異マウス間の交配実験の解析により、TH2A の欠損はマウスの出生率に影響を与えなかったことから、個体における TH2A 欠損は胚発生に影響を与えないことが分かった (Table 1-1)。加えて、生後 21 日目では TH2A を欠損しても体重に変化はなく、成長にも影響を与えなかった (Fig. 1-1D)。また、母性 TH2A を欠損した着床前初期胚では発生後期になっても胚性 TH2A が検出されないことが明らかになり (Fig. 1-6)、さらに体細胞や ES 細胞では *Th2a* mRNA の発現がないことが報告されていること (Shinagawa *et al.*, 2014) から、生殖細胞を除く体を構成する多くの細胞では TH2A の発現がないため個体における TH2A 欠損は胚発生と成長に影響を与えなかったと考えられる。

雌の生殖能力における TH2A の寄与

TH2A の欠損は胚発生や成長に影響を与えなかったが、TH2A 欠損マウスを用いた交配実験を行った結果、TH2A 欠損雄マウスでは生殖能力への影響は見られなかったが、TH2A 欠損雌マウスでは生殖能力が低下することが分かった (Fig. 1-2)。

この雌マウスの生殖能力の低下は、卵形成あるいは子宮機能などが原因となっていることが考えられたが、それらに TH2A 欠損による影響は観察されなかった (Fig. 1-3,4,5)。さらに、母性の TH2A の欠損による着床前発生にも異常は見られなかった (Fig. 1-7)。したがって、母性の TH2A が欠損したことにより着床後の発生不良が起き、それが産子数の減少に繋がっていることが示唆された。

過去の研究では着床以前におけるエピジェネティック修飾である DNA メチル化と H3K27me3 への影響と着床後の発生不良が関連する報告がある (Khosla *et al.*, 2001, Kaneda *et al.*, 2004, Inoue *et al.*, 2018, Matoba *et al.*, 2018, Inoue *et al.*, 2020, Branco *et al.*, 2016)。また、DNA メチル化や H3K27me3 はインプリンティングを含む遺伝子発現制御に関与することが知られている (Inoue *et al.*, 2017, Kobayashi *et al.*, 2012)。DNA をメチル化する遺伝子として DNA methyltransferases (DNMTs) が知られている。生殖細胞特異的に *Dnmt3a* を欠損した雌マウスと野生型雄マウスに由来する仔では、母型ゲノムにおけるインプリンティング遺伝子の DNA メチル化レベルが減少し、胎生 9.5 日目にすでに発生不良が起き、胎生 11.5 日目にはすべての胎児が致死することが明らかになっている (Kaneda *et al.*, 2004)。また、母性 *Dnmt3a* と母性 *Dnmt3b* はインプリンティングだけではなく、非インプリンティング遺伝子の発現制御にも関与しており、これら非インプリンティング遺伝子の DNA メチル化レベルが着床以前に減少すると、着床後で発現が増加し胎盤形成の不良による胚の発生不良が起きることも明らかになっている (Branco *et al.*, 2016)。

一方で H3K27 のトリメチル化には polycomb repressive complex 2 (PRC2) のサブユニット

である *Eed* などが関与している (Kruijsbergen *et al.*, 2015)。卵特異的に *Eed* を欠損した卵ではゲノムワイドに H3K27me3 レベルが減少し、さらに受精後では着床前発生期の 1 細胞期から 8 細胞期にかけて H3K27me3 レベルが減少する。特に、母型ゲノムにおいて H3K27me3 によるインプリンティング遺伝子の H3K27me3 レベルが低下し、桑実胚期においてそれらインプリンティング遺伝子の発現が増加することが明らかにされている。卵特異的に *Eed* を欠損した卵由来の胚では、ゲノムワイドに H3K27me3 レベルが減少したのにもかかわらず着床前での発生不良は起きず、着床後発生期の胎生 6.5 日目より発生不良が起きていることや、胎盤の発達不良が明らかになっている (Inoue *et al.*, 2018)。

さらに、インプリンティングは生殖細胞形成過程で確立されるが、受精後の着床前発生期ではインプリンティングの維持機構が働いていることが明らかになっている (Saitou *et al.*, 2012, Hirasawa *et al.*, 2008, Takahashi *et al.*, 2015, Nakamura *et al.*, 2007)。例えば、着床前発生期ではゲノムワイドな DNA の脱メチル化が起きるが、DNA 脱メチル化を保護する PGC7 (Nakamura *et al.*, 2007) や DNA メチル化酵素 DNMT1 (Hirasawa *et al.*, 2008) などにより一部のインプリンティングが維持し続けられていることが分かっている。

これらのことから、母性 TH2A の欠損は DNA のメチル化や H3K27me3 への影響を与え、インプリンティング遺伝子などを含む遺伝子発現の異常を引き起こし、その結果、着床後発生に影響を及ぼしたことが考えられる。実際、母性 TH2A 欠損 1 細胞期胚において DNA のメチル化レベルは雌雄前核において減少しており、さらに H3K27me3 レベルは雌性前核で減少していた (Fig. 1-8,9)。また、母性 TH2A 欠損 1 細胞期胚の雌性ゲノムにおいて DNA メチル化と H3K27me3 レベルが減少していることが示されたが、卵においても TH2A は高発現していることが知られていることから (Shinagawa *et al.*, 2014)、TH2A を欠損した卵ですでに DNA メチル化と H3K27me3 レベルが減少している可能性もある。また、今後、母性 TH2A を欠損したことによる着床後でのインプリンティング遺伝子などの発現異常について解析す

ることが重要と考えられる。

1 細胞期の能動的 DNA 脱メチル化制御機構における TH2A の役割

1 細胞期胚では、雄性前核において能動的 DNA 脱メチル化が働くことが知られており、1 細胞期の後期には雌性前核では高メチル化状態が保たれたまま、雄性前核では低メチル化状態という前核間で非対称的な DNA メチル化状態となる (Santos *et al.*, 2002)。能動的 DNA 脱メチル化には TET3 が重要な因子として機能している (Wossidlo *et al.*, 2011, Gu *et al.*, 2011)。TET3 は雄性ゲノムに対して機能し急激な DNA 脱メチル化を引き起こすが、雌性ゲノムでは TET3 の機能を阻害する機構が働いている。雌性ゲノムに多く局在する H3K9me2 によって母性因子として知られている PGC7 がゲノム上に誘引され、TET3 のゲノムへの作用を防いでいることが知られている (Nakamura *et al.*, 2007, Nakamura *et al.*, 2012)。母性 TH2A 欠損 1 細胞期胚では、雌雄前核において DNA メチル化レベルが減少し、さらに、H3K9me2 レベルも減少していることが分かった (Fig. 1-8)。このことから、1 細胞期胚において TH2A は H3K9 のジメチル化の制御に関与し、これを介して過剰な DNA の脱メチル化を防いでいるものと考えられる。

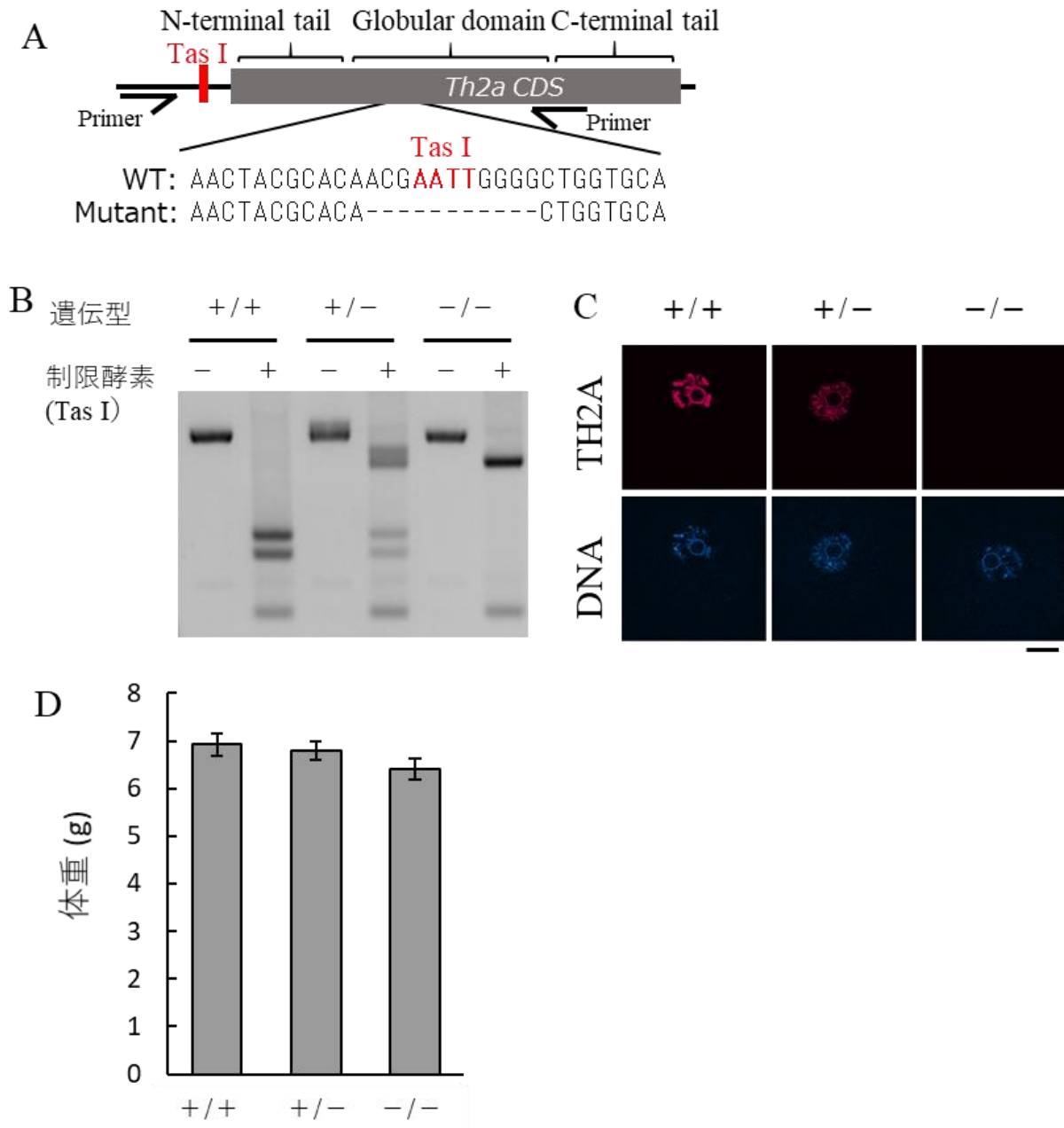


Fig. 1-1. TH2A 変異マウスの作製と TH2A 欠損による成長への影響

A) *Th2a* 変異マウスの *h1sth2aa* (*Th2a*) の遺伝情報。ヒストンの Globular domain 上に 11 塩基対の欠損を持つ変異マウスを得た。赤字の塩基配列は制限酵素 Tas I の認識配列を示す。

B) RFLP による genotyping。欠損領域を挟むように設計されたプライマーを用いて PCR を行い、制限酵素 Tas I により処理し電気泳動をして、得られたバンドパターンで遺伝型を判定した。

C) *Th2a* ホモ変異卵における蛋白質レベルでの TH2A の局在の確認。野生型卵 (+/+)、*Th2a* ヘテロ変異卵 (+/-)、*Th2a* ホモ変異卵 (-/-) を用いて、抗 TH2A 抗体を用いて免疫染色を行った。DNA は DAPI により染色した。スケールバーは 20 μ m を示す。

D) *Th2a* 変異マウスの体重。生後 21 日齢の各遺伝型マウスを用いて体重を測定した。各遺伝型間の体重の有意差は Student's t-test により検出した。エラーバーは S.E. を示す。(+/+ : n=30, +/- : n=41, -/- : n=36)

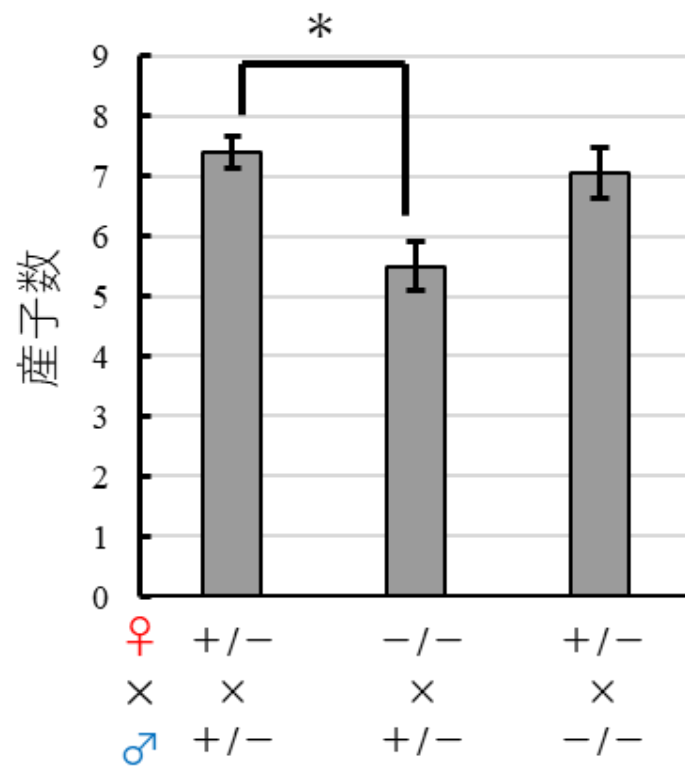


Fig. 1-2. TH2A 欠損による生殖機能への影響

TH2A 欠損による生殖機能への影響。各遺伝型間において 14 回以上の交配を行い、産子数を測定した。* は有意差があることを示す ($P < 0.05$; Student's t-test)。エラーバーは S.E.を示す。

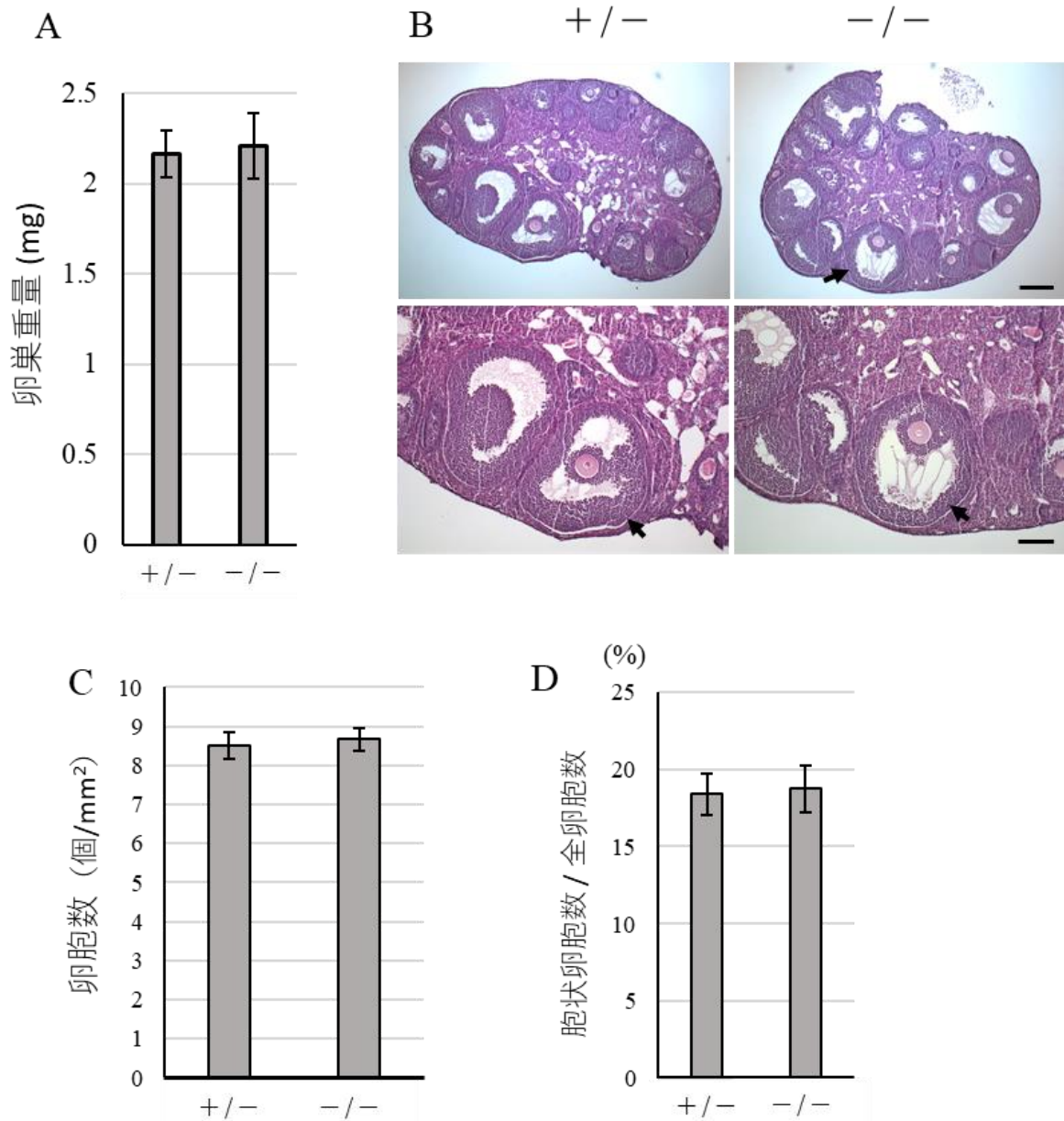


Fig. 1-3. TH2A 欠損による卵巣発達のへの影響

性成熟が完了した6週齢のTH2Aヘテロ変異マウス(+/+)およびTH2A欠損マウス(-/-)から抽出した卵巣を用いて解析をした。

A) TH2A欠損による卵巣の重量への影響。エラーバーはS.E.を示す。各遺伝型間の卵巣重量の差はStudent's t-testにより検出した。(+/+: n = 12, -/-: n = 16)

B) TH2A欠損マウスの卵巣の切片像。卵巣切片をHE染色した。下図は、上図の一部を拡大した図である。上図と下図のスケールバーはそれぞれ300μm、150μmを示す。矢印は胞状卵胞を示す。

C) TH2A欠損による卵胞数への影響。HE染色した切片像を用いて単位面積当たりの卵胞数を定量した。エラーバーはS.E.を示す。各遺伝型間の卵胞数の差はStudent's t-testにより検出した。(n = 10)

D) TH2A欠損による卵胞発達への影響。HE染色した卵巣の切片像において、全卵胞の中での胞状卵胞数の割合を調べた。エラーバーはS.E.を示す。各遺伝型間の胞状卵胞数の差はStudent's t-testにより検出した。(n = 10)。

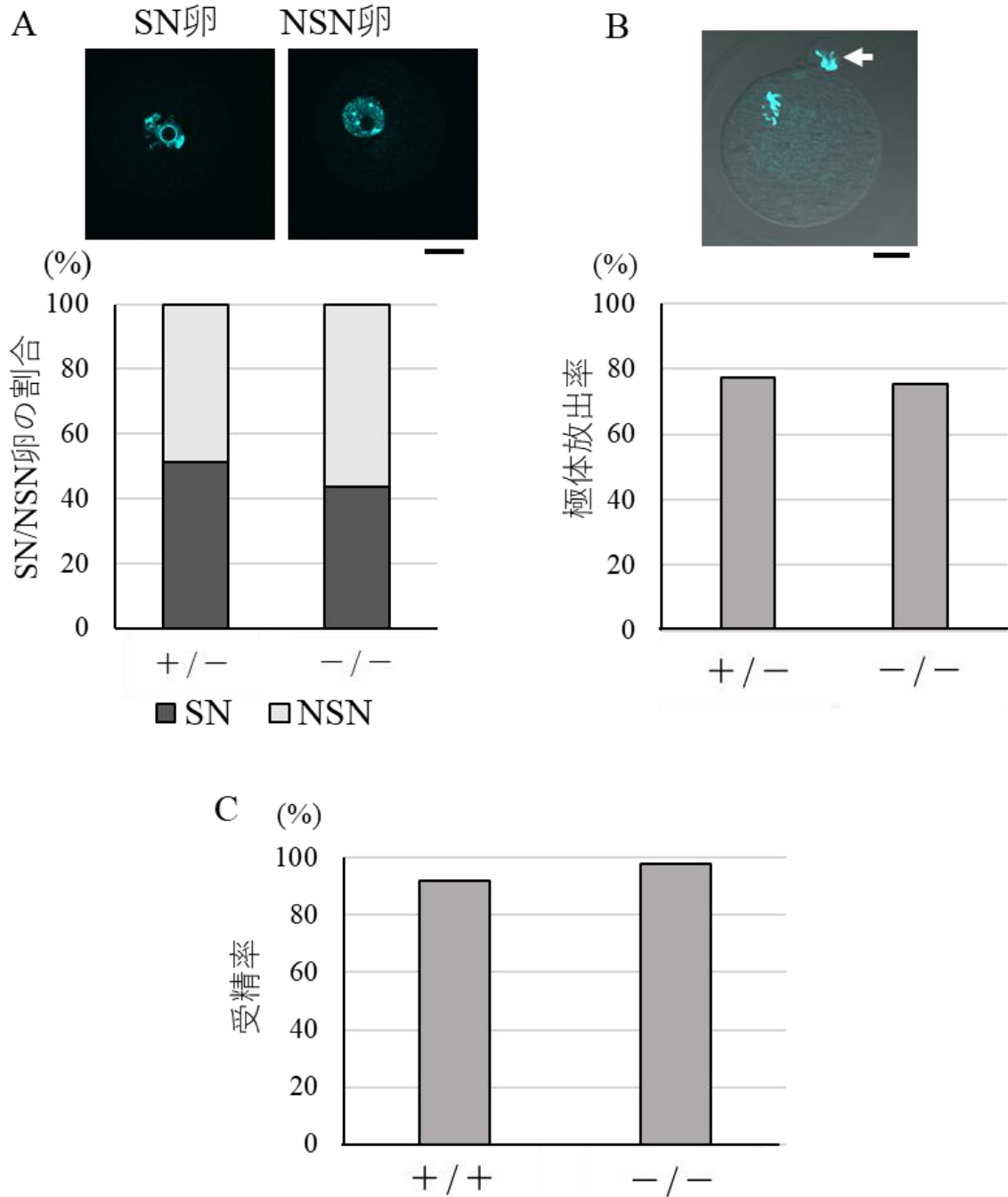


Fig. 1-4. TH2A 欠損による卵形成への影響

A) TH2A 欠損による SN 卵と NSN 卵の存在率への影響。性成熟した TH2A ヘテロ変異 (+/-) および TH2A 欠損 (-/-) 雌マウスの卵巣から成長卵を採取し、DAPI 染色で核内の DNA の局在を調べて SN 卵と NSN 卵を判別した。4 個体以上のマウスを用いて解析した (+/- 卵: n=138、-/- 卵: n=108)。スケールバーは 30 μ m を示す。各遺伝型間の比率の差は χ^2 test により検出した。

B) TH2A 欠損による極体放出率への影響。卵成熟させた卵を DAPI 染色して DNA を観察して極体を放出した卵をカウントした。3 個体以上のマウスを用いて解析した (+/- 卵: n=133、-/- 卵: n=94)。矢印は極体を示す。スケールバーは 20 μ m を示す。各遺伝型間の極体放出率の差は χ^2 test により検出した。

C) TH2A 欠損による受精率への影響。各遺伝型マウスから採取した成熟卵を用いて体外受精し、受精率を調べた。3 個体以上のマウスを用いて解析した (+/+ 卵: n=163、-/- 卵: n=92)。各遺伝型間の受精率の差は χ^2 test により検出した。

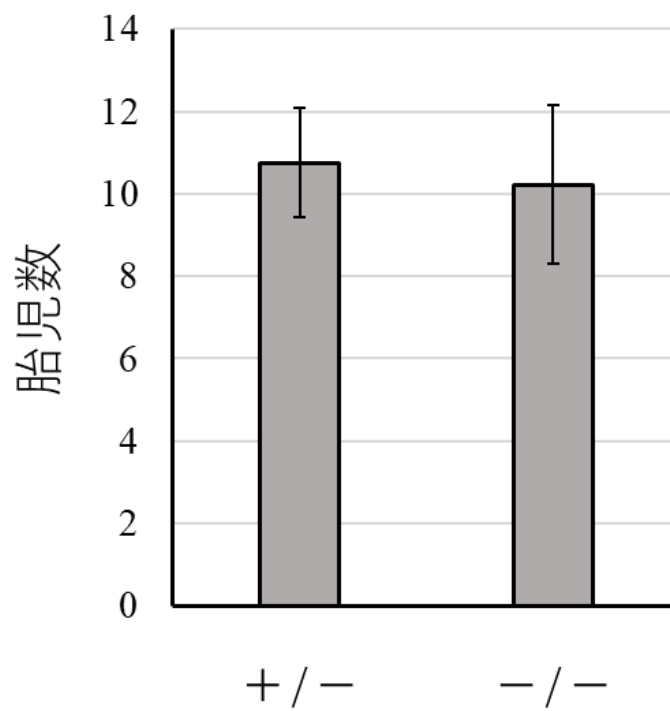


Fig. 1-5. 母性 TH2A 欠損による子宮機能への影響

野生型胚を 20 個を TH2A ヘテロ変異 (+/-) および TH2A 欠損 (-/-) の偽妊娠マウスに胚移植した。移植後 18 日後に子宮に着床している胎児数をカウントした。各遺伝型間の胎児数の差は Student's t-test により検出した (+/- : n=8, -/- : n=9)。

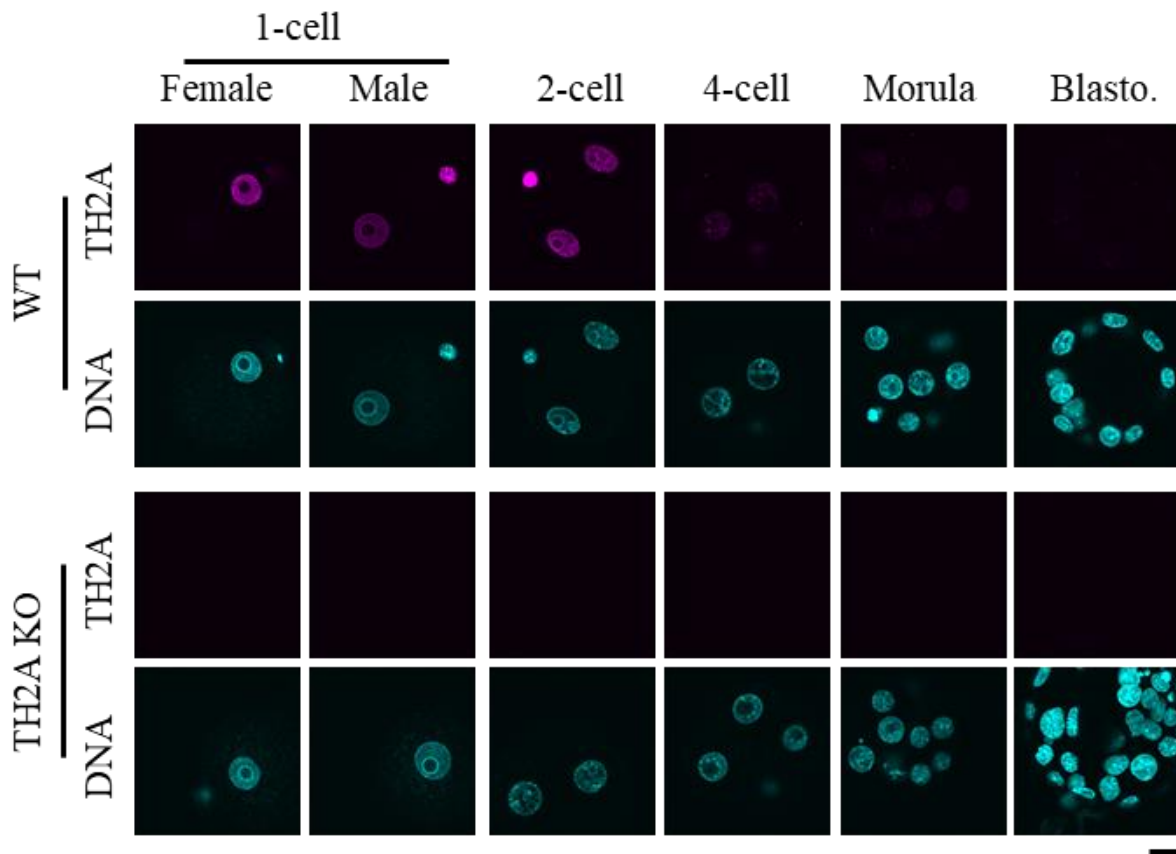


Fig. 1-6. 着床前発生期における母性 TH2A の発現

母性 TH2A 欠損胚における TH2A の発現。野生型胚(WT)と母性 TH2A 欠損胚(TH2A KO)において免疫染色により TH2A の検出を行った。母性 TH2A 欠損胚は、*Th2a*(-/-)の雌マウスから得られた卵と野生型の雄から得られた精子で体外受精を行って得た。DNA は DAPI により染色した。1 細胞期胚は雌性前核(Female)と雄性前核(Male)と分けて表す。スケールバーは 20 μ m を示す。

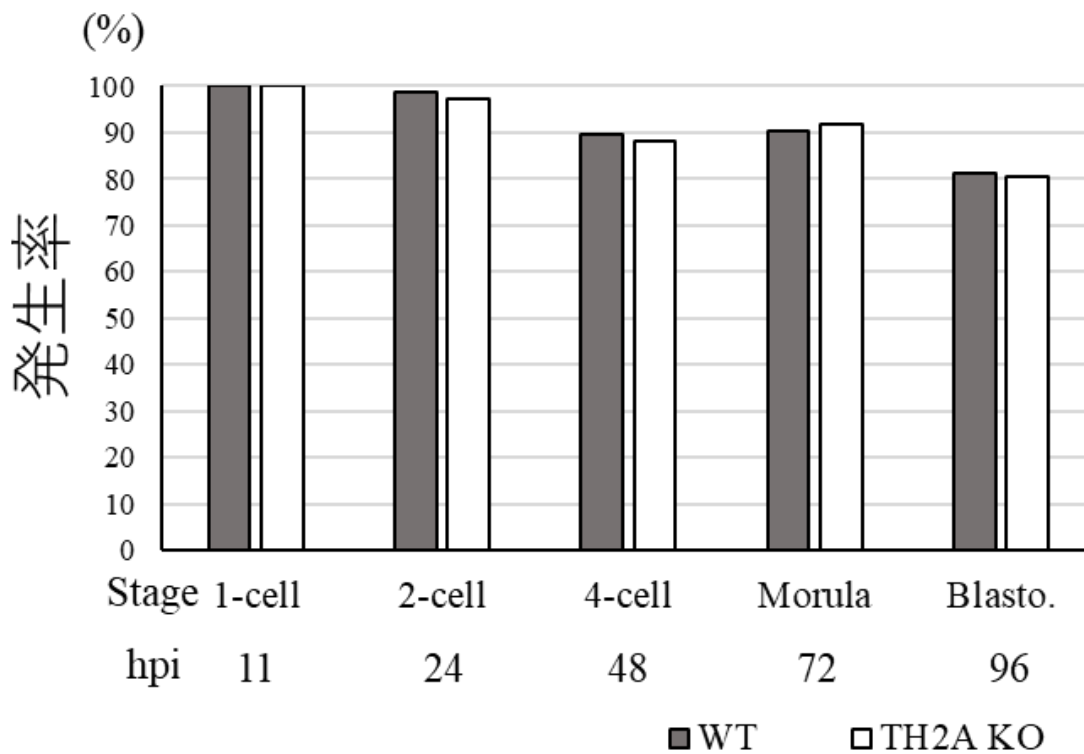


Fig. 1-7. 母性 TH2A 欠損による着床前発生への影響

母性 TH2A 欠損胚の発生率。体外受精により得た野生型胚(WT:n=145)、母性 TH2A 欠損胚(TH2A:n=108)の発生を観察した。媒性後 11、24、48、72、96 時間でそれぞれ 1 細胞期(1-cell)、2 細胞期(2-cell)、4 細胞期(4-cell)、桑実期(Morula)、胚盤胞期(Blasto.)の初期胚の個数をカウントした。独立した実験を 4 回行った。hpi は媒性後時間を示す。* は有意差があることを示す ($P < 0.05$; χ^2 test)。

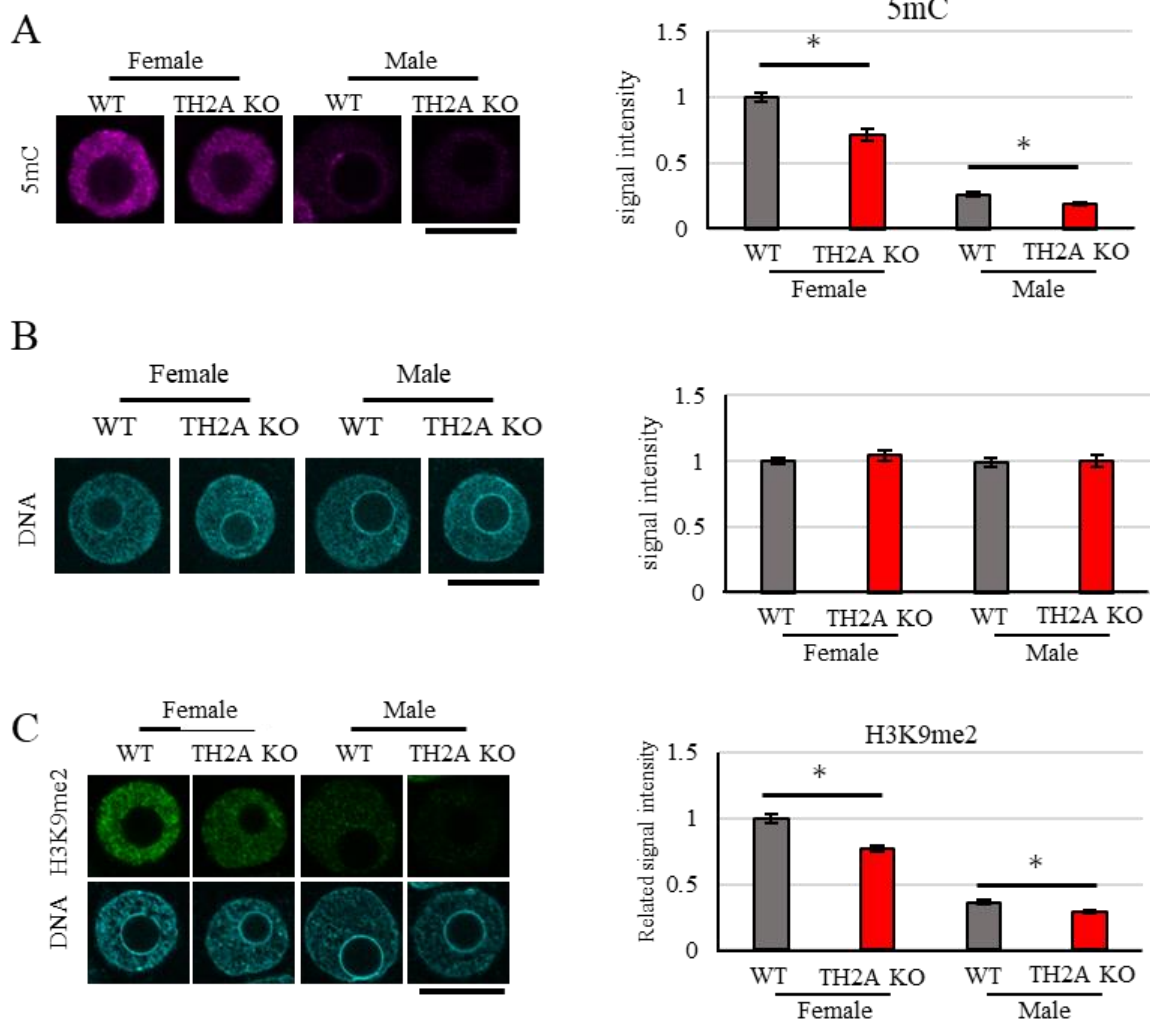


Fig. 1-8. 母性 TH2A 欠損による DNA メチル化レベルへの影響

A)野生型(WT)、母性 TH2A 欠損(TH2A KO)1 細胞期胚を用いて DNA メチル化を免疫染色法により検出し、シグナルを定量した。

B)野生型、母性 TH2A 欠損 1 細胞期胚を固定し、DNA を DAPI で染色してシグナルを定量した。

C)野生型、母性 TH2A 欠損(TH2A KO)1 細胞期胚を用いて H3K9me2 を免疫染色法により検出し、シグナルを定量した。

A)、B)、C) 右グラフは雌性前核(Female)と雄性前核(Male)におけるそれぞれのシグナル強度を定量したものである。独立した実験を 3 回行い、各実験で 8 個以上の胚を用いた。エラーバーは S.E.を示す。

*は有意差があることを示す($P < 0.05$; Student's t-test)。Scale bar は 20 μ m を示す。

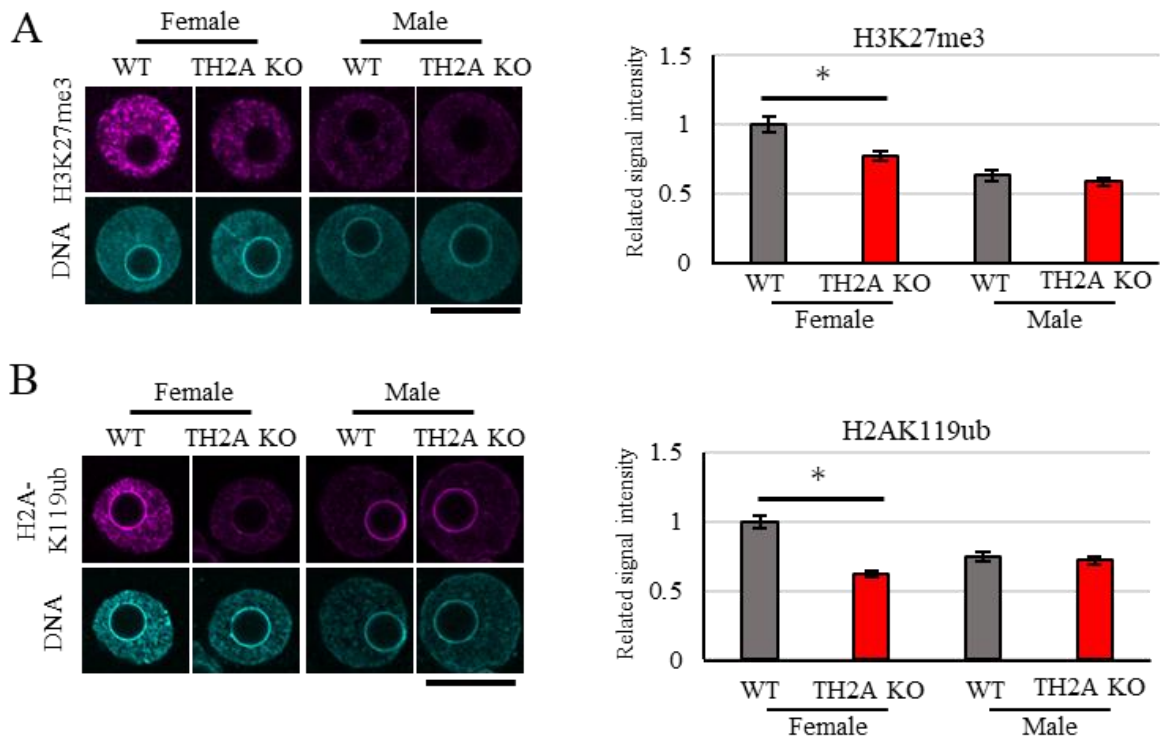


Fig. 1-9. 母性 TH2A 欠損による H3K27me3 レベルへの影響

野生型(WT)とTH2A欠損(TH2A KO)1細胞期胚において、A) H3K27me3, B) H2AK119ub, を免疫染色法により検出した。DNAはDAPIにより染色した。右グラフは雌性前核(Female)と雄性前核(Male)におけるそれぞれのシグナル強度を定量したものである。独立した実験を3回行い、各実験で8個以上の胚を用いた。エラーバーはS.E.を示す。*は有意差があることを示す($P < 0.05$; Student's t-test)。Scale barは20 μ mを示す。

Table. 1-1. TH2A欠損マウスの遺伝型比

Genotype		Number of analyzed offspring	Genotype ratio of pups (%) [※]			p value by χ^2 test
♀	♂		+ / +	+ / -	- / -	
+ / -	+ / -	328	29.3	44.5	26.2	0.10

※ 生後21日目に解析を行った。

Table. 1-2. TH2A欠損雌マウス由来の仔の遺伝型比

Genotype		Number of analyzed offspring	Genotype ratio of pups (%) [※]			p value by χ^2 test
♀	♂		+ / +	+ / -	- / -	
- / -	+ / -	85	0.0	56.5	43.5	0.23

※ 生後21日目に解析を行った。

第2章

マウス発生における H2A.X の役割

緒言

H2A.X は DNA 修復機構に関与する重要な因子として知られており、H2A 変異体の中で、H2A.X 特異的な SQ モチーフを C-terminal に持つ。SQ モチーフはヒトやマウスなどの哺乳類だけでなく、アフリカツメガエル、ショウジョウバエ、酵母やシロイヌナズナなど幅広い生物種で保存されている (Chambers *et al.*, 2007, Baldi *et al.*, 2013, Friesner *et al.*, 2005)。しかし、ショウジョウバエ、酵母には、H2A.X はなく、ショウジョウバエでは H2A.V、酵母は H2A に SQ モチーフが保存されており、DNA 修復因子として機能している。哺乳類では DNA ダメージが起きると H2A.X の SQ モチーフのセリンがリン酸化 (γ -H2A.X) され、DNA ダメージが起きたゲノム領域に γ -H2A.X が集積する。 γ -H2A.X は DNA 修復因子をゲノム上に誘導し、DNA 修復を促進する (Turinetto *et al.*, 2015)。 γ -H2A.X は、DNA 修復因子の誘導だけでなく、クロマチン構造にも作用することが報告されている。 γ -H2A.X は H2A と比較してヌクレオソームの形成を不安定化させ、さらにリンカーヒストン H1 のクロマチンへの結合を弱める (Li *et al.*, 2010)。これにより、DNA ダメージ領域に緩いクロマチン構造が形成され、より DNA 修復因子の誘導を容易にさせていると考えられている (Turinetto *et al.*, 2015)。

H2A.X は DNA 修復機構の制御だけでなく、他にも様々な機能を持っていることが知られている (Celeste *et al.*, 2002, Chadwick *et al.*, 2005, Banáth *et al.*, 2009)。遺伝子発現制御において H2A.X は正にも負にも機能することが報告されている。H2A.X は γ -H2A.X などの修飾なしにヌクレオソームの不安定化を引き起こすこと、また、締まったクロマチン構造に関与する H3K9me3 の局在領域やテロメアなど締まったクロマチン構造を形成しているゲノム領域には H2A.X の局在量が少ないこと、さらには転写活性が高いゲノム領域に多くの H2A.X が局在することが明らかになっており、H2A.X は緩いクロマチン構造と遺伝子発現の正の制御に関与するものと考えられている (Li *et al.*, 2010, Seo *et al.*, 2014)。一方で、H2A.X は遺伝子発現の抑制にも関与していることが明らかになっている (Wu *et al.*, 2014, Eleuteri *et al.*,

2018)。ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞において H2A.X は分化に関与する転写因子の結合配列に局在することで、その転写因子のゲノムへのアクセスを阻害し、一部の分化関連遺伝子の発現を抑制している (Wu *et al.*, 2014)。また、リボソーム DNA のプロモーター上に H2A.X が局在すると、遺伝子の不活性化に関与するヒストン修飾に関連する酵素群が集積し、リボソーム RNA の発現が抑制されることも明らかになっている (Eleuteri *et al.*, 2018)。この時、H2A.X がクロマチンに取り込まれることによって、締まったクロマチン構造が形成されると考えられている。このように、H2A.X は緩いクロマチン構造にも締まったクロマチン構造にも、また、正と負の遺伝子発現制御にも関与していると考えられている。

哺乳類の細胞において H2A.X は全ヌクレオソームの中で 1~10%を占めているといわれている。過去の研究で H2A.X を欠損したマウスが作製されており、H2A.X を欠損による表現型がいくつか報告されている (Celeste *et al.*, 2002)。この研究では、H2A.X ヘテロ変異マウス間から得られる仔の遺伝型の比率はメンデルの法則に従っており、胚における H2A.X 欠損は胚発生に影響しないことが示唆されている。しかし、H2A.X の欠損は生後の成長に影響があり、マウスの体重が減少する。さらに、H2A.X 欠損雄マウスは生殖細胞の減数分裂の停止により不妊を引き起こすことが報告されているが、H2A.X 欠損による雌マウスの生殖能力への影響は明らかになっていない。また、着床前発生期において、H2A.X は 1 細胞期胚に多く核局在し、発生後期にそれが減少することが明らかにされており (Nashun *et al.*, 2010)、発生初期には母性 H2A.X が多く発現していることが考えられるが、母性 H2A.X の着床前発生への関与については不明である。

以上のように H2A.X の発生への関与は、一部が明らかにされているが未だ十分に解明されていない。この章では、H2A.X 欠損マウスを新たに作製し、マウス発生への H2A.X の役割を明らかにすることとした。

結果

H2A.X 変異マウスの作製

マウス発生への H2A.X の役割を明らかにするため、*H2a.x* 変異マウスを CRISPR/Cas9 系を用いて作製することにした。その結果 H2A.X の Globular domain をコードするゲノム上に 38 塩基対の欠損を持つ *H2a.x* 変異マウスが得られた (Fig. 2-1A, B)。*H2a.x* 変異マウスはフレームシフト変異により H2A.X の Globular domain 以降の蛋白質構造を持たず、変異 H2A.X はクロマチン構造に取り込まれないことが示唆された。*H2a.x* ホモ変異マウスにおける核内の H2A.X の欠損を確認するため、野生型、*H2a.x* ヘテロ変異型と *H2a.x* ホモ変異型マウスで H2A.X が高発現している成長卵を用いて抗 H2A.X 抗体による免疫染色により H2A.X の検出を行った。その結果、野生型と *H2a.x* ヘテロ変異型卵では H2A.X 蛋白質のシグナルを検出することはできたが、*H2a.x* ホモ変異型卵では検出できなかった (Fig. 2-1C)。この実験により、この変異した *H2a.x* を両アレルに持つ個体において H2A.X 蛋白質が欠損することが確かめられた。以降より、H2A.X 蛋白質を欠損する *H2a.x* ホモ変異マウスを H2A.X 欠損マウスと呼ぶこととした。

H2A.X 欠損によるマウス発生への影響

H2A.X 欠損による発生への影響を明らかにするため、雌雄の *H2a.x* ヘテロ変異マウス間の交配を行い、生後 0 日目 (P0) に得られた仔の遺伝型比について解析した。その結果、H2A.X 欠損マウスの出生率は 12.6% であり、発生に影響がしない正常マウスの交配の場合の期待値である 25% に比べて有意に減少していた (Table 2-1)。さらに H2A.X 欠損マウスの体重は野生型マウスと比較して有意に低下していた (Fig. 2-2A)。また、得られた H2A.X 欠損マウスの一部 (16.7%) で眼球を持たない個体が確認された (Fig. 2-2B, C)。次に、生後 0 日目で観察された表現型について、マウスの成長過程で変化するかどうかを明らかにする

性 H2A.X 欠損胚を獲得し、その発生について解析した。その結果、母性 H2A.X 欠損胚の発生率は、コントロールである野生型胚と比較して有意な差はなく、胚盤胞期胚まで発生した (Fig. 2-6)。これらの結果から 1 細胞期胚において母性 H2A.X が多く発現しているにも関わらず、着床前発生に寄与していないことが示唆された。

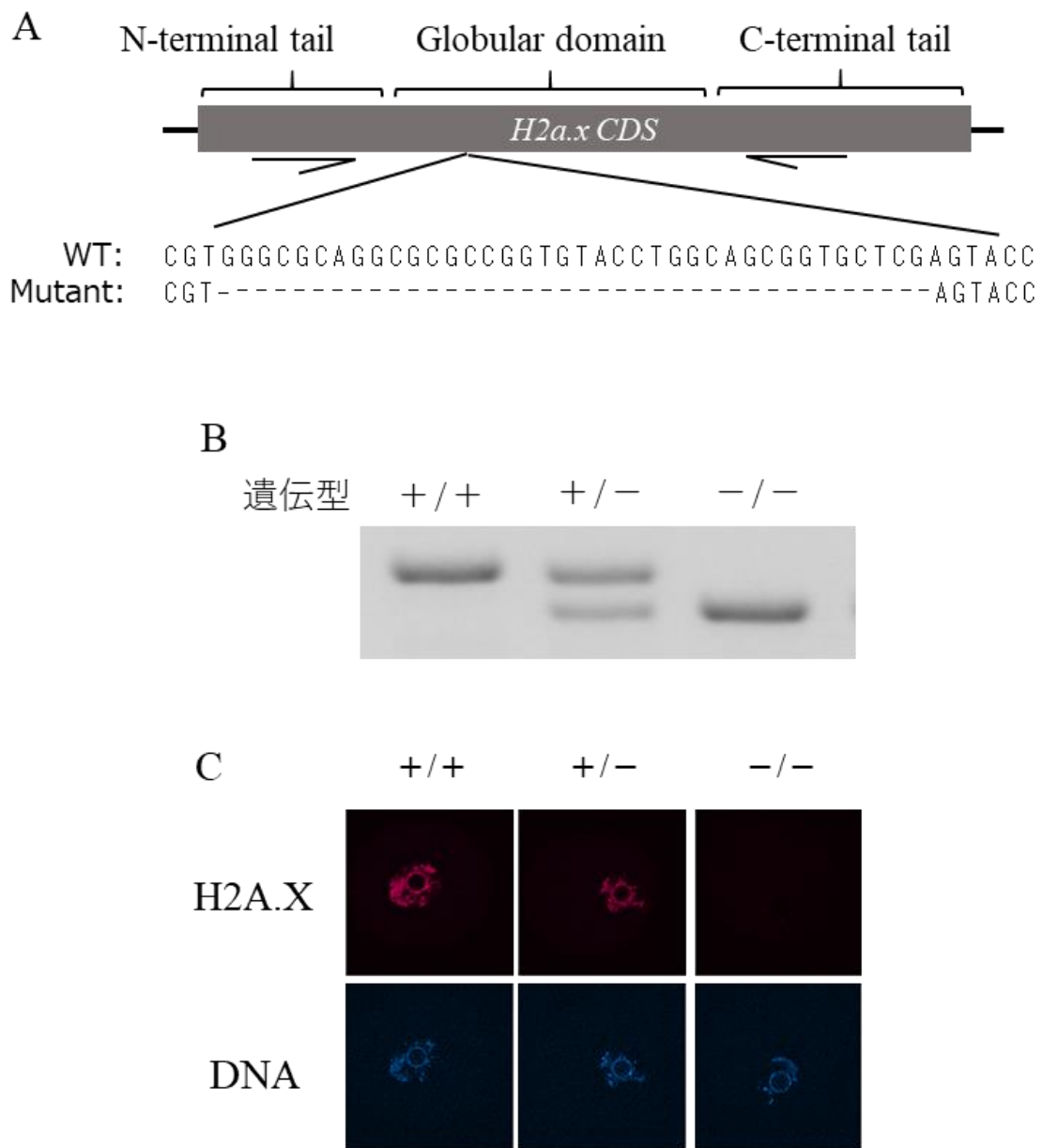


Fig. 2-1. H2A.X 欠損マウスの作製

A) CRISPR/Cas9 系による *H2a.x* 変異マウスの作製。*H2A.X* の Globular domain 上に 38 塩基対の欠損を持つ変異マウスを得た。

B) PCR による遺伝型解析。欠損領域を挟むように設計されたプライマーを用いて PCR を行い。得られた PCR 産物を電気泳動をして、得られたバンドパターンで遺伝型を判定した。

C) *H2a.x* ホモ変異卵における蛋白質レベルでの *H2A.X* の局在の確認。野生型卵(+/+), *H2a.x* ヘテロ変異卵(+/-), *H2a.x* ホモ変異卵(-/-)について、抗 *H2A.X* 抗体を用いて免疫染色より *H2A.X* の検出を行った。DNA は DAPI により染色した。スケールバーは 20 μ m を示す。

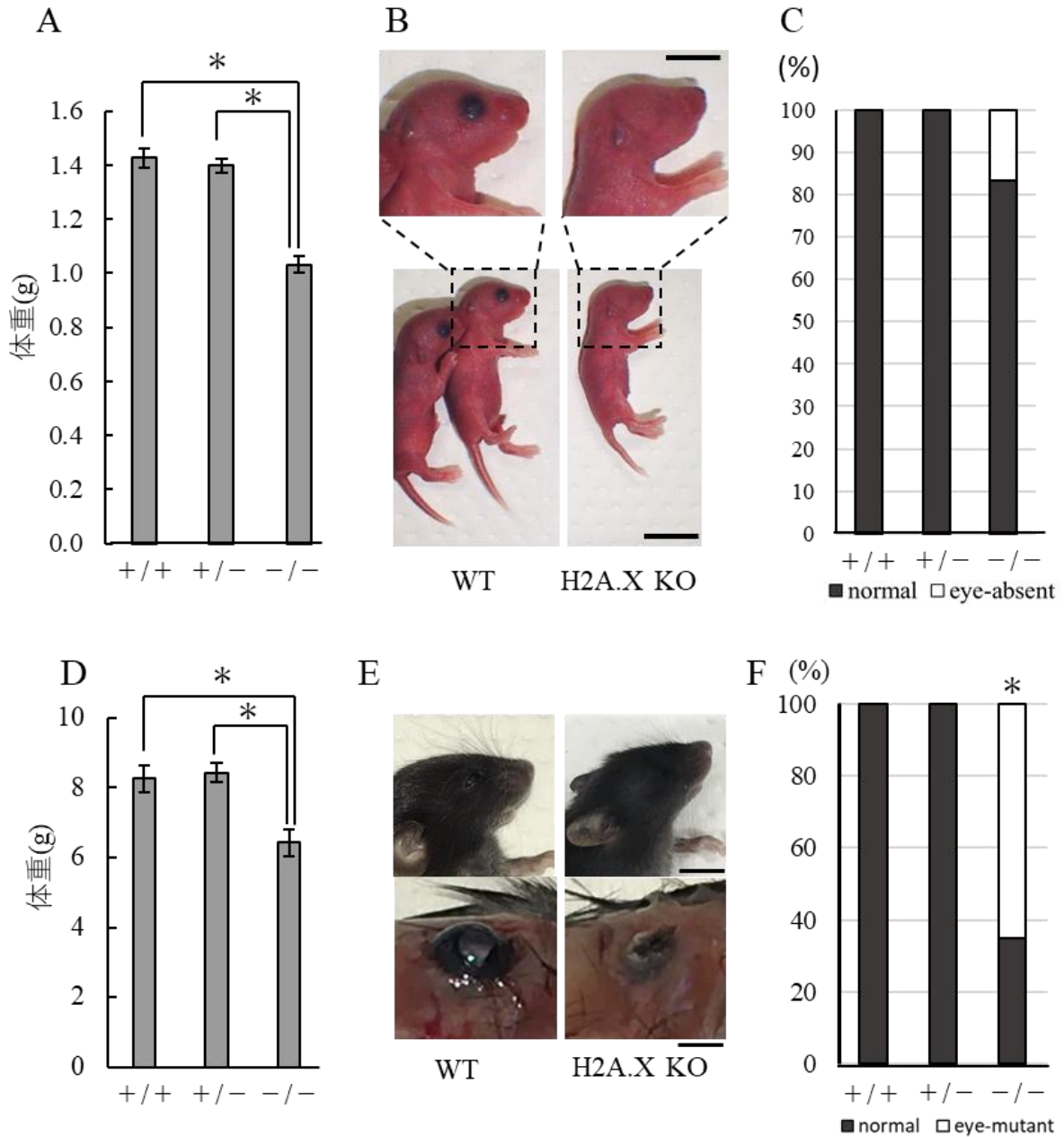


Fig. 2-2. H2A.X 欠損の表現型

A, B, C) 出産直後の表現型。D, E, F) 生後 21 日目の表現型。

A) H2A.X 欠損による体重への影響。野生型(+/+):n=23、*H2a.x* ヘテロ変異マウス(+/-):n=44、H2A.X 欠損マウス(-/-):n=11。*は有意差があることを示す($P < 0.05$; Student's t-test)。エラーバーは S.E.を示す。

B) 野生型(WT)と H2A.X 欠損(H2A.X KO)マウスの写真。上図は下図の点線で囲まれた部分を拡大した図である。上図と下図のスケールバーはそれぞれ 0.5 cm、1 cm を示す。

C) H2A.X 欠損による眼の発生への影響。H2A.X 欠損マウスで眼をない個体をカウントした(+/+:n=15、+/-:n=36、-/-:n=12)。各遺伝型間の眼の欠損個体の存在率の差は Fisher's exact test により検出した。

D) H2A.X 欠損による体重への影響。(+/+:n=25、+/-:n=44、-/-:n=28)。*は有意差があることを示す($P < 0.05$; Student's t-test)。エラーバーは S.E.を示す。

E) WT と H2A.X 欠損(H2A.X KO)マウスの頭部写真。下図は頭部表皮を除去した眼球周辺の撮影図である。上図、下図のスケールバーはそれぞれ 1 cm、0.25 cm を示す。

F) H2A.X 欠損による眼の発生への影響。H2A.X 欠損マウスで眼に異常がある個体をカウントした(+/+:n=26、+/-:n=34、-/-:n=23)。*は有意差があることを示す($P < 0.05$; Fisher's exact test)。

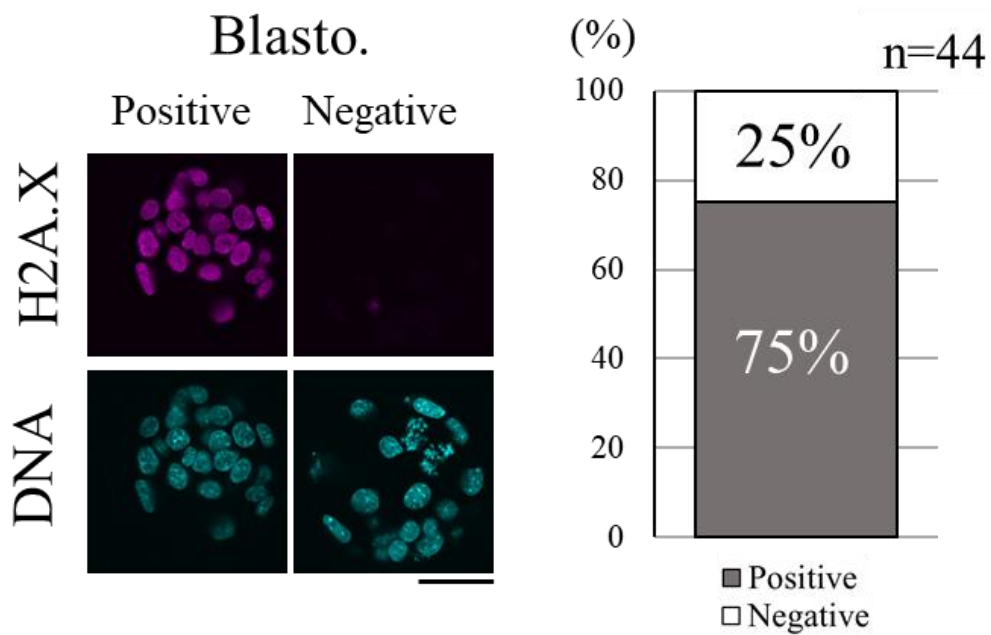


Fig. 2-3. 胚性 H2A.X 欠損による着床前発生への影響

*H2a.x*ヘテロ変異体間由来の胚盤胞期胚におけるH2A.Xの検出。*H2a.x*ヘテロ変異体間由来の胚盤胞期において免疫染色によりH2A.Xの検出を行った。DNAはDAPIにより染色した。スケールバーは40 μm を示す。右グラフは、H2A.Xを検出ができた胚(Positive)とそうでない胚(Negative)の比率を示している。

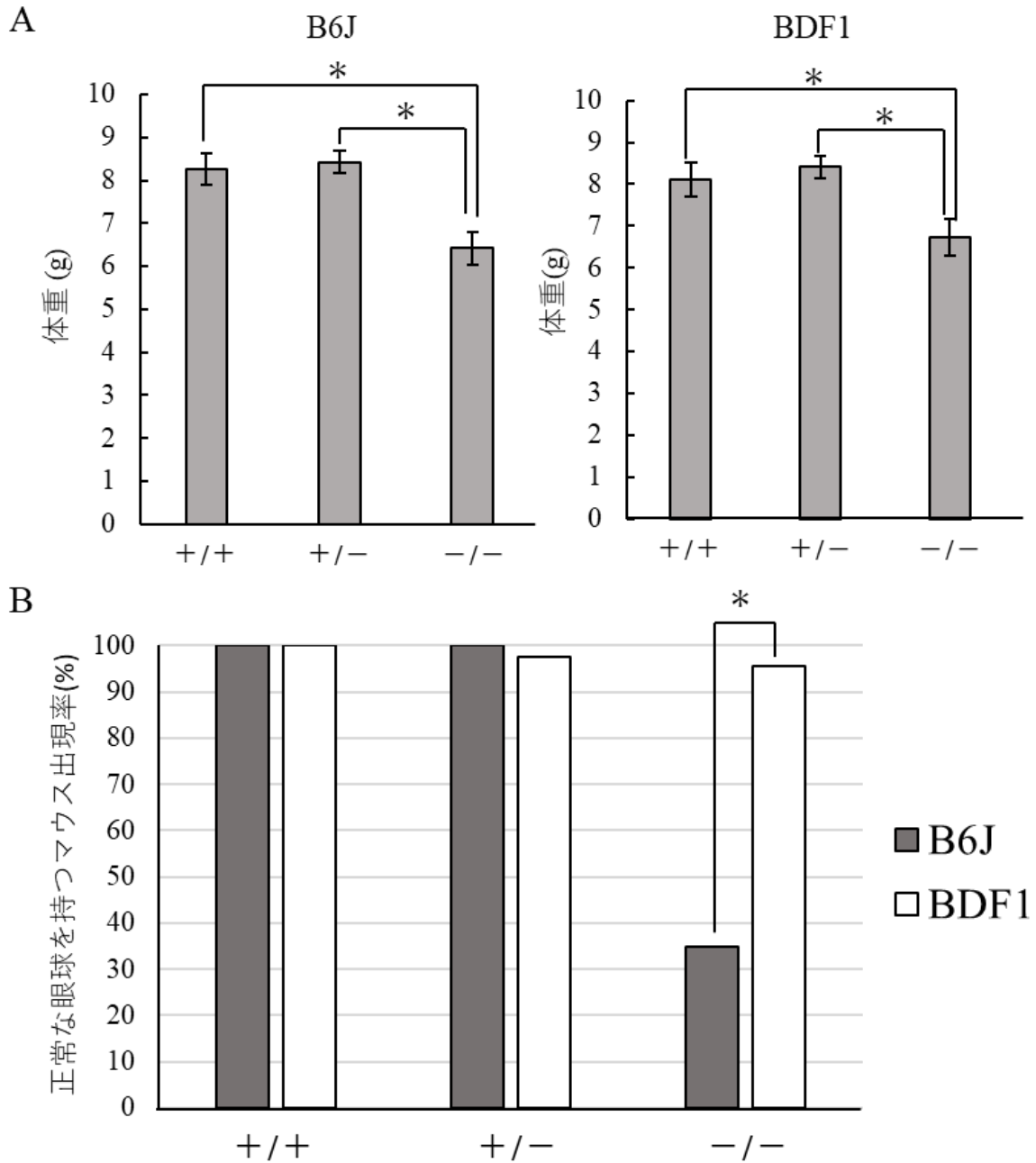


Fig. 2-4. 遺伝背景の違いによる H2A 欠損マウスの表現型の変化

A,B) 野生型マウスは+/+, *H2a.x* ヘテロ変異マウスは+/-、*H2A.X* 欠損マウスは-/-で示す。C57BL/6J(B6J) 遺伝背景またはBDF1 遺伝背景を持つ各遺伝型マウスを用いて解析および比較した。A)異なる遺伝背景を持つマウスにおける *H2A.X* 欠損の体重への影響。左グラフは B6J 遺伝背景における表現型、右グラフは BDF1 遺伝背景における表現型を示す。*は有意差があることを示す ($P < 0.05$; Student's t-test)。エラーバーは S.E.を示す。B6J 遺伝背景 (+/+ : n=25、 +/- : n=44、 -/- : n=28)。BDF1 遺伝背景 (+/+ : n=28、 +/- : n=33、 -/- : n=20)。B)異なる遺伝背景における *H2A.X* 欠損による眼の発達への影響。各遺伝型マウスで正常な眼を持つ個体をカウントした。*は有意差があることを示す ($P < 0.05$; Fisher's exact test)。B6J 遺伝背景 (+/+ : n=26、 +/- : n=34、 -/- : n=23)。BDF1 遺伝背景 (+/+ : n=29、 +/- : n=40、 -/- : n=20)。

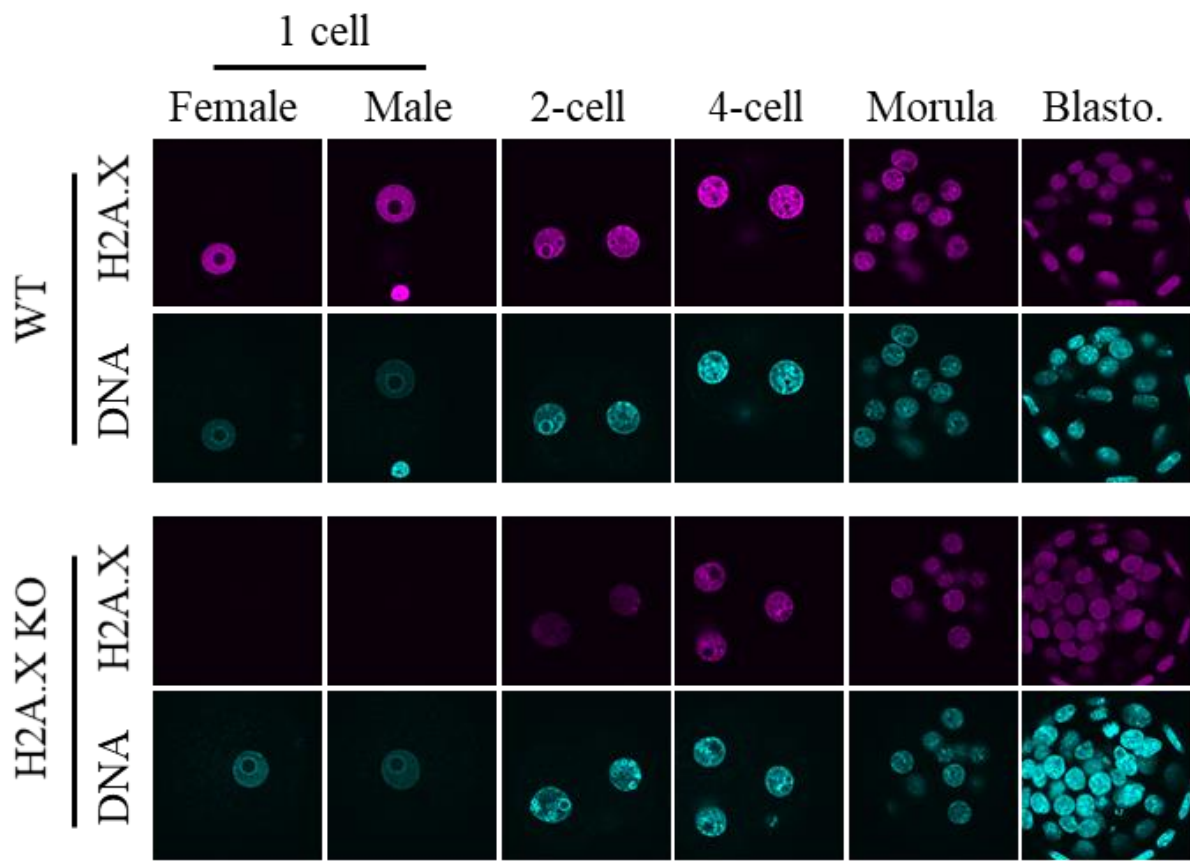


Fig. 2-5. 着床前発生期における胚性 H2A.X の発現

H2A.X 欠損卵由来の着床前初期胚における H2A.X の発現。野生型胚 (WT) と H2A.X 欠損卵由来胚 (H2A.X KO) において免疫染色により H2A.X の検出を行った。DNA は DAPI により染色した。1 細胞期胚は雌性前核 (Female) と雄性前核 (Male) と分けて表す。スケールバーは 40 μm を示す。

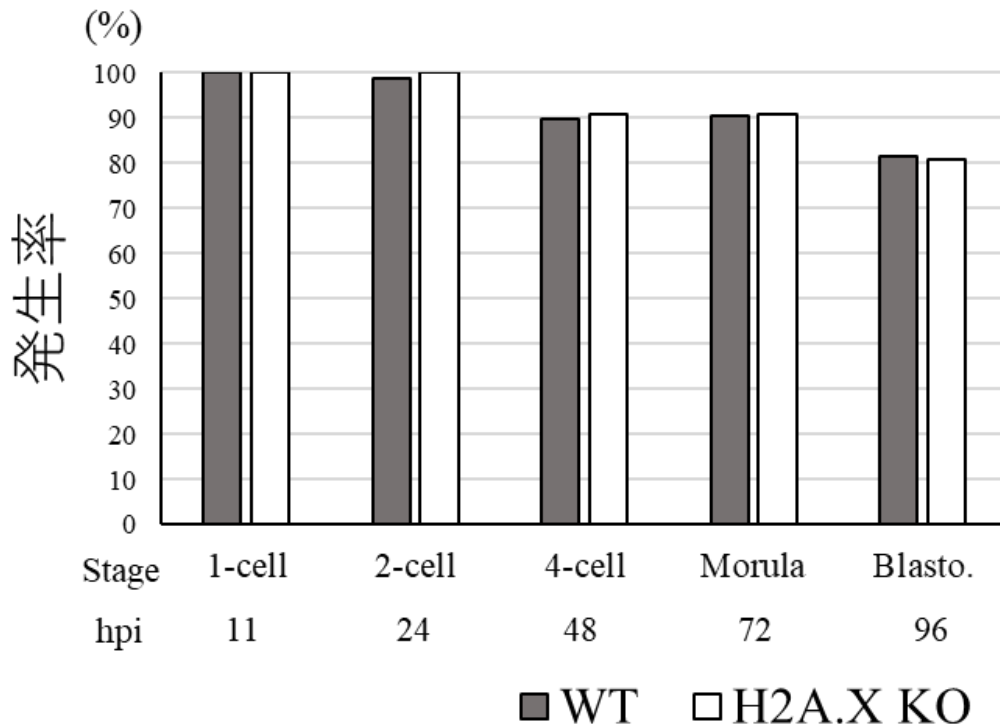


Fig. 2-6: 母性 H2A.X 欠損による着床前発生への影響

母性 H2A.X 欠損胚の発生率。体外受精により得た野生型胚(WT:n=145)、母性 H2A.X 欠損胚(H2A.X KO:n=88)の発生を観察した。媒性後 11、24、48、72、96 時間でそれぞれ 1 細胞期(1-cell)、2 細胞期(2-cell)、4 細胞期(4-cell)、桑実期(Morula)、胚盤胞期(Blasto.)の初期胚の個数をカウントした。独立した実験を 4 回行った。hpi は媒性後時間を示す。野生型胚と母性 H2A.X 欠損胚に発生率の差は χ^2 test により検出したが、いずれの発生時期においても有意差は見られなかった。

Table 2-1. H2A.X欠損マウスの遺伝型比

Genotype of parent		stage	Number of analyzed offspring	Genotype ratio (%)			p value by χ^2 test
♀	♂			+/+	+/-	-/-	
+/-	+/-	0 Day	135	28.9	58.5	12.6 [*]	0.002
		21 Day	235	26.4	65.5	8.1 [*]	4.56E-09

※ 生後0日目と生後21日目のH2A.X欠損マウスの遺伝型比の差を χ^2 -testで検出したが、有意な差はなかった。

胚盤胞期胚

Table 2-2. H2A.X欠損胚の遺伝型比

Genotype of parent		Number of analyzed embryos	Genotype ratio (%)			p value by χ^2 test
♀	♂		+ / +	+ / -	- / -	
+ / -	+ / -	171	29.8	48.0	22.2	0.32

Table 2-3. 遺伝背景の変化に伴う
H2A.X欠損マウスの遺伝型比への影響

	♀ +/− × ♂ +/−	Number of analyzed offspring	Genotyping ratio (%) ^{※3}			p value by χ^2 test
			+/+	+/-	-/-	
Backcross times ^{※1}	1st	65	23.1	63.1	13.8	0.0622
	2nd	32	25.0	56.3	18.8	0.6873
	3rd	128	29.7	52.3	18.0	0.1498
	4th	77	23.4	68.8	7.8	* 0.0007
	5th	87	20.7	71.3	8.0	* 0.0001
	6th	71	36.6	54.9	8.5	* 0.0260
BDF1 ^{※2}		140	27.9	50.7	21.4	0.5527

※1：戻し交配は、BDF1遺伝背景を持つH2A.X変異マウスをB6J系統マウスを用いて交配した。

※2： BDF1遺伝背景H2A.X変異マウスは6度の戻し交配を終えたH2A.X変異マウスとDBA2を交配して得た。

※3： 生後21日目に解析を行った。

*は有意差を示す ($P<0.05$)

第3章

母性 TH2A/母性 H2A.X 両欠損による 着床前発生への影響

序論

マウスの発生において重要な発生イベントの一つである着床前の発生では、様々な変化起きることが知られている。その中でも分化能の変化は代表的である。終末分化を終えた生殖細胞である卵と精子は、接合することで受精卵(1細胞期胚)が生じ、全ての細胞へ分化することができる全能性を獲得する。その後、桑実胚期までに分化能を失い多能性となる。胚盤胞期には初めての明確な分化が起き、胎児に発生する inner cell mass と胎盤への発生する trophoblast の2つの細胞系譜に分化する(Niwa, 2007, Strumpf *et al.*, 2005, Adjaye *et al.*, 2005)。

このような分化能の変化が起きる着床前発生期において、クロマチン構造の緩みが劇的に変化することが知られている。1細胞期胚は最も緩いクロマチン構造を持つが、発生の進行に伴い締まったクロマチン構造を形成し、このクロマチン構造の緩みの変化は着床前発生に重要であると考えられている(Ooga *et al.*, 2016)。過去の研究で、リンカーヒストンの H1 変異体である H1FOO が1細胞期の緩いクロマチン構造に関与していることが明らかにされている(Funaya *et al.*, 2018)。

そして、H2A 変異体では、*in vitro* の実験でクロマチン構造への機能が研究されている(Shinagawa *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2010, Jin and Felsenfeld, 2007, Abbott *et al.*, 2004, Douet *et al.*, 2017)が、着床前発生期においてどのような役割を果たしているかは明らかになっていない。第1章と2章の緒言で記したように H2A 変異体の中でも TH2A と H2A.X はクロマチン構造を緩める機能を持つことが考えられ、1細胞期胚に多く核局在していることから(Shinagawa *et al.*, 2014, Nashun *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2010)、それぞれが着床前発生に関与していることが考えられた。しかし、第1章と第2章において母性 TH2A または母性 H2A.X の欠損による着床前発生への影響について解析した結果、それぞれ単独で欠損しても発生に影響は見られなかった。それぞれを欠損しても着床前発生に影響を与えなかったこと、

そして両者共に緩いクロマチン構造の形成に関与することと1細胞期胚で多く核局在していることを踏まえ、着床前初期胚において TH2A と H2A.X は互いに機能を補助し合っている可能性が考えられた。そこで、TH2A と H2A.X を両方欠損したマウスを作製し、母性 TH2A/母性 H2A.X 両欠損による着床前発生への影響を明らかにすることとした。また、これまでに明らかになっていなかった着床前発生における TH2A と H2A.X のクロマチン構造への関与についても明らかにした。

結果

着床前発生期における H2A 変異体の RNA レベルの発現量

RNA-sequencing 解析のデータ (Abe *et al.*, 2015) を用いて卵および着床前初期胚の H2A 変異体の mRNA レベルを解析した結果、各ステージにおける各 H2A 変異体の発現比は卵から受精後の着床前発生期にかけて大きく変動していた (Fig. 3-1)。卵や発生初期では *Th2a*、次に *H2a.x* の発現量が多いが、発生後期には *H2a* や *Macroh2a* の発現が高くなっている。*H2a.z* の各ステージの発現量は比較的低いが発生後期にかけて増加していた。また、蛋白質レベルでも、TH2A と H2A.X は卵や発生初期に多く核局在しており、H2A、macroH2A、H2A.Z は発生期後期で多く核局在することが明らかになっている (Shinagawa *et al.*, 2014, Nashun *et al.*, 2010)。これらのことから、TH2A と H2A.X は着床前の発生初期において重要な機能を果たしていることが予想された。

母性 TH2A と母性 H2A.X 両欠損による着床前発生への影響

母性 TH2A と母性 H2A.X (母性 TH2A/H2A.X) を両方欠損したことによる着床前発生への影響を明らかにするため、母性 TH2A/H2A.X 両方を欠損した卵と野生型の精子を用いて体外受精を行い、その後の発生について解析した。その結果、母性 H2A.X または母性 TH2A を欠損しても着床前の発生に影響を与えなかったが、母性 TH2A/H2A.X 欠損胚は 2 細胞期より発生の遅延あるいは停止が起き、胚盤胞期には著しく発生率が低下することが分かった (Fig. 3-2)。このように 2 細胞期への発生に影響が出ていることから、母性 TH2A/H2A.X 欠損胚は 1 細胞期ですでに異常が生じていることが示唆された。

母性 TH2A と母性 H2A.X 欠損によるクロマチンの組成への影響

母性 TH2A/H2A.X 欠損が発生異常を引き起こす原因を明らかにするため、まず、各欠損

胚における他のヒストン変異体の核局在を調べた。細胞では様々なヒストン変異体が同時に発現しており、それぞれが互いに置換することでその細胞種に適したクロマチン構造が形成され、また遺伝子発現が制御されている。全ヌクレオソーム中における各ヒストン変異体が占める量には、それぞれのヒストン変異体の発現比が関わっているものと考えられる。このことから、TH2A や H2A.X、またはその両方が欠損した時、それらの細胞のクロマチンの組成は変化していることが予想された。そこで、TH2A と H2A.X が多く核局在する 1 細胞期胚において母性 TH2A 欠損、母性 H2A.X 欠損、母性 TH2A/H2A.X 欠損によるクロマチン組成への影響について解析した。

まず初めに各母性 H2A 変異体を欠損した際に他の H2A 変異体 (TH2A or H2A.X、H2A、macroH2A、H2A.Z) のクロマチンへの局在量に変化を与えるのかどうかについて、免疫染色法により明らかにした。母性 TH2A 欠損胚では、雌雄前核において H2A.X と H2A の核局在量の増加が見られ、macroH2A、H2A.Z は雌性前核でのみ増加していた (Fig. 3-3)。母性 H2A.X 欠損胚では雌性前核において TH2A の核局在量が増加し、雄性前核では H2A.Z が増加していたが、H2A と macroH2A の局在量には影響はなかった (Fig. 3-4)。母性 TH2A/H2A.X 欠損胚では、雌雄前核において H2A の核局在量が減少し、macroH2A と H2A.Z は増加した (Fig. 3-5)。これらの結果から、各母性 H2A 変異体欠損胚では、TH2A や H2A.X、またその両方に代わって、いくつかの他の H2A 変異体がクロマチンに取り込まれていることが示された。

次に、各母性 H2A 変異体を欠損した際に他種類のヒストンである H3 変異体 (H3.1/H3.2 と H3.3) のクロマチンへの局在量に変化を与えるのかどうかについて調べた。その結果、母性 TH2A を欠損しても H3 変異体である H3.1/H3.2 と H3.3 の核局在量は変化なかった (Fig. 3-6)。母性 H2A.X 欠損胚では、H3.1/H3.2 の核局在量が雌性前核においてのみ増加した (Fig. 3-7)。しかし、H3.3 は雌雄前核の両方においてに変化は見られなかった。さらに、母

性 TH2A/H2A.X 欠損胚では雌雄前核において H3.1/H3.2 および H3.3 の核局在量が減少していることが分かった (Fig. 3-8)。この結果から、母性 TH2A または母性 H2A.X を欠損しても H3 変異体の核局在量は減ることはないが、両方の H2A 変異体を欠損すると減少することが示された。そして、母性 TH2A/H2A.X 欠損胚では、H3 変異体の核局在量の減少していたことから、ヌクレオソーム数が減少していることが示唆された。このヌクレオソーム数が減少する原因として、母性 TH2A/H2A.X 欠損胚では DNA 複製の遅延または停止が起き、総 DNA 量が減少していることが考えられた。そこで、母性 TH2A/H2A.X 欠損 1 細胞期胚の後期において DAPI 染色された DNA のシグナルを用いて雌雄前核における DNA 量を定量した。その結果、母性 TH2A/H2A.X 欠損 1 細胞期胚の DNA 量は、野生型、母性 TH2A 欠損、母性 H2A.X 欠損した胚と比較して有意な差は検出されなかった (Fig. 3-9)。この結果、母性 TH2A/H2A.X 欠損胚では DNA 複製は正常に行われており、DNA 量当たりの総ヌクレオソーム数が減少していることが示唆された。母性 TH2A/H2A.X 欠損胚に特異的な表現型として総ヌクレオソーム数の減少が見られ、これが母性 TH2A/H2A.X 欠損胚の発生不良を引き起こした可能性が考えられる。

母性 TH2A と母性 H2A.X 欠損によるクロマチン構造の緩みへの影響

1 細胞期胚において TH2A、H2A.X またはその両方が欠損したことにより、クロマチンにおけるそれぞれのヒストン変異体の含有率に影響があったことからクロマチン構造の緩みに影響がある事が予想された。細胞内のクロマチン構造の緩みを定量する一つの解析方法として FRAP 法がある。FRAP 法の解析では蛍光蛋白質とヒストンの融合蛋白質の蛍光を褪色させた一定時間後の蛍光の回復率をヒストンの交換速度として *mobile fraction* という値で示し、*mobile fraction* の値が高いと緩いクロマチン構造が形成されていると考えられている (Ooga *et al.*, 2016, Gaspar-Maia *et al.*, 2011)。そこで、各母性 H2A 変異体欠損によるクロマチン構

造の緩みへの影響を明らかにするため、EGFP-H2B を用いた FRAP 法による解析を行った。その結果、雌性前核では各母性 H2A 変異体を欠損しても mobile fraction に影響はなかった。雄性前核では母性 TH2A 欠損胚において mobile fraction の影響は見られなかったが、母性 H2A.X と母性 TH2A/H2A.X 欠損胚において mobile fraction の値が減少していた (Fig. 3-10A)。しかし、母性 H2A.X と母性 TH2A/H2A.X 欠損胚の間においては有意な差は認められなかった。この結果から、母性 H2A.X と母性 TH2A/H2A.X 欠損胚の雄性前核では締まったクロマチン構造が形成されることが示唆された。

さらに、ゲノムワイドなクロマチン構造の緩みの指標の一つとして核の大きさがあり、緩いクロマチン構造が形成されると核の大きさが増大することが知られている (Jachowicz *et al.*, 2017, Wang *et al.*, 2018, Douet *et al.*, 2017)。そこで、各母性 H2A 変異体欠損胚における核の大きさについて調べた。その結果、雌性前核では母性 TH2A 欠損胚、母性 H2A.X 欠損胚、母性 TH2A/H2A.X 欠損胚のいずれにおいても核の大きさに変化はなかった。そして、雄性前核では母性 H2A.X と母性 TH2A/H2A.X 欠損胚において核の大きさが減少した (Fig. 3-10B)。この解析においても母性 H2A.X と母性 TH2A/H2A.X 欠損胚の雄性前核では、締まったクロマチン構造が形成されることが示唆され、FRAP 法による解析結果と一致した。

これらの結果から、1 細胞期胚において TH2A はクロマチン構造の緩みに関与しないが、H2A.X はクロマチン構造を緩める機能を持つことが示された。また、母性 TH2A と母性 H2A.X の両方を欠損したことによって、よりクロマチン構造の緩みに影響を与えることはなかった。従って、母性 TH2A/H2A.X 欠損による発生不良は、クロマチン構造の緩みへの影響のみが起因していないことが示唆された。

母性 TH2A と母性 H2A.X 欠損による 1 細胞期胚の転写への影響

各母性 H2A 変異体欠損による 1 細胞期胚における転写への影響を明らかにするため、1

細胞期から発現することが知られている遺伝子の発現量を RT-PCR で解析した。さらに、1細胞期胚では遺伝子領域からの発現だけでなく、レトロトランスポゾンである *MuERV-L* や遺伝子間領域からの転写が起きることが知られており (Abe *et al.*, 2015, Kigami *et al.*, 2003)、それらについても解析した。その結果、各母性 H2A 変異体欠損胚において 1 細胞期胚で発現が開始する *Nid2*、*Mfsd7c*、*Dux* とレトロトランスポゾンの *MuERV-L* の発現量は野生型胚と比較して有意な差はなかった。遺伝子間領域からの転写量は母性 TH2A 欠損胚と母性 TH2A/H2A.X 欠損胚において減少していた (Fig. 3-11)。しかし、母性 TH2A と母性 TH2A/H2A.X 欠損胚の遺伝子間領域からの転写量の間には有意な差は認められなかった。これらの結果から、母性 TH2A は少なくとも 1 細胞期胚で特異的な遺伝子間領域の転写に関与していることが示された。また、母性 TH2A 欠損による転写への影響が観察されたが、母性 TH2A/H2A.X 欠損による特異的な影響は見られなかったことから、母性 TH2A/H2A.X 欠損による発生不良は、遺伝子間領域からの転写への影響のみが起因していないことが示唆された。

考察

TH2A と H2A.X はクロマチン構造を緩める機能を持つと考えられている (Shinagawa *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2010)。また、第 1 章と 2 章で着床前発生期において TH2A と H2A.X は特に 1 細胞期で多く核局在しており、さらに、1 細胞期胚で発現している TH2A と H2A.X のほとんどが母性因子であることが示された (Fig. 1-6, Fig. 2-5)。このことから母性の TH2A と H2A.X は着床前発生とこの時期の緩いクロマチン構造の形成に関与していることが考えられた。しかし、第 1 章と第 2 章で明らかになったように母性 TH2A または母性 H2A.X を単独で欠損しても着床前発生には影響しない (Fig. 1-7, Fig. 2-6)。これらを踏まえ、着床前発生期において母性 TH2A と母性 H2A.X は互いに機能を補償し合っていることが予想され、そのためそれぞれを単独で欠損しても着床前発生に影響してないと考えられた。そこで、本章では、母性 TH2A と母性 H2A.X を両方欠損した時の着床前発生への影響を解析した。その結果、母性 TH2A/母性 H2A.X 両欠損により発生不良が起こることが示された (Fig. 3-2)。

母性 TH2A/母性 H2A.X 両欠損による発生不良の原因

母性 TH2A と母性 H2A.X を両方欠損した時の着床前発生への影響を解析したところ、それぞれ単独の欠損では発生不良を引き起こさなかったが、母性 TH2A/H2A.X 両欠損胚では 2 細胞期より発生不良が起きることが明らかになった (Fig. 3-2)。この発生不良の原因を明らかにするため、母性 TH2A、母性 H2A.X、またはその両方を欠損した時、1 細胞期でどのような変化が起きているのかについて解析した。その結果、母性 TH2A/母性 H2A.X 欠損胚では、総ヌクレオソーム数が減少している可能性が示された (Fig. 3-8)。さらに、クロマチン構造の緩みと遺伝子発現への影響の解析では、母性 TH2A が欠損してもクロマチン構造の緩みへの影響は観察されなかったが、遺伝子間領域からの転写が抑制された。一方で、母性 H2A.X が欠損すると締まったクロマチン構造が形成されたが、遺伝子発現の変化を検出す

ることはできなかった (Fig. 3-10,11)。さらに、クロマチン構造の緩みと遺伝子発現への影響において、母性 TH2A と母性 H2A.X 両欠損胚に特異的な異常は観察されなかった。

以上の結果より、TH2A は遺伝子間領域の転写に、H2A.X はクロマチン構造の緩みに関与し、それぞれ異なる作用を持つことが示されたことから、1 細胞期胚において TH2A と H2A.X は必ずしも互いに機能を補償しているわけではないことが示唆された。また、母性 TH2A と母性 H2A.X の両方が欠損することにより、1 細胞期胚において総ヌクレオソーム数が減少することが示された。これらのことから母性 TH2A/H2A.X 欠損胚の発生不良は、母性 TH2A 欠損によるクロマチン構造の緩みの変化を伴わない転写への影響と母性 H2A.X 欠損によるクロマチン構造の緩みへの影響が重なったこと、もしくは総ヌクレオソーム数が減少したことが引き起こされたものと考えられた。

着床前初期胚における TH2A と H2A.X の機能

過去の研究で TH2A と H2B 変異体である TH2B を過剰発現させた培養細胞では、緩いクロマチン構造が形成されることや、ヌクレオソーム内において TH2A とヒストン H3、H4、そして DNA の間で形成される水素結合の数が H2A と比較して少ないことから、TH2A は緩いクロマチン構造の形成に関与していることが示唆されている (Shinagawa *et al.*, 2014)。そして、緩いクロマチン構造を持つ 1 細胞期の核には TH2A は多く局在している (Shinagawa *et al.*, 2014)。これらの事から TH2A は 1 細胞期胚の緩いクロマチン構造の形成に関与していることが考えられた。本研究で、FRAP 法を用いて TH2A を欠損した 1 細胞期胚におけるグローバルなクロマチン構造の緩みについて解析した結果、TH2A 欠損ではクロマチン構造の緩みに影響は見られなかった (Fig. 3-10)。しかし、遺伝子発現の解析では TH2A を欠損した胚では遺伝子間領域からの転写が抑制されていたことから、まず、TH2A は局所的なクロマチン構造の緩みに関与していることが考えられた。さらに、FRAP 法はクロマチン内でのヒス

トンの交換速度を観察する手法であり、あくまでもクロマチン構造の状態の 1 つの側面を見ているに過ぎず、FRAP 法では検出できないクロマチン構造の緩みの状態に TH2A は作用しているかもしれない。今後、塩析法 (Hayakawa *et al.*, 2018)、あるいは DNase I sensitivity assay (Cho *et al.*, 2002) など他のクロマチン構造の緩みの解析を行う必要がある。また、TH2A が欠損した時にクロマチン構造の緩みの影響を検出できなかったもう一つ可能性として、TH2B の存在が関係すると考えられる。TH2A と TH2B は遺伝子発現制御領域を共有しており、同時に発現することが考えられている (Huh *et al.*, 1991, Shinagawa *et al.*, 2014)。そして TH2A と TH2B の両方を欠損した時にのみに影響が表れることが過去の研究と本研究で分かった。例えば、TH2A と TH2B を欠損した時、雄の不妊や着床前の発生不良が引き起こされることが明らかになっている (Shinagawa *et al.*, 2014, Shinagawa *et al.*, 2015) が、TH2A (Fig. 1-2, Fig. 1-7) や TH2B (Montellier *et al.*, 2013) をそれぞれ単独で欠損しても雄の不妊や着床前の発生不良は起きない。これらの事から、TH2A と TH2B は似た性質を持ち、TH2A と TH2B が発現している細胞では互いに補償できる関係性であると考えられる。そのため、TH2A が欠損してもグローバルなクロマチン構造の緩みの影響は観察されなかったかもしれない。

H2A.X については、H2A.X を含むヌクレオソームは不安定化することや、リンカーヒストン H1 との相互作用が H2A と比較して弱いことから、H2A.X も緩いクロマチン構造の形成にしていることが示唆されている (Li *et al.*, 2010)。そして、緩いクロマチン構造を持つ 1 細胞期の核には H2A.X は多く局在していること (Nashun *et al.*, 2010)、さらには、クロマチン構造が緩い状態にあると考えられる転写活性化領域に H2A.X が多く局在していることが明らかとなっている (Seo *et al.*, 2014, Yukawa *et al.*, 2014)。これらの事から H2A.X は 1 細胞期胚の緩いクロマチン構造の形成に関与していることが考えられたため、H2A.X を欠損した 1 細胞期胚におけるクロマチン構造の緩みについて解析した。その結果、H2A.X 欠損では雄性前核

で締まったクロマチン構造が形成されることが分かり、1 細胞期胚の緩いクロマチン構造には H2A.X が関与していることが示された (Fig. 3-10)。

H2A.X は 1 細胞期胚の両前核にて核局在しているにも関わらず、本研究では H2A.X は雄性前核の緩いクロマチン構造の形成に関与していることが示された。1 細胞期胚の雌雄前核に局在する H2A.X の量は、雌性前核より雄性前核の方が僅かに多く、また、1 細胞期胚において H2A.X が欠損した時、雄性前核でのみ H2A.Z の局在量が増加したことが明らかになった (Fig. 3-4)。H2A.Z は緩いクロマチン構造にも締まったクロマチン構造にも関与し、または細胞種や遺伝子によって H2A.Z と遺伝子の活性の相関は異なることが知られている (Jin and Felsenfeld, 2007, Millar, 2013)。また、緩いクロマチン構造が形成されている着床前の発生初期では H2A.Z の核局在量は低く、締まったクロマチン構造が形成される発生後期にはその核局在量は増加することが明らかになっており (Nashun *et al.*, 2010, Bošković *et al.*, 2012)、H2A.Z は着床前発生において締まったクロマチン構造に関与しているのではないかと考えられる。これらのことから雄性前核で多く局在する H2A.X が欠損し、H2A.Z の局在量が増加したことが雄性前核の締まったクロマチン構造の形成に繋がったと考えられる。また、H2A.X 欠損した 1 細胞期胚では締まったクロマチン構造が形成されることが示されたが、*Nid2*、*Mfsd7c*、*Dux*、*MuERV-L* の発現量や遺伝子間領域の転写量への影響は検出できなかった (Fig. 3-11)。しかし、本研究で発現解析した遺伝子数は少なく、真に H2A.X の欠損が遺伝子発現に影響を与えてないのかは不明である。また、TH2A の欠損は遺伝子間領域からの転写に影響を与えることしか分からなかった。今後の研究で、TH2A または H2A.X 欠損胚における大規模な遺伝子発現解析を行い、着床前初期胚の遺伝子発現に対する TH2A と H2A.X の寄与について明らかにしていく必要がある。

1 細胞期における H2A 変異体間の補償性

細胞では様々なヒストン変異体が同時に発現しており、それぞれが互いに置換することでその細胞種に適したクロマチン構造が形成されると考えられている。ヒストン変異体間ではヌクレオソーム数などのクロマチン構造の状態の維持などの補償性が存在すると思われる。例えば、数種類の変異体が存在するリンカーヒストン H1 変異体では、どれか 1 つが欠如してもヌクレオソーム当たりの H1 の局在量を維持するように他の H1 変異体の局在量が増加しクロマチン構造を維持することが報告されており、また H1c、H1d と H1e の 3 つの H1 変異体が欠損することで初めて胚性致死が引き起こされることが分かっている (Fan *et al.*, 2003)。

本研究では、TH2A または H2A.X を欠損した 1 細胞期胚における H3 変異体である H3.1/H3.2 と H3.3 の核局在量と DNA 量の変化を解析し、総ヌクレオソーム数への影響について解析した。その結果、TH2A 欠損胚で H3 変異体の核局在量と DNA 量に影響はなく (Fig. 3-6、Fig. 3-9)、総ヌクレオソーム数に影響がないことが示された。一方で H2A.X 欠損胚では H3.1/H3.2 の局在量が増加することが分かった (Fig. 3-7)。しかし、1 細胞期胚において H3.1/H3.2 の核局在量は非常に少ないこと (Funaya *et al.*, 2017) が言われており、また、H2A.X 欠損胚における H3.3 の核局在量は微量に減少していること (Fig. 3-7) から H2A.X 欠損胚でも総ヌクレオソーム数はほとんど変化していないと考えられる。

総ヌクレオソーム数が変化しない TH2A または H2A.X を欠損した 1 細胞期胚における他の H2A 変異体の核局在量の変化について解析した結果、TH2A 欠損胚では、H2A.X と H2A、microH2A、H2A.Z の核局在量が増加していた (Fig. 3-3)。一方で、H2A.X 欠損胚では TH2A と H2A.Z の核局在量が増加していたが、H2A と macroH2A の局在量には影響はなかった (Fig. 3-4)。このことから TH2A または H2A.X が欠損した際に、欠損した H2A 変異体を補完する他の H2A 変異体の種類が異なることが明らかになった。1 細胞期胚で TH2A または H2A.X の補完する H2A 変異体の種類が異なるのは、TH2A と H2A.X の発現量の

違いから生み出された可能性が考えられる。RNA-sequencing 解析のデータ (Abe *et al.*, 2015) を用いて卵および着床前初期胚の H2A 変異体の mRNA レベルを解析した結果、卵や発生初期では *Th2a*、次に *H2a.x* の発現量が多いが、発生後期には *H2a* や *Macroh2a* の発現が高くなっている。そして、卵や 1 細胞期胚における *Th2a* mRNA 量は *H2a.x* mRNA 量の 3~4 倍程あること (Fig. 3-1) から、蛋白質量でも TH2A の方が多いことが予想される。そのため TH2A が欠損した時、クロマチンに H2A 変異体が局在できる余白が多く生じ H2A.X、H2A、macroH2A、H2A.Z とほぼすべての H2A 変異体の局在量が増加し、一方で H2A.X が欠損した時はクロマチンにおける H2A 変異体が局在できる余白が少なく TH2A や H2A.Z のみが局在量を増加させたと考えられる。

TH2A や H2A.X を欠損した時に他の H2A 変異体は核局在量を増加させ、総ヌクレオソーム数を維持させたが、H2A 変異体はそれぞれクロマチン構造や遺伝子発現の制御において異なる機能を持つことが知られており、TH2A や H2A.X を欠損した時に総ヌクレオソーム数が変化しなくても、必ずしもクロマチン構造や遺伝子発現に影響しないとは限らない。実際に、H2A.X 欠損胚では締まったクロマチン構造が形成され (Fig. 3-10)、TH2A 欠損胚では遺伝子間領域の転写が抑制された (Fig. 3-11)。1 細胞期胚では総ヌクレオソーム数の側面では TH2A や H2A.X の代わりに他の H2A 変異体が補償したが、クロマチン構造の緩みや遺伝子発現の側面では補償は不十分であったと考えられる。また、TH2A/H2A.X 両欠損胚では、H3 変異体の局在量が減少し総ヌクレオソーム数が減少したこと (Fig. 3-8) から、他 H2A 変異体の総ヌクレオソーム数の補償性には限界があり、これが発生不良の原因になったことが考えられる。

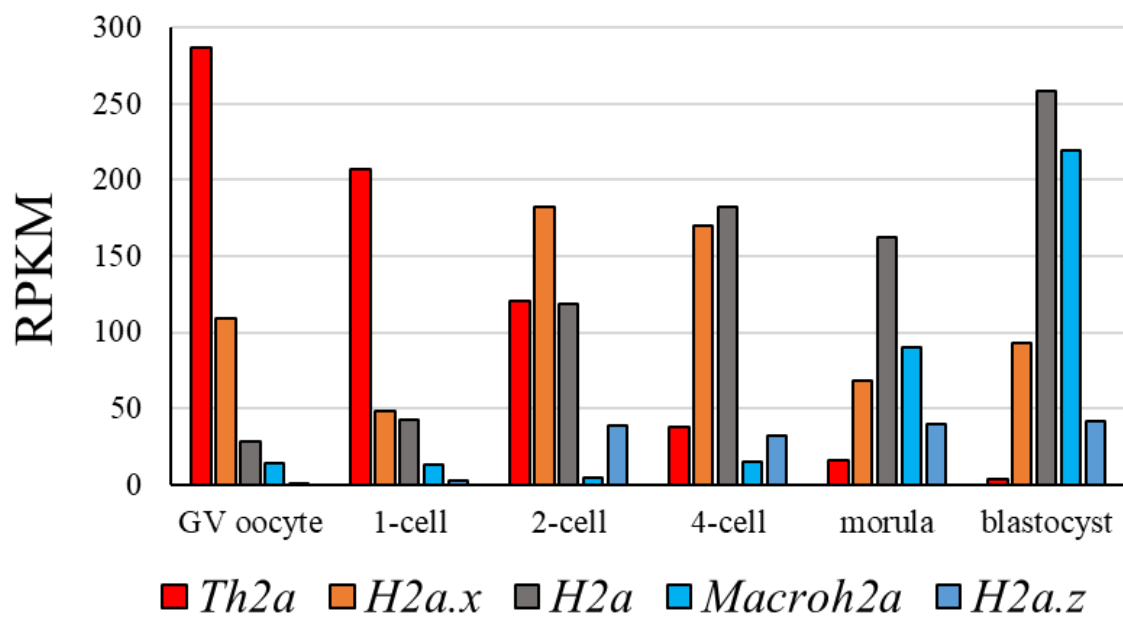


Fig. 3-1. 卵および着床前初期胚における H2A 変異体 mRNA レベル

RNA-sequencing のデータを用いて各 H2A 変異体 (*Th2a*, *H2a.x*, *H2a*, *Macroh2a*, *H2a.z*) の mRNA レベルの各ステージの発現量を解析した。解析したステージは成長卵 (GV oocyte)、1 細胞期胚 (1-cell)、2 細胞期胚 (2-cell)、4 細胞期胚 (4-cell)、桑実期胚 (morula)、胚盤胞期胚 (blastocyst) である。

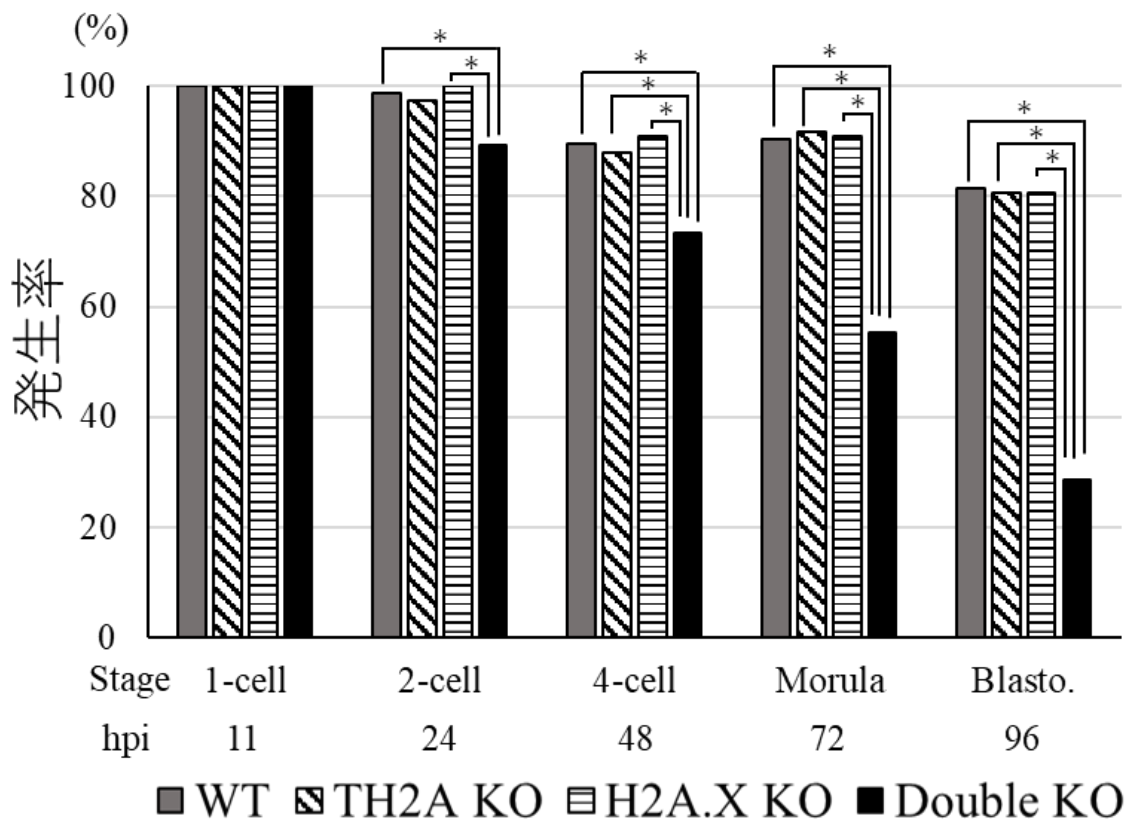


Fig. 3-2. TH2A および H2A.X の欠損による着床前発生への影響

体外受精により得た野生型胚(WT:n=145)、母性 TH2A 欠損胚 (TH2A KO:n=108)、母性 H2A.X 欠損胚 (H2A.X KO:n=88)、母性 TH2A および H2A.X 両欠損胚 (Double KO:n=94) の発生を観察した。媒性後 11、24、48、72、96 時間でそれぞれ 1 細胞期(1-cell)、2 細胞期(2-cell)、4 細胞期(4-cell)、桑実期 (Morula)、胚盤胞期(Blasto.)に発生した胚の数をカウントした。独立した実験を 3 回行い、それらの結果をまとめた。hpi は媒性後の時間を示す。エラーバーは S.E.を示す。* は有意差があることを示す ($P < 0.05$; χ^2 test)。

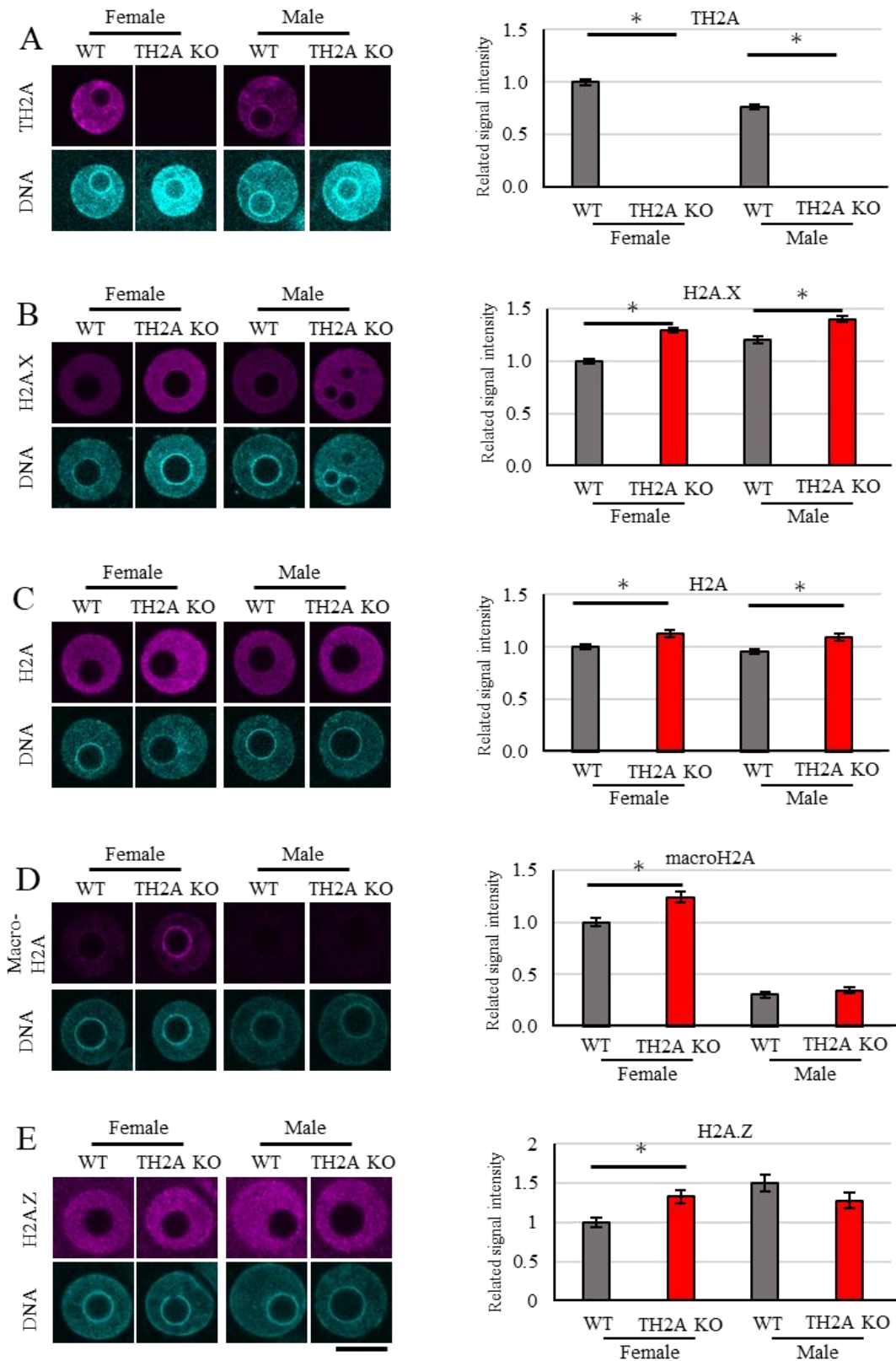


Fig. 3-3. TH2A 欠損胚における各 H2A 変異体の核局在量への影響

TH2A 欠損 1 細胞期胚において各 H2A 変異体: A) TH2A, B) H2A.X, C) H2A, D) macroH2A, E) H2A.Z を免疫染色法により検出した。DNA は DAPI により染色した。右グラフは雌性前核 (Female) と雄性前核 (Male) の H2A 変異体のシグナルを定量したものである。独立した実験を 3 回行い、各実験で 8 個以上の胚を用いた。エラーバーは S.E.を示す。* は有意差があることを示す ($P < 0.05$; Student's t-test)。Scale bar は 20 μ m を示す。

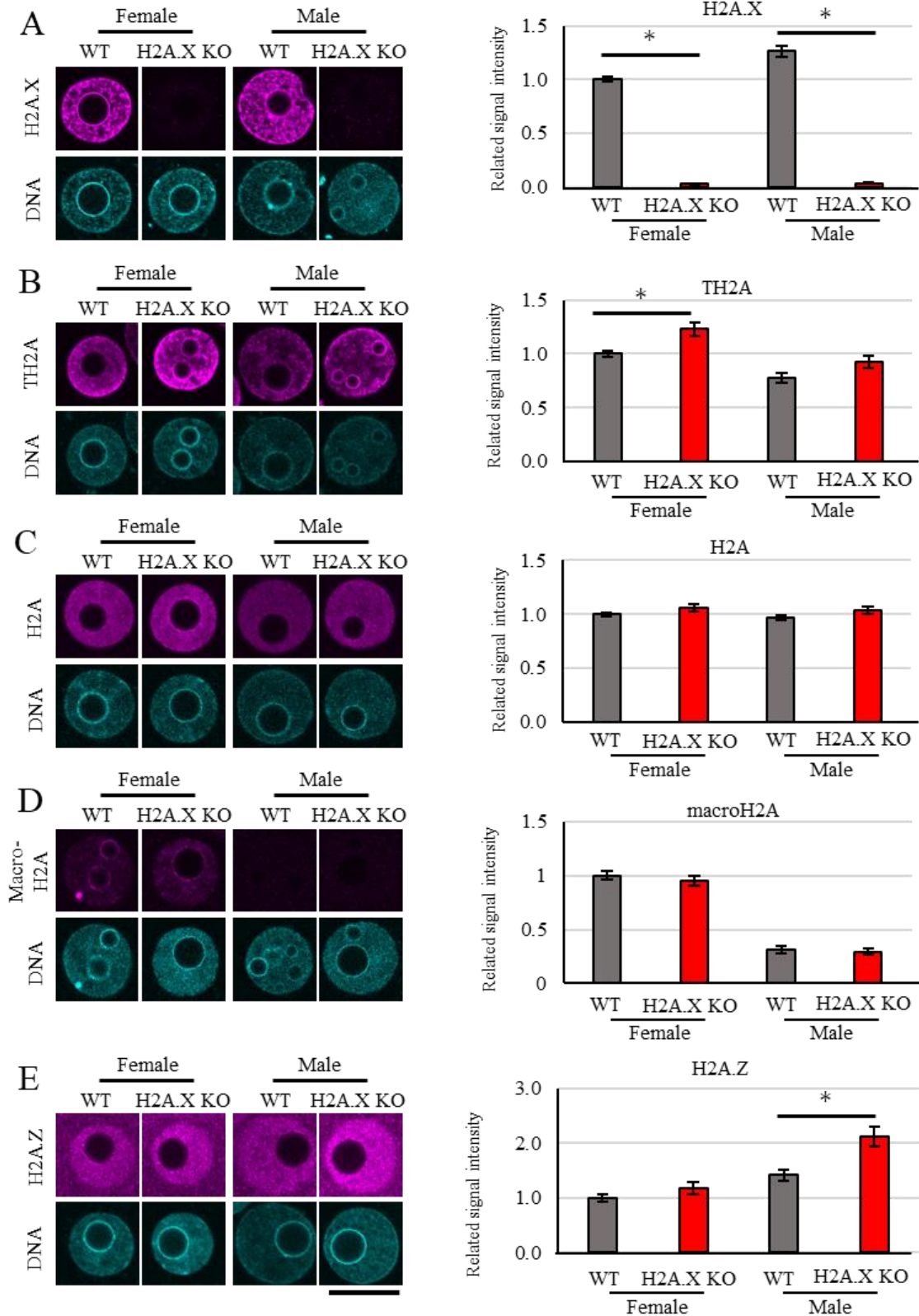


Fig. 3-4. H2A.X 欠損胚による各 H2A 変異体の核局在量への影響

H2A.X 欠損 1 細胞期胚において各 H2A 変異体: A) H2A.X, B) TH2A, C) H2A, D) macroH2A, E) H2A.Z を免疫染色法により検出した。DNA は DAPI により染色した。右グラフは雌性前核 (Female) と雄性前核 (Male) の H2A 変異体のシグナルを定量したものである。独立した実験を 3 回行い、各実験で 8 個以上の胚を用いた。エラーバーは S.E.を示す。* は有意差があることを示す ($P < 0.05$; Student's t-test)。Scale bar は 20 μm を示す。

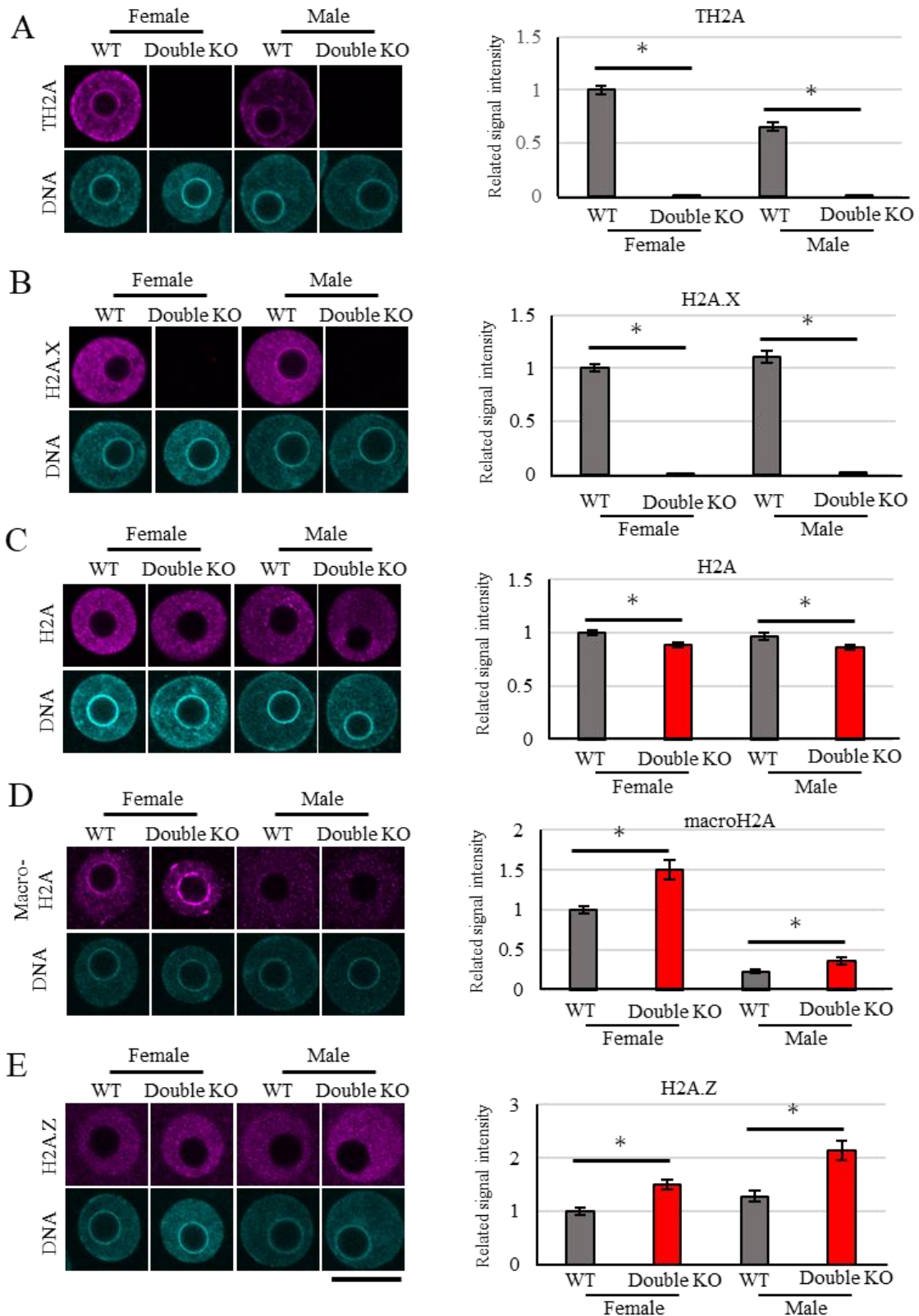


Fig. 3-5. TH2A/H2A.X 両欠損胚による各 H2A 変異体の核局在量への影響

TH2A/H2A.X 両欠損 (Double KO) 1 細胞期胚において各 H2A 変異体: A) H2A.X, B) TH2A, C) H2A, D) macroH2A, E) H2A.Z を免疫染色法により検出した。DNA は DAPI により染色した。右グラフは雌性前核 (Female) と雄性前核 (Male) の H2A 変異体のシグナルを定量したものである。独立した実験を 3 回行い、各実験で 8 個以上の胚を用いた。エラーバーは S.E.を示す。* は有意差があることを示す ($P < 0.05$; Student's t-test)。Scale bar は 20 μm を示す。

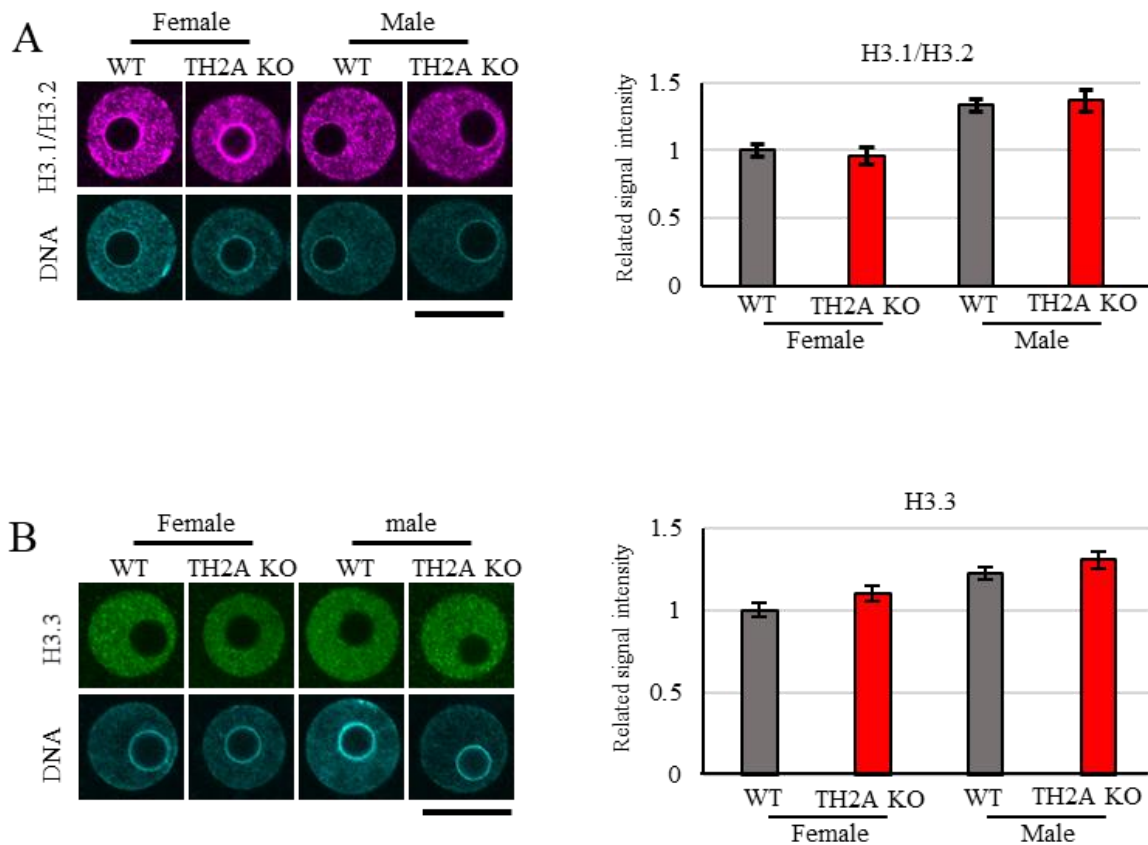


Fig. 3-6. TH2A 欠損胚による各 H3 変異体 H3.1/H3.2 の核局在量への影響

TH2A 欠損 1 細胞期胚において A) H3.1/H3.2, B) H3.3 を免疫染色法により検出した。DNA は DAPI により染色した。右グラフは雌性前核 (Female) と雄性前核 (Male) の H2A 変異体のシグナルを定量したものである。独立した実験を 3 回行い、各実験で 8 個以上の胚を用いた。エラーバーは S.E.を示す。* は有意差があることを示す ($P < 0.05$; Student's t-test)。Scale bar は 20 μm を示す。

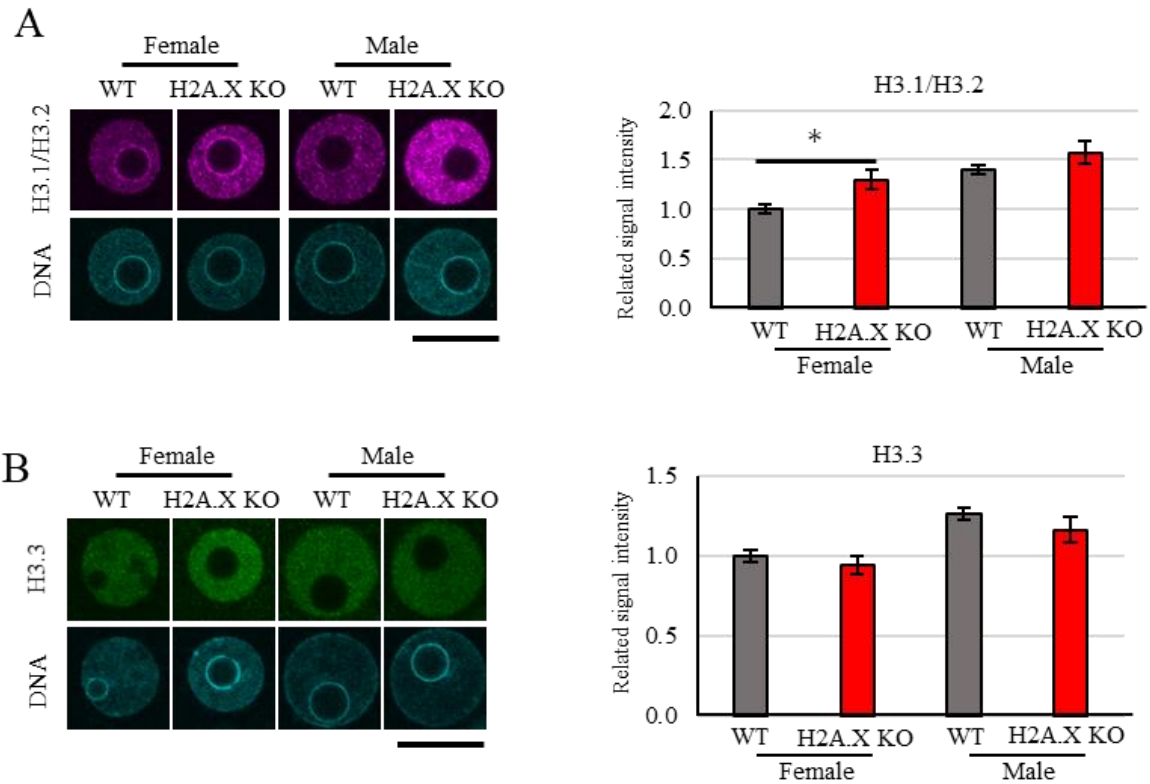


Fig. 3-7. H2A.X 欠損胚による各 H3 変異体 H3.1/H3.2 の核局在量への影響
H2A.X 欠損 1 細胞期胚において A) H3.1/H3.2、B) H3.3 を免疫染色法により検出した。DNA は DAPI により染色した。右グラフは雌性前核 (Female) と雄性前核 (Male) の H2A 変異体のシグナルを定量したものである。独立した実験を 3 回行い、各実験で 8 個以上の胚を用いた。エラーバーは S.E.を示す。* は有意差があることを示す ($P < 0.05$; Student's t-test)。Scale bar は 20 μm を示す。

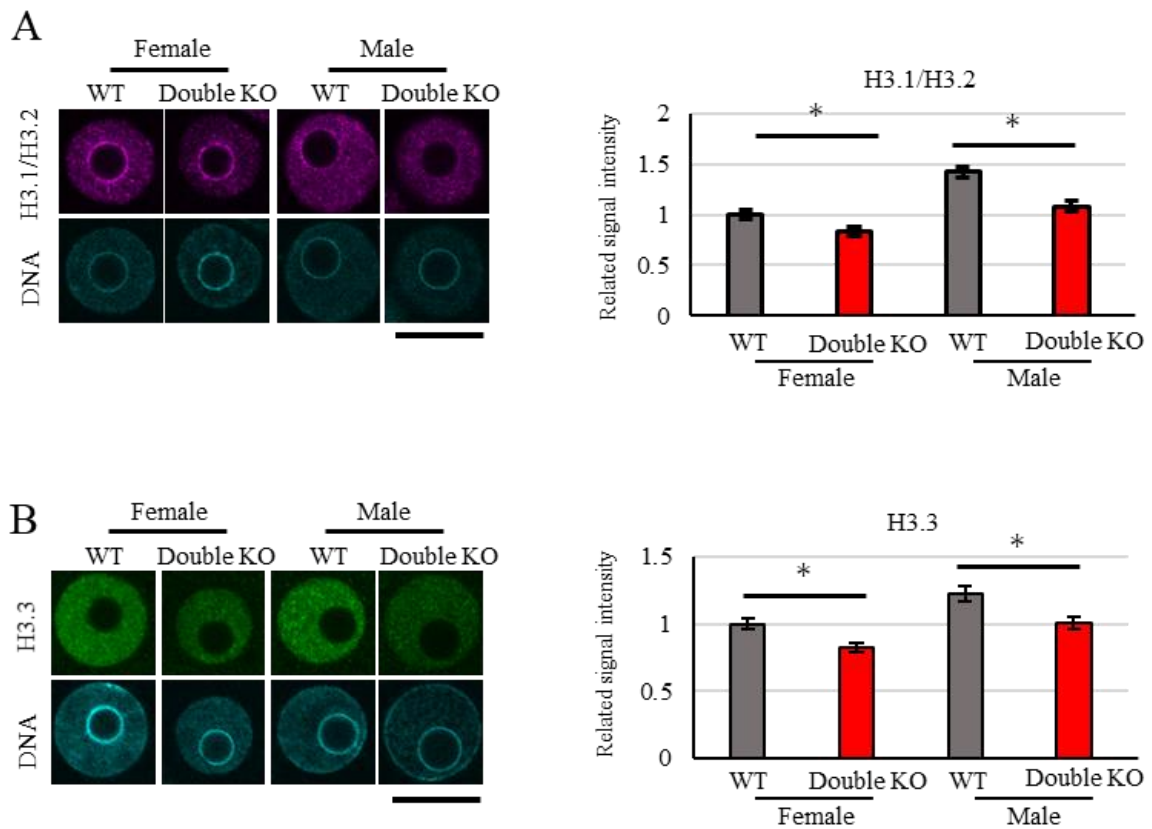


Fig. 3-8. TH2A/H2A.X 両欠損胚による各 H3 変異体 H3.1/H3.2 の核局在量への影響

TH2A/H2A.X 両欠損胚において A) H3.1/H3.2, B) H3.3 を免疫染色法により検出した。DNA は DAPI により染色した。右グラフは雌性前核 (Female) と雄性前核 (Male) の H2A 変異体のシグナルを定量したものである。独立した実験を 3 回行い、各実験で 8 個以上の胚を用いた。エラーバーは S.E.を示す。* は有意差があることを示す ($P < 0.05$; Student's t-test)。Scale bar は 20 μm を示す。

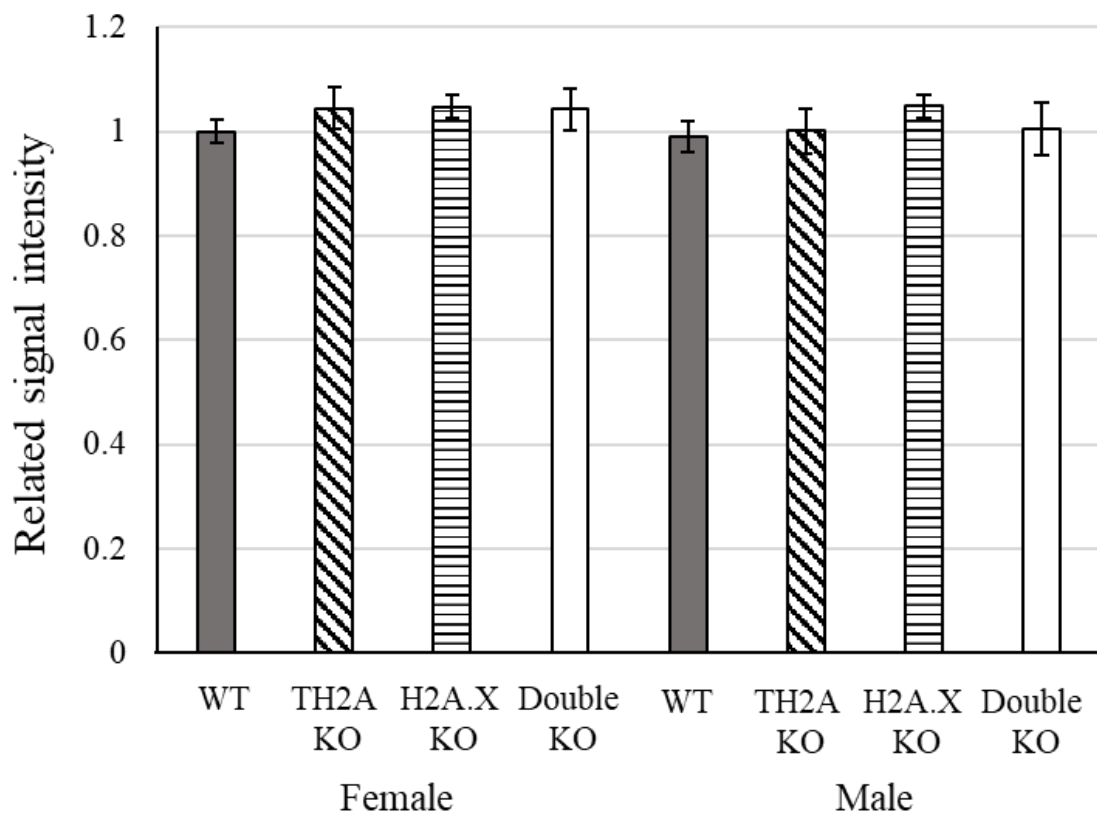


Fig. 3-9. TH2A, H2A.X または TH2A/H2A.X 両欠損による 1 細胞期胚における DNA 量への影響

野生型(WT)、母性 TH2A 欠損 (TH2A KO)、母性 H2A.X 欠損 (H2A.X)、母性 TH2A/H2A.X 欠損 (Double KO) 胚を固定し、DNA を DAPI で染色して雌性前核 (Female) と雄性前核 (Male) それぞれでシグナルを定量した。野生型の雌性前核の値を 1 とした。独立した実験を 5 回行い、各実験において 8 個以上の初期胚を解析した。各群間の差は Student's t-test より検出した。エラーバーは S.E.を示す。

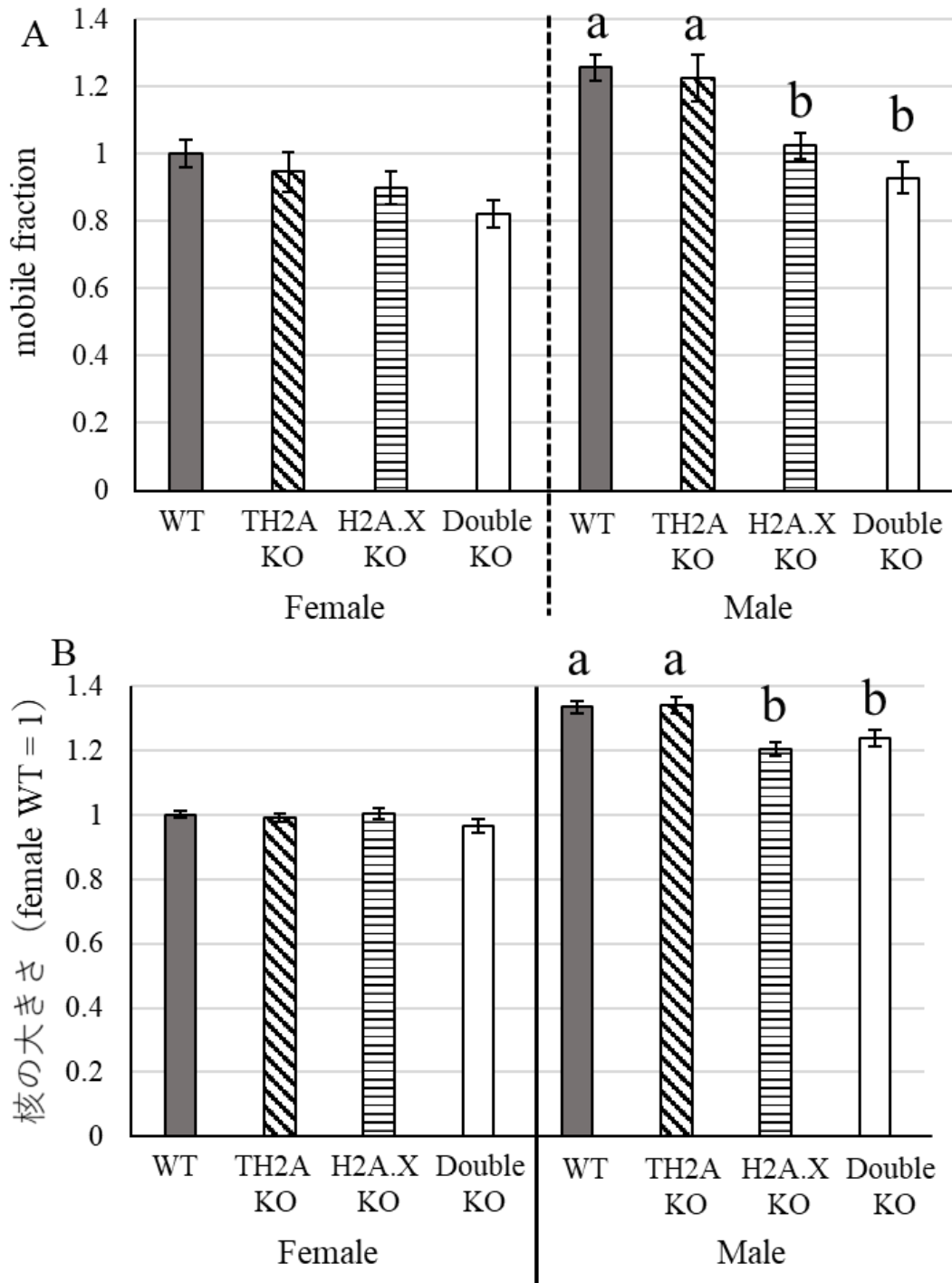


Fig. 3-10. 1 細胞期胚における母性 H2A 変異体欠損によるクロマチン構造の緩みへの影響

A,B) 受精後 11 時間後の野生型 (WT)、母性 TH2A 欠損 (TH2A KO)、母性 H2A.X 欠損 (H2A.X KO)、母性 TH2A/H2A.X 欠損 (Double KO) 胚を用いて解析した。Female は雌性前核、Male は雄性前核を示す。各値の差は Tukey-Kramer 法により検出した。異なる文字は有意差があることを示す ($P < 0.05$)。エラーバーは S.E.を示す。

A) FRAP 法による母性 H2A 変異体欠損胚のクロマチン構造の緩みの解析。各 1 細胞期胚のクロマチン構造の緩みの度合いを、FRAP 法における mobile fraction の値で示した。雌性前核の mobile fraction の値を 1 とした。独立した実験を 4 回行い、核実験において 8 個以上の初期胚を解析した。

B) 母性 H2A 変異体欠損による核の大きさへの影響。独立した実験を 6 回行い、各実験において 8 個以上の初期胚を解析した。共焦点顕微鏡で DAPI 染色された核を撮影し、その画像から面積を算出し、核の大きさとした。野生型の雌性前核の大きさを 1 とした。

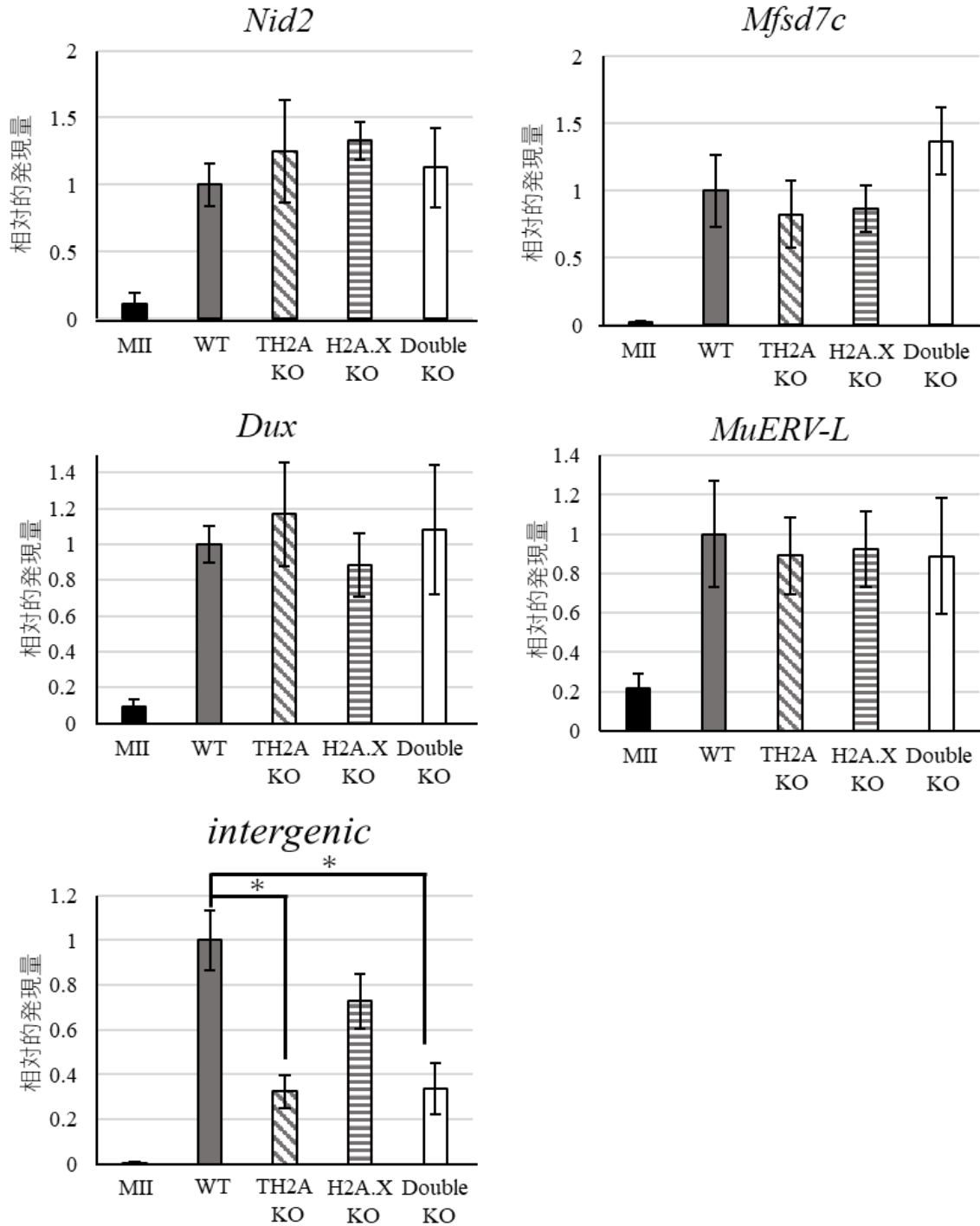


Fig. 3-11. TH2A, H2A.X または TH2A/H2A.X 両欠損による 1 細胞期胚における転写への影響
 野生型(WT)、母性 TH2A 欠損 (TH2A KO)、母性 H2A.X 欠損 (H2A.X)、母性 TH2A/H2A.X 欠損 (Double KO) 胚から RNA を抽出し、RT-PCR により *Nid2*、*Mfsd7c*、*Dux*、*MuERV-L*、および遺伝子間領域からの転写 (*intergenic*) の発現について解析した。これらの転写は 1 細胞期胚で発現が増加するもので、ネガティブコントロールとして成熟卵 (MII) を設定した。各発現量は外部標準であるウサギ由来の α -globin の発現量で補正し、WT の値を 1 とした。独立した実験を 5 回行った。野生型胚と各 H2A 変異体欠損胚の間で検定 (Student's t-test) を行った。* は有意差があることを示す ($P < 0.05$)。エラーバーは S.E. を示す。

総合考察

本研究ではマウス発生における TH2A と H2A.X の役割について明らかにするため、それぞれの H2A 変異体を欠損したマウスを作製し、それらを用いてマウス発生への影響について解析した。

まず初めに、個体において TH2A を欠損したことによる影響について解析した結果、TH2A 欠損では、胚発生には影響がなく TH2A を欠損しても正常に生まれてくることが分かった。しかし、生後に獲得する生殖機能については TH2A 欠損による雄の生殖機能に影響はなかったが、雌においては産子数が減少することが明らかになった。さらに、この雌の産子数の減少は、個体において TH2A が欠損したことによる卵形成の異常や子宮機能の低下などと母側に備わっている機能不良が原因を持つことが考えられた。しかし、TH2A 欠損による卵形成や子宮機能への影響は見られなかった (Fig. GD1)。生殖が成立する上で、卵から受け継がれる母性因子は胚発生において重要な役割を果たしていることが明らかになっている (Wu *et al*, 2017)。次に母性 TH2A 欠損による着床前発生への影響について解析したが、着床前の発生不良は観察されなかった。個体における TH2A 欠損による卵形成、子宮機能、また母性 TH2A 欠損による着床前発生に異常が見られなかったことから、着床後の発生不良が示唆された。過去の研究では着床以前におけるエピジェネティック修飾である DNA メチル化と H3K27me3 への影響と着床後の発生不良が関連する報告がある (Khosla *et al*, 2001, Branco *et al*, 2016, Kaneda *et al*, 2004, , Inoue *et al*, 2018, Matoba *et al*, 2018, Inoue *et al*, 2020)。そして、母性 TH2A 欠損 1 細胞期胚では DNA メチル化と H3K27me3 レベルが減少していることが明らかになり、母性 TH2A の欠損はエピジェネティック修飾に影響し、着床後の発生不良を引き起こしたことが考えられた (Fig. GD2)。

マウスにおける TH2A と TH2B の両欠損は雄の不妊を引き起こし、母性 TH2A/母性 TH2B の欠損は着床前の発生不良を引き起こすことが明らかになっている (Shinagawa *et al*, 2014,

Shinagawa *et al.*, 2015)。そして、TH2B を単独で欠損したマウスでは雄の妊性に影響を及ぼさず、さらには胚の発生不良も起きず雌の妊性も正常であることが報告されている (Montellier *et al.*, 2013)。しかしながら、これまでに TH2A を単独で欠損した研究はなく、TH2A の妊性や発生における役割は明らかにされていなかった。そこで、本研究では TH2A を欠損したマウスを作成して解析を行ったところ、雌の妊性がやや低下していたものの、雄の不妊や着床前の発生に異常は確認されなかった。これらのことから、TH2A と TH2B の両欠損で見られた妊性や発生の異常は、それぞれ TH2A あるいは TH2B の単独の欠損では生じず、これら両方を欠損することで初めて引き起こされるものであることが明らかになった。さらに本研究では母性 TH2A を欠損することで、着床前発生期でエピジェネティック修飾に影響を与え、着床後の発生不良を引き起こしていることが示唆され、マウス発生に対する TH2A の特徴的な役割が本研究で明らかになったと考えられる。

次に、個体において H2A.X を欠損したことによる影響について解析した結果、B6J 遺伝背景において H2A.X 欠損マウスの出生率が減少していることが分かり、そして着床前で発生不良が起きていないことから着床後で発生不良が起きていることが示唆された (Fig. GD1)。さらに、着床後発生期と生後の成長過程において体重の減少と眼球の形成・発達の異常が観察された。H2A.X は着床後の発生や眼球の形成、また生後の成長にも関与することが明らかになった。また、BDF1 遺伝背景の H2A.X 欠損マウスでは、体重の減少は観察されたが、B6J 遺伝背景において観察された他の表現型は観察されなかった。これらの事から遺伝背景によってマウス発生への H2A.X の寄与の強度は異なることが示唆された。

過去の研究では、H2A.X 欠損により雄では不妊、雌では産子数が減少することが報告されている (Celeste *et al.*, 2002) が、本研究では、B6J 遺伝背景において眼球の異常や成長に影響があったことで H2A.X 欠損マウスの生殖機能への影響を解析することはできなかった。しかし、体外受精により母性 H2A.X 欠損した時の着床前発生への影響を解析したが、発生

不良は起きず、H2A.X 欠損マウスの産子数の減少は着床前の発生不良が原因でないと考えられる (Fig. GD2)。ただ、Celeste らによって作製された H2A.X 欠損マウスは産子数が減少するとともに体サイズの減少が報告されており、この体サイズの減少が産子数の低下に繋がった可能性がある。B6J 遺伝背景の H2A.X 欠損マウスでは様々な発生異常が起き、生殖機能への影響を解析することはできなかったが、BDF1 遺伝背景の H2A.X 欠損マウスではそれらの異常は見られなかった。今後、BDF1 遺伝背景の H2A.X 欠損マウスを用いて詳細に妊性への影響を確かめていくことが有用であると考えられる。

着床前発生期、特に 1 細胞期では TH2A と H2A.X は多く核局在しており、この時期発現している TH2A と H2A.X はほとんどが母性因子であることが明らかになった (Fig. 1-6, Fig. 2-5)。しかし、母性 TH2A と母性 H2A.X をそれぞれ単独で欠損した胚では、着床前の発生不良は観察されなかった。また、過去の研究で TH2A と H2A.X はどちらも緩いクロマチン構造に関与していることが言われていることから、TH2A と H2A.X は着床前発生期では互いに機能を補償し合っている可能性が考えられた。そこで、母性 TH2A と母性 H2A.X の両方を欠損した胚で着床前発生への影響を解析した結果、2 細胞期より発生不良が起きることが明らかになった。さらに、母性 TH2A、母性 H2A.X、そしてその両方を欠損した際に、細胞内で影響があるのかどうかについて解析した結果、母性 TH2A 欠損胚では、グローバルなクロマチン構造の緩みへの影響はなかったが、遺伝子間領域からの転写が抑制されていた。一方で母性 H2A.X 欠損胚では、締まったクロマチン構造が形成されていたが、遺伝子発現への影響は本研究では検出できなかった。これらの表現型は母性 TH2A/母性 H2A.X 両欠損胚においてより顕著になることはなかった。しかし、母性 TH2A/母性 H2A.X 両欠損胚では単独の欠損胚で見られた総ヌクレオソームの数が減少することが観察された。これらの結果から、1 細胞期胚において母性 TH2A はエピジェネティック修飾だけでなく、遺伝子発現にも関与しており、母性 H2A.X はグローバルなクロマチン構造の緩みの形成に関与していること

が明らかになった。しかし、DNA のメチル化や H3K27me3 は遺伝子の抑制に関与するエピジェネティック修飾であり、またクロマチン構造の緩みは遺伝子発現の制御に関与しているにも関わらず、母性 TH2A 欠損胚と母性 H2A.X 欠損胚ではそれぞれの挙動に一致する遺伝子発現の影響は検出することできなかった。今後、異なるエピジェネティック修飾レベルへの影響や RNA-seq などによる大規模な遺伝子発現の解析が必要であると考えられる。そして、母性 TH2A/母性 H2A.X 両欠損による着床前の発生不良は、母性 TH2A 欠損によるクロマチン構造の緩みの変化を伴わない転写への影響と母性 H2A.X 欠損によるクロマチン構造の緩みへの影響が重なったこと、もしくは総ヌクレオソーム数が減少したことによって引き起こされたものと考えられる (Fig. GD3)。

これまでの研究で、マウスにおいて H2A 変異体をそれぞれ単独で欠損された研究は行われてきたが、本研究のように 2 つの H2A 変異体を欠損させたのは初めてである。TH2A と H2A.X をそれぞれ欠損させた時、雌の生殖能力や着床後発生不良などが観察された。しかし、母性 TH2A または母性 H2A.X の欠損は着床前発生には影響を与えず、両方を欠損することで発生不良が起きた。このことから、生殖を成立される上で重要な期間の一つである着床前発生期において母性 TH2A や母性 H2A.X のように 1 つの母性 H2A 変異体を欠損することでクロマチン構造の緩みやエピジェネティック修飾などに影響を与えるが、着床前発生に対してある程度の寛容性が存在すると考えられ、その寛容性は同時期に発現している他の H2A 変異体によって担保されていると思われる。

最後に、本研究ではマウス発生における TH2A と H2A.X の様々な寄与が幅広く明らかになり、また過去の報告にない新たな知見を得ることができた。本研究はマウス発生における TH2A と H2A.X の研究のきっかけとなる研究だと考えられる。今後、本研究を元により深く研究を発展されることで哺乳類の発生の理解を深めることができると考えられる。

変異マウス	胚発生		雌 妊性	生殖機能		雄 妊性	生殖機能	その他
	着床 前	着床 後		卵形成	子宮機能		精子形成	
TH2A KO	—	—	低下	—	—	—	—	—
H2A.X KO —B6J	—	発生 不良	低下	/		不妊	減数分裂 停止	体重減少 眼球異常
H2A.X KO —BDF1	—	—		/				体重減少

Fig. GD1. TH2A または H2A.X 欠損マウスにおける表現型

胚性 TH2A 欠損 (TH2A KO) または胚性 H2A.X 欠損 (H2A.X KO) マウスで見られた表現型を表す。赤字は本研究で明らかになった結果を示す。黒字は過去の研究で明らかになっている表現型である。斜線は、本研究でも明らかにすることができなかったもしくは明らかになっていない項目を示す。— は本研究では影響がなかったことを示す。H2A.X の項目では B6J と BDF1 と遺伝背景が異なる H2A.X 欠損マウスにおける表現型を表示している。

変異マウス	胚発生	
	着床前	着床後
TH2A KO	—	発生不良
H2A.X KO	—	
Double KO	発生不良	

変異マウス	遺伝子発現	クロマチン構造		
		緩み	ヌクレオソーム数	エピジェネティック修飾
TH2A KO	遺伝子間領域からの転写の減少	—	—	DNAメチル化 H3K27me3 減少
H2A.X KO	—	締まった	—	
Double KO	遺伝子間領域からの転写の減少	締まった	減少	

Fig. GD2. 母性 TH2A、母性 H2A.X またはその両方の欠損胚における影響

母性 TH2A 欠損 (TH2A KO)、母性 H2A.X 欠損 (H2A.X KO) または母性 TH2A/母性 H2A.X 欠損 (Double KO) マウスで見られた表現型を表す。斜線は、本研究でも明らかにすることができなかったもしくは明らかになっていない項目を示す。— は本研究では影響がなかったことを示す

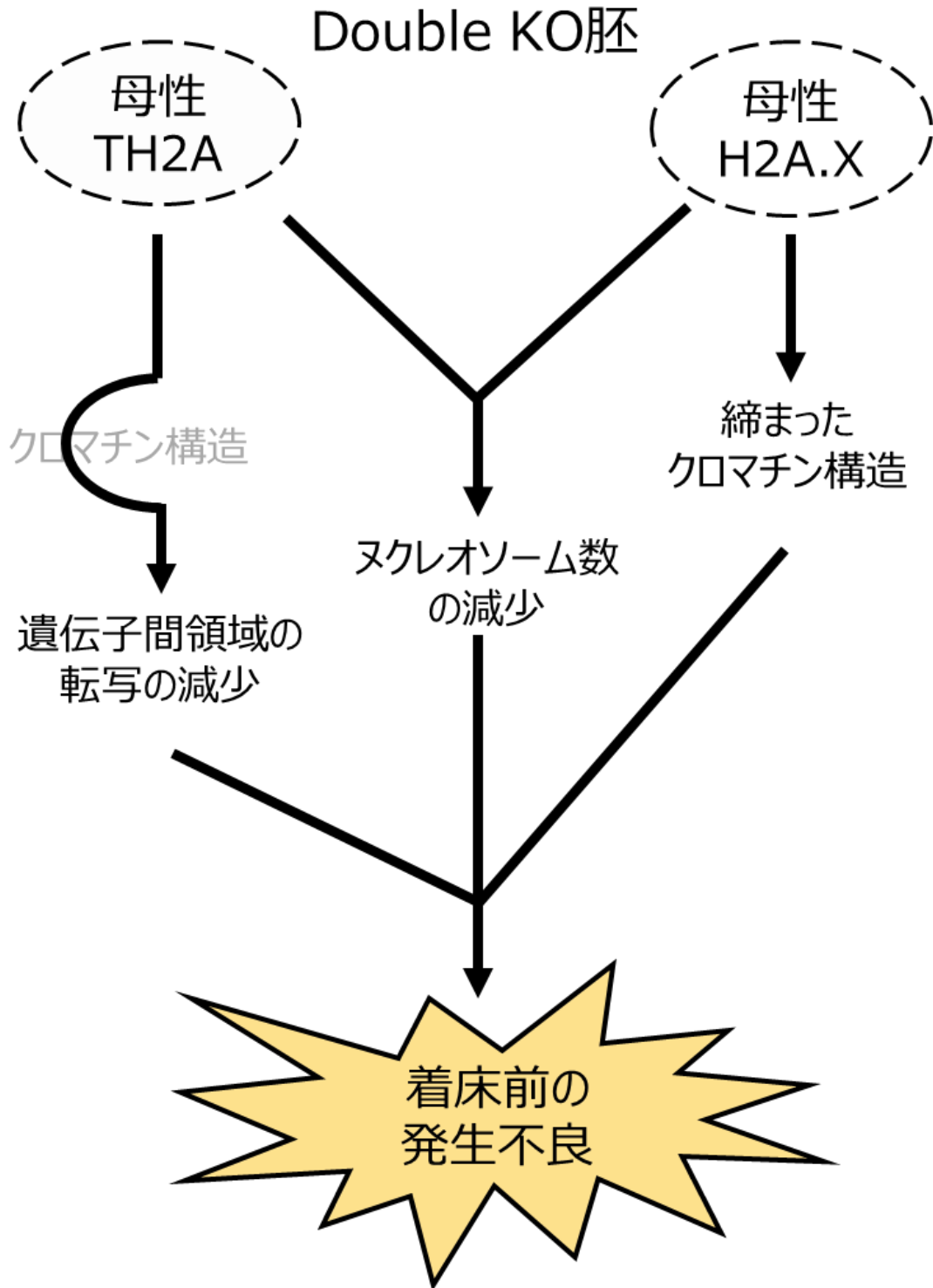


Fig. GD3. 母性 TH2A/母性 H2A.X 両欠損胚による発生不良と原因

母性 TH2A/母性 H2A.X 欠損 (Double KO) 胚で見られた着床前の発生不良は、母性 TH2A 欠損によるクロマチン構造の緩みの変化を伴わない転写への影響と母性 H2A.X 欠損によるクロマチン構造の緩みへの影響が重なったこと、もしくは総ヌクレオソーム数が減少したことによって引き起こされたものと考えられる。

材料と方法

実験動物

B6D2F1 (BDF1)、ICR 系統および C57BL/6J(B6J)系統のマウス (Japan SLC, Japan)を使用した。実験は、「動物の保護及び管理に関する法律」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」および東京大学の定める規程に従い、動物愛護と安全について細心の配慮をもって行った。

成長卵の採取

生後 21 日齢の雌マウス(SLC Japan Inc., Shizuoka, Japan)に 5 units の妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG; ASKA pharmaceutical., Tokyo, Japan)を腹腔内注射し PMSG 注射後 48 時間後に、頸椎脱臼法によって屠殺後、卵巣を取り出し KSOM-HEPES 培地 (Lawitts and Biggers, 1993) に移した。卵巣内の卵胞を 30 G の注射針を使用して破壊した後、ガラスピペットを用いたピペッティングにより卵周囲の卵丘細胞を取り除き、成長卵を採取した。

体外受精および初期胚の採取

体外受精には、3 週齢の BDF1 または B6J 雌マウスを使用した。まず、雌マウスに 5 units の PMSG を腹腔内注射し、PMSG 注射後 48 時間後に 5 units のヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG; ASKA pharmaceutical., Tokyo, Japan)を腹腔内注射した。hCG 注射後 16 時間でマウスを頸椎脱臼法によって屠殺し、卵管膨大部を摘出し第二減数分裂中期にある成熟卵を HTF 培地 (Quinn *et al.*, 1984) 中に採卵した。

精子は ICR または B6J 雄マウスの精巣上体尾部から採取し、受精能を獲得させるため HTF 培地中で 2 時間培養した。受精能を獲得した精子を採卵直後の成熟卵を含む HTF 培地に添加することで体外受精を行った。

媒精開始 3~6 時間後に成熟卵および受精卵を KSOM 培地(Lawitts and Bigger, 1993) に移し、ガラスピペットを用いて精子および卵丘細胞を除去した。さらに媒精開始 6~8 時間後に実体顕微鏡下で前核が 2 つあるものを受精卵として選別した。

初期胚は媒精開始後 12 時間で 1 細胞期胚、28 時間で 2 細胞期胚、45 時間で 4 細胞期胚、72 時間で桑実胚、96 時間で胚盤胞期胚をそれぞれ採取した。

以上の培養はすべて 38°C、5% CO₂、95% air の条件下で行った。

single guide RNA 用のベクターコンストラクトの作製

Th2a および *H2ax* の遺伝子変異マウスを CRISPR/Ca9 システムにより作製するため、変異誘導に必要な single guide RNA (sgRNA) の配列をコードするベクターコンストラクトの作製を作製した。Ex taq Hot Start Version (TaKaRa, RR006A)を用いて PCR を行い、プライマーのダイマー形成による増幅によって T3 プロモーター-sgRNA-DraI 標的サイトの配列を含む PCR 産物を得た。この PCR で用いたプライマーは以下の通りである。

TH2A 変異用 Forward primer : 5'- GAAATTAACCCTCACTAAAGGTACTCGAGCAC
CGCTGCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC -3'

TH2A 変異用 Forward primer : 5'-GAAATTAACCCTCACTAAAGGGAAGTACGCA
CAACGAATGTTTTAG AGCT AGAAATAGC-3'

共通 Reverse primer : 5'-TTTAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTG
ATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAA
AAC-3'

次に、増幅された PCR 産物は TOPO™ TA Cloning™ Kit (Cat# 450640, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を用いて TA クローニングにより kit に付属する T3 プロモーターを持たない空ベクターにライゲーションした。ライゲーション産物と DH5α の大腸菌を用いて形質転換を行った。その後、目的の塩基配列が入ったベクターを持つ大腸菌コロニーを単離し、プラスミドを獲得した。目的に塩基配列は、外部委託 (Eurofins Scientific., Grand Duchy of

Luxembourg) の DNA シークエンスにより確認した。

In vitro transcription (IVT)

Th2a と *H2a.x* の遺伝子変異用 sgRNA は、作製したプラスミドを *DraI* で制限酵素処理を行った後、CUGA3 *in vitro* transcription Kit (Cat# 307-15493, NIPPON GENE CO., Tokyo, Japan) を用いて、同商品のプロトコールに従って合成を行った。

Cas9 cRNA は、プラスミド (Fujii *et al.*, 2013) を *SphI* で制限酵素処理を行った後に、CUGA3 *in vitro* transcription Kit (Cat# 307-15493, NIPPON GENE CO., Tokyo, Japan) を用いて、同商品のプロトコールに従って合成を行った。

eGFP-H2B cRNA は、以前当研究室で作製された pCRII-TOPO-eGFP-H2B (Ooga *et al.*, 2016) のプラスミドを用いた。当プラスミドを *NotI* で制限酵素処理を行った後、mMESSAGE mMACHINE Sp6 kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて同商品のプロトコールに従って R 合成を行った。その後、eGFP-H2B cRNA は Poly(A) tailing kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて Poly(A) tail を付加した。

それぞれ合成された RNA は mMESSAGE mMACHINE Sp6 kit に付属されているリチジウムクロライド沈殿溶液を用いて精製した。精製した RNA は nuclease free water に溶かし、その後の実験に用いた。

TH2A または H2A.X 変異マウスの作製

TH2A または H2A.X 変異マウスは CRISPR/Cas9 系によって作成した。BDF1 から採取した卵と ICR から採取した精子を用いて受精卵を得た。媒性 5 時間後の受精卵に対し TH2A または H2A.X を標的にした 10 ng/ μ l sgRNA と 10 ng/ μ l Cas9 cRNA を注入した。TH2A と H2A.X の標的にとなった塩基配列は、それぞれ 5'-GAACTACGCACAACGAAT-3' と 5'-

TACTCGAGCACCGCTGCC-3'とした。顕微注入された受精卵は 2 細胞期胚まで発生させた後、ICR の偽妊娠マウスに胚移植した。その後、自然出産または移植後 19 日目に子宮切断法により胎児を取り出し、顕微注入した初期胚由来のファウンダー (F0) 個体を得た。TH2A または H2A.X 変異マウスは F0 個体と B6J マウスとの交配から得られたマウスから選抜された。TH2A または H2A.X 変異マウスは B6J マウスを用いて 6 度の戻し交配をし、遺伝背景を B6J に近づけた。B6J 遺伝背景の TH2A または H2A.X ヘテロ変異雌雄マウスを交配し、それぞれのホモ変異マウスを獲得し、解析に用いた。

また、6 度の戻し交配を終えた B6J 遺伝背景を持つ H2A.X 変異雌マウスと DBA/2 雄マウスを交配し、BDF1 遺伝背景をもつ H2A.X 変異マウスを獲得した。BDF1 遺伝背景の H2A.X ヘテロ変異雌雄マウスを交配し、H2A.X ホモ変異マウスを獲得した。

TH2A または H2A.X 変異マウスの検出

TH2A 変異マウスの検出するため、抽出したゲノムに対し、欠損ゲノム領域を挟むように設計したプライマーセット(Forward primer : 5'-TCCGGCATGGCTCAAGTAACC-3', Reverse Primer : 5'-CTGGATGTTGGGCAGGACGC-3')と GoTaq® Green Master Mix(Cat.# M7121, Promega Corporation, WI, USA)を用いて PCR を(95°C 30 秒→67°C 30 秒→72°C 60 秒)×40 cycle の条件で行った。その後、PCR 産物を制限酵素 (TasI:FD1354, Thermo Fisher Scientific) によって切断し未処理分画とともに電気泳動を行い、得られたバンドの比較することで遺伝型を決定した。

H2A.X 変異マウスの検出では、抽出したゲノムに対し欠損ゲノム領域を挟むように設計したプライマーセット(Forward primer : 5'-GCTGCTGCGGAAAGGCC-3', Reverse Primer : 5'-TCAGTACTCCTGAGAGGCCTG-3')と GoTaq® Green Master Mix を用いて PCR を(95°C 30 秒→62°C 30 秒→72°C 60 秒)×40 cycle の条件で行った。その後、電気泳動を行い、

得られたバンドの比較することで遺伝型を決定した。

ゲノム抽出

1.5 mL tube に 100 μ l の tail lysis buffer(0.05 M Tris-HCl, 0.063% sodium dodecyl sulfate, 0.02 M NaCl, 0.001 M EDTA)と 1 μ l の proteinase K(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)から成る溶液を入れ、そこにマウスの尾の一部を切り取って加えて、55°Cで 2 時間以上振盪、溶解させた。その後、室温で 16000 rpm、10 分間遠心し、上清を新しい 1.5 ml tube に 100 μ l を移し、phenol-chloroform-isoamyl alcohol(Nippon gene., Osaka, Japan)を 100 μ l 加え、十分に攪拌した。室温で 16000 rpm、10 分間遠心し、上層を新たな 1.5 ml tube に移し、3 M 酢酸ナトリウムを 5 μ l、100%エタノールを 250 μ l 加え攪拌し、16000 rpm、10 分間で遠心した。遠心後液層を取り除き、70%エタノールで沈殿を洗浄した。その後、液層を取り除き、沈殿を滅菌水で溶解し抽出したゲノム DNA の濃度を測定した。

Fluorescence Recover after Photobleaching (FRAP)法

媒性 3 時間後の受精卵に対し 500 ng/ μ l EGFP-H2B cRNA を顕微注入した。媒性 9 時間後の顕微注入された胚を予め 38°C、5%CO₂ 条件下で 20 分間インキュベートした KSOM-HEPES 培地をミネラルオイルでカバーしたガラスボトムディッシュ (CELL view, Cell culture Dish, Four Components, gainer bio-one) に移し、予め Microscope incubate system(Tokai hit,Co.)でサンプルのステージを 38°Cに温めた共焦点レーザー顕微鏡 (FV3000、Olympus Corporation., Tokyo, Japan) および 64 倍の油浸レンズを用いて、観察および FRAP 解析を行った。観察時、FV31S-DT (Olympus Corporation.)を使用し、GFP 蛍光褪色領域 (ROI : region of interest)、GFP 蛍光を褪色させない領域 (REF : reference)、GFP 蛍光が検出されない領域 (BG : back ground)を設定した。レーザー488 nm のエキサイテーションは通常時

0.4%に設定し、蛍光強度は 2000 付近になるように調整した。まず、褪色前に 3 枚の写真を 5 秒おきに撮影し、アルゴンレーザーのエキサイテーションを 3%にして、1 秒間フォトブリーチを行った。その後、再度 5 秒ごとに 10 枚を撮影した。その後、撮影された写真から ROI、REF、BG の蛍光強度を(ソフト名)により計測した。ROI から BG の値を減算して、その値を REF から BG の値を減算したもので除算した。各タイムポイントの値を、退職前の 3 点の平均値で割った相対値を算出した。その後、退職前の 3 点の平均相対値 (=1)と最終点の値からから褪色直後の値を減算したものをそれぞれ褪色率と回復率とした。Mobile Fraction の値は回復率の値を褪色率の値で除算して算出した (Subramanian *et al.*, 2013, Bae *et al.*, 2012, Dieteren *et al.*, 2011)。

RNA- sequencing 解析のデータを用いた遺伝子発現解析

マウスの卵および着床前初期胚の RNA- sequencing 解析のデータ (Abe *et al.*, 2015)を用いて、H2A 変異体 (*H2a*, *Th2a*, *H2a.x*, *H2a.z*, *Macroh2a*) の RPKM の値をそれぞれ抽出し、成長卵と 1 細胞期胚から胚盤胞期胚までの各ステージでの発現量をグラフに示した。尚、*H2a* や *MacroH2a* のように複数の遺伝子が属しているものについては、それぞれ合算した RPKM 値をその H2A 変異体の発現量とした。

卵および初期胚における免疫染色法

TH2A、H2A.X、H2A.Z、H2A、macroH2A、H3.1/H3.2、H3.3、H3K9me2、H3K27me3 の検出では、採取した卵および各ステージの初期胚を固定液 (3.7% PFA、0.2% Triton X100/PBS) に室温、20 分間浸し、固定および透過処理を同時に行った。1%BSA/PBS で 3 回洗浄後、1%BSA、0.2%Tween/PBS で希釈した一次抗体溶液中に、固定された卵および初期胚を入れ 4°C、16 時間反応させた。一次抗体反応後、1% BSA/PBS で 3 回洗浄し、1%

BSA、0.2%Tween/PBS で希釈した二次抗体溶液中に、初期胚を入れ室温、1時間反応させた。

H2K119ub の検出では、透明帯を除去した胚を固定液 (3.7% PFA/PBS) に室温、15 分間浸し、その後、1%BSA/PBS で3回洗浄した。固定された胚を 0.2%TritonX100/PBS に室温、30 分間浸し、透過処理を行った。次に、胚をブロッキング溶液 (0.1%Tween、2%BSA/PBS) に室温、4 時間浸しブロッキングをした。ブロッキング溶液で希釈した抗体溶液を用いて 4°C、16 時間で 1 次抗体反応を行った。一次抗体反応後、ブロッキング溶液で 3 回洗浄し、ブロッキング溶液で希釈した二次抗体溶液中に胚を入れ室温、1時間反応させた。

5mC の検出では、胚を固定液 (3.7% PFA/PBS) に室温、20 分間浸し、その後、1% BSA/PBS で 3 回洗浄した。固定された胚を 0.5% TritonX100/PBS に室温、15 分間浸し透過処理を行い、4 N HCl, 0.02% Triton/ddH₂O で 3 回洗浄した。胚を 4 N HCl, 0.02% Triton/ddH₂O に室温、15 分間浸した。その後、0.1M Tris-HCl, 0.02% Triton/ ddH₂O で洗浄し、同溶液に胚を室温、15 分間浸した。胚を 1% BSA/PBS で 3 回洗浄し、同溶液で希釈した 1 次抗体溶液を用いて 1 次抗体反応を室温、4 時間で行った。一次抗体反応後、1% BSA/PBS で 3 回洗浄し、1% BSAPBS で希釈した二次抗体溶液中に、初期胚を入れ室温、1時間反応させた。

それぞれの二次抗体反応後、1%BSA/PBS で3回洗浄し、4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) 入りの退色防止剤 (H-1200, Vector Laboratories, CA, USA) 中に初期胚を入れ封入した。作製した標本の蛍光観察は共焦点レーザー顕微鏡 (FV3000, Olympus Corporation.) を用いて行った。

使用した一次抗体および二次抗体の希釈濃度は以下のとおりである。抗 H2A.X 抗体 (Cat# 20669, Abcam PLC, UK) : 500 倍希釈、抗 TH2A 抗体 (Shinagawa *et al.*, 2014) : 2000 倍希釈、抗 H3.1/3.2 抗体 (Cat# CE-039B, コスモ・バイオ, Tokyo, Japan) : 500 倍希釈、抗

H3.3 抗体 (Cat# CE-040B, コスモ・バイオ) : 100 倍希釈、抗 H3K9me2 抗体 (Cat# ab1220, Abcam PLC, UK) : 100 倍希釈、抗 H3K27me3 抗体 (Cat# 9671S, Sigma-Aldrich, MO, USA) : 500 倍希釈、抗 H2AK119ub 抗体 (Cat# 8240, Cell Signaling Technology, MA, USA) : 500 倍希釈、抗 5mC 抗体 (Cat# NA81, Sigma-Aldrich) : 2000 倍希釈、Alexa568 標識抗ラビット IgG 抗体 (Cat# A-10042, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) : 100 倍希釈、Alexa568 標識抗マウス IgG 抗体 (Cat# A-11004, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) : 100 倍希釈 Alexa488 標識抗ラット IgG 抗体 (Cat# 4416S, Molecular Probe, Eugene, OR, USA) : 500 倍希釈、Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体 (Cat# A-11001, Thermo Fisher Scientific) : 500 倍希釈。

ヒストン変異体およびエピジェネティック修飾のシグナル強度の定量

免疫染色によるヒストン変異体およびエピジェネティック修飾のシグナルの強度の定量は Image J を用いて、共焦点レーザー顕微鏡で撮影した免疫染色画像の解析を行った。TH2A の解析では、ヒストン変異体および DNA のメチル化を除くエピジェネティック修飾のシグナル強度の値を DAPI による DNA のシグナル強度の値で除算して相対シグナル強度として算出した。DNA のメチル化の解析では、DNA のシグナルを得ることができなかったため、他の免疫染色から得た DNA シグナルの強度が、野生型および変異型胚に間で差がないことを確認した上で、DNA のメチル化のシグナル強度を定量した。

1 細胞期胚の核の大きさの定量

核の大きさの解析は Image J を用いて、共焦点レーザー顕微鏡で撮影した DAPI 染色画像の解析を行った。核の大きさは面積として表した。卵と初期胚の解析では独立した 4 回以上の実験を行い、各実験で 8 個以上の細胞を解析した。有意差の判定には t 検定を行い、

$p < 0.05$ のものを有意差があると判断した。

卵巣の切片作製

雌マウスから卵巣を摘出し、4% PFA/PBS を用いて 4°C、16 時間で卵巣を固定した。固定された卵巣は PBS、70% エタノール、80% エタノール、90% エタノール、100% エタノールを用いてそれぞれ室温、1 時間で振盪し、その後、新しい 100% エタノールを用いて室温、16 時間で振盪した。次に、卵巣を 100% キシレンに室温、30 分間浸し、この手順を 2 回行った後、100% キシレンに室温、1 時間間浸しキシレンと置換した。次に卵巣をキシレンとパラフィンで 1:1 で混合した溶液に入れ、30 分間、2 回浸し、その後、100% パラフィンを用いて 1 時間、3 回でキシレンをパラフィンに置き換えた。その後、卵巣を包埋し、マイクローム (RM2125RT, Leica, Wetzlar, Germany) を用いて厚さ 7 μm で切片を作製した。作製された切片はガラススライドに貼り付け 40°C、1 日で乾燥させた。

HE 染色

卵巣切片をキシレンに室温、10 分間浸し、これを 3 回行った。次に、100% エタノール、95% エタノール、90% エタノール、80% エタノール、70% エタノールの順でそれぞれ室温、2 分間で卵巣切片を浸し、その後、滅菌水に 5 分間浸した。次に、ヘマトキシリン溶液を用いて 3 分間染色した後、流水で 10 分洗浄した。次に、エオシン溶液に 2 分間、卵巣切片を浸し染色した。染色し終えた卵巣切片を 70% エタノールで 3 回、80% エタノール、90% エタノール、95% エタノールでそれぞれ 1 回、2 分浸した。その後、100% エタノールで 2 回、2 分間浸した。次に、切片をキシレンに 10 分間、3 回浸し、その後、封入剤 (192-16301, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) を用いて封入した。卵巣切片は透過型顕微鏡 (BX50, OLYMPUS CORPORATION, Tokyo, Japan) と LAS V4.8 (Leica) を用

いて撮影した。

卵巢中の卵胞と胞状卵胞の数の定量

卵胞数の解析では、各卵巢の切片内にある卵胞をカウントし、単位面積当たりの卵胞数を算出した。胞状卵胞数では、卵胞に含まれる胞状卵胞の率として算出した。この解析では、それぞれ 10 個体ずつの野生型および TH2A 欠損マウスから摘出した卵巢を用いて解析した。また、1 つの卵巢に対し、13 枚以上の切片を用いてその平均値を算出した。

RT-PCR

① RNA 抽出

サンプリングした胚を 200 μ l の ISOGEN (Nippon gene Co.) に入れ、 -80°C で凍結した。各サンプルに外部標準として 1 pg/ μ l の rabbit globin (Sigma-Aldrich., R1253) を 1 μ l 加えた。さらに、50 μ l のクロロホルム (Wako chemical Industries.) を加えて、攪拌した。その後、 4°C で 5 分間静置し、15000 rpm で 15 分間、 4°C で遠心した。上清 100 μ l を別のチューブに移し、3 M 酢酸ナトリウム 5 μ l、ethatinmete (Nippon gene Co.) を 1 μ l 加えて、よく攪拌した。さらに、120 μ l のイソプロパノール (Wako chemical Industries.) を加えて、よく攪拌した。その後、15000 rpm で 15 分間、 4°C で遠心した。遠心後、沈殿物に触れないように上清を除去した。70% エタノールを 1 ml 加えて、沈殿を洗浄し、15000 rpm で 5 分間、 4°C で遠心した。遠心後、上清を除去し、さらに 5 分間風乾させた。乾燥後、RNase free water を加えて 55°C で 10 分間インキュベートし、RNA を溶解した。その後、RQ1 RNase-Free DNase (Promega Co.) を用いて RNA 溶液中の DNA を分解した。RNA 溶液に 200 μ l の ISOGEN を加えて、再度上記の手順で RNA を抽出した。乾燥後、9 μ l の RNase free water を加えて 55°C で 10 分間インキュベートし、RNA を溶解した。

② 逆転写反応

PrimeScript RT-PCR Kit (TaKaRa, RR014A) を用いて逆転写反応を行った。random primer を用いるメーカー指定のプロトコールに従い、cDNA を得た。逆転写反応はサーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories Inc., C1000) を用いた。反応液は凍結された後、ddH₂O で 2 倍に希釈した。

③ PCR

得られた cDNA をテンプレートとし、Ex taq Hot Start Version (TaKaRa, RR006A) を用いて PCR を行った。cDNA 1 μ l、EX Taq (5 U/ μ l) 0.25 μ l、10 \times Ex Taq Buffer 2.5 μ l、dNTP Mixture 2 μ l、10 μ M Primer 各 1.25 μ l を加え、ddH₂O で全量 25 μ l にした。溶液を混同し、サーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories Inc., C1000) を用いて増幅した。PCR で用いたプライマーと PCR 条件は以下の通りである。

Rabbit globin

Forward ; 5'- GTGGGACAGGAGCTTGAAAT -3'

Reverse : 5'- GCAGCCACGGTGGCGAGTAT-3'

(95°C 30 秒→58°C 60 秒→72°C 60 秒) \times 28 cycle

Nid2

Forward ; 5'- CACCGAGGACAGTTTCCATT-3'

Reverse : 5'- CCAGTTACCAGGTGCTGGAT -3'

(95°C 30 秒→59°C 60 秒→72°C 60 秒) \times 38 cycle

Mfsd7c

Forward ; 5'- GTCCTTGCTTGGTCTCTTGC-3'

Reverse : 5'- CTCCTCTCGTGACCCTCAG-3'

(95°C 30 秒→59°C 60 秒→72°C 60 秒) \times 38 cycle

Dux

Forward ; 5'- '-GCCCTGCTATCAACTTTCAAGAAG-3'

Reverse : 5'- AGGCTTGCCCTAGGATCCTGAG -3'

(95°C 30 秒→57°C 60 秒→72°C 60 秒) × 36 cycle

MuERV-L

Forward ; 5'- TTCTCAAGGCCACCAATAGT-3'

Reverse : 5'- GACACCTTTTTTAACTATGCGAGCT-3'

(95°C 30 秒→59°C 60 秒→72°C 60 秒) × 38 cycle

Intergenic

Forward ; 5'- GCATTGTCCCTTGATTCAGC-3'

Reverse : 5'- CCAAGCAAGGCTTTGTGAA-3'

(95°C 30 秒→59°C 60 秒→72°C 60 秒) × 38 cycle

PCR産物を2%アガロースゲルにアプライし、エチジウムブロマイドを含むTAE buffer内で電気泳動した後、紫外線照射によりバンドを確認した。

参考文献

- Abbott DW, Laszczak M, Lewis JD, Su H, Moore SC, Hills M, Dimitrov S, Ausió J. : Structural characterization of macroH2A containing chromatin. *Biochemistry.*, 2004, 43(5), 1352-9.
- Abe K, Yamamoto R, Franke V, Cao M, Suzuki Y, Suzuki MG, Vlahovicek K, Svoboda P, Schultz RM, Aoki F. : The first murine zygotic transcription is promiscuous and uncoupled from splicing and 3' processing. *The EMBO journal.*, 2015, 34(11):1523-37.
- Adjaye J, Huntriss J, Herwig R, BenKahla A, Brink TC, Wierling C, Hultschig C, Groth D, Yaspo ML, Picton HM, Gosden RG, Lehrach H. : Primary differentiation in the human blastocyst: comparative molecular portraits of inner cell mass and trophectoderm cells., *Stem Cells.*, 2005, 23(10):1514-25.
- Aoki F, Worrall DM, Schultz RM. : Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Developmental biology.*, 1997, 15;181(2):296-307.
- Bae J, Sung BH, Cho IH, Song WK. : F-actin-dependent regulation of NESH dynamics in rat hippocampal neurons., *PLoS One.*, 2012, 7(4):e34514. doi: 10.
- Baldi S, Becker PB. : The variant histone H2A.V of *Drosophila*--three roles, two guises., *Chromosoma.*, 2013, 122(4):245-58.
- Bannister AJ, Kouzarides T. : Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.*, 2011, 21(3):381-95.
- Ban ath JP, Ba uelos CA, Klovov D, MacPhail SM, Lansdorp PM, Olive PL. : Explanation for excessive DNA single-strand breaks and endogenous repair foci in pluripotent mouse embryonic stem cells., *Exp Cell Res.*, 2009, 315(8):1505-20.
- Biterge B, Schneider R. : Histone variants: key players of chromatin., *Cell Tissue Res.*, 2014, 356(3):457-66.

-
- Bonini NM, Leiserson WM, Benzer S. : Multiple roles of the eyes absent gene in *Drosophila*., *Dev Biol.*, 1998, 196(1):42-57.
- Borsani G, DeGrandi A, Ballabio A, Bulfone A, Bernard L, Banfi S, Gattuso C, Mariani M, Dixon M, Donnai D, Metcalfe K, Winter R, Robertson M, Axton R, Brown A, van Heyningen V, Hanson I.: EYA4, a novel vertebrate gene related to *Drosophila* eyes absent., *Hum Mol Genet.*, 1999, 8(1):11-23.
- Bouniol-Baly C, Hamraoui L, Guibert J, Beaujean N, Szöllösi MS, Debey P. : Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes. *Biology of reproduction.*, 1999, 60(3):580-7.
- Boyle AP, Davis S, Shulha HP, Meltzer P, Margulies EH, Weng Z, Furey TS, Crawford GE. : High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome. *Cell.*, 2008, 132(2):311-22.
- Bošković A, Bender A, Gall L, Ziegler-Birling C, Beaujean N, Torres-Padilla ME. : Analysis of active chromatin modifications in early mammalian embryos reveals uncoupling of H2A.Z acetylation and H3K36 trimethylation from embryonic genome activation., *Epigenetics.*, 2012, 7(7):747-57.
- Branco MR, King M, Perez-Garcia V, Bogutz AB, Caley M, Fineberg E, Lefebvre L, Cook SJ, Dean W, Hemberger M, Reik W. : Maternal DNA Methylation Regulates Early Trophoblast Development., *Dev Cell.*, 2016, 36(2):152-63.
- Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Oлару A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. : Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science.*, 2002, 296(5569):922-7.
- Chadwick BP, Lane TF. : BRCA1 associates with the inactive X chromosome in late S-phase, coupled with transient H2AX phosphorylation., *Chromosoma.*, 2005, 114(6):432-9.
-

-
- Chambers AL, Downs JA. : The contribution of the budding yeast histone H2A C-terminal tail to DNA-damage responses., *Biochem Soc Trans.*, 2007, 35(Pt 6):1519-24.
- Cho T, Sakai S, Nagata M, Aoki F : Involvement of chromatin structure in the regulation of mouse zygotic gene activation., *Animal Science Journal.*, 2002 73, 113–122.
- Cook PJ, Ju BG, Telese F, Wang X, Glass CK, Rosenfeld MG. : Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions., *Nature.*, 2009, 458(7238):591-6.
- Depreux FF, Darrow K, Conner DA, Eavey RD, Liberman MC, Seidman CE, Seidman JG: Eya4-deficient mice are a model for heritable otitis media., *J Clin Invest.*, 2008, 118(2):651-658.
- Dieteren CE, Willems PH, Swarts HG, Fransen J, Smeitink JA, Koopman WJ, Nijtmans LG. : Defective mitochondrial translation differently affects the live cell dynamics of complex I subunits., *Biochim Biophys Acta.*, 2011, 1807(12):1624-33.
- Douet J, Corujo D, Malinverni R, Renauld J, Sansoni V, Marjanovic MP, Cantarino N, Valero V, Mongelard F, Bouvet P, Imhof Axel, Thiry M, Buschbeck M. : MacroH2A histone variants maintain nuclear organization and heterochromatin architecture. *Journal of Cell Science.*, 2017, 130, 1570-1582.
- Eleuteri B, Aranda S, Ernfors P. : NoRC Recruitment by H2A.X Deposition at rRNA Gene Promoter Limits Embryonic Stem Cell Proliferation., *Cell Rep.*, 2018, 23(6):1853-1866.
- Faast R, Thonglairoam V, Schulz TC, Beall J, Wells JR, Taylor H, Matthaei K, Rathjen PD, Tremethick DJ. : Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr Biol.*, 2001,11(15):1183-7.
- Fan Y, Nikitina T, Morin-Kensicki EM, Zhao J, Magnuson TR, Woodcock CL, Skoultchi AI. : H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing in vivo., *Mol Cell Biol.*, 2003, 23(13):4559-72.
-

-
- Friesner JD, Liu B, Culligan K, Britt AB. : Ionizing radiation-dependent gamma-H2AX focus formation requires ataxia telangiectasia mutated and ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related., *Mol Biol Cell.*, 2005, 16(5):2566-76.
- Fujii W, Kawasaki K, Sugiura K, Naito K. : Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease., *Nucleic Acids Res.*, 2013, 41(20):e187.
- Funaya S, Aoki F. : Regulation of zygotic gene activation by chromatin structure and epigenetic factors., *J Reprod Dev.*, 2017, 63(4):359-363.
- Funaya S, Ooga M, Suzuki MG, Aoki F. : Linker histone H1FOO regulates the chromatin structure in mouse zygotes. *FEBS Lett.*, 2018, 592(14):2414-2424.
- Gaspar-Maia A, Alajem A, Meshorer E, Ramalho-Santos M. : Open chromatin in pluripotency and reprogramming., *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2011, 12(1):36-47.
- Grifone R, Demignon J, Giordani J, Niro C, Souil E, Bertin F, Laclef C, Xu PX, Maire P. : Eya1 and Eya2 proteins are required for hypaxial somitic myogenesis in the mouse embryo., *Dev Biol.*, 2007, 302(2):602-16.
- Gu TP, Guo F, Yang H, Wu HP, Xu GF, Liu W, Xie ZG, Shi L, He X, Jin SG, Iqbal K, Shi YG, Deng Z, Szabó PE, Pfeifer GP, Li J, Xu GL. : The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature.*, 2011, 477, 7366, 606-610.
- Hada M, Masuda K, Yamaguchi K, Shirahige K, Okada Y.: Identification of a variant-specific phosphorylation of TH2A during spermiogenesis., *Sci Rep.*, 2017a;7:46228. doi: 10.1038/srep46228.
- Hada M, Kim J, Inoue E, Fukuda Y, Tanaka H, Watanabe Y, Okada Y.: TH2A is phosphorylated at meiotic centromere by Haspin., *Chromosoma.*, 2017b, 126(6):769-780.
- Hake SB and Allis CD. : Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: The “H3 barcode hypothesis”., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2006a, 103(17):6428-35.
-

- Hake SB, Garcia BA, Duncan EM, Kauer M, Dellaire G, Shabanowitz J, Bazett-Jones DP, Allis CD, Hunt DF. : Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants., *The Journal of biological chemistry.*, 2006b, 281, 1, 559-568.
- Hayakawa K, Terada K, Takahashi T, Oana H, Washizu M, Tanaka S. : Nucleosomes of polyploid trophoblast giant cells mostly consist of histone variants and form a loose chromatin structure., *Sci Rep.*, 2018, 8(1):5811. doi: 10.1038/s41598-018-23832-2.
- Hirasawa R, Chiba H, Kaneda M, Tajima S, Li E, Jaenisch R, Sasaki H. : Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development., *Genes Dev.*, 2008, 22(12):1607-16.
- Huh NE, Hwang IW, Lim K, You KH, Chae CB. : Presence of a bi-directional S phase-specific transcription regulatory element in the promoter shared by testis-specific TH2A and TH2B histone genes., *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19(1):93-8.
- Ikami K, Nuzhat N, Lei L. : Organelle transport during mouse oocyte differentiation in germline cysts., *Curr Opin Cell Biol.*, 2017, 44:14-19.
- Inoue A, Akiyama T, Nagata M, Aoki F. : The perivitelline space-forming capacity of mouse oocytes is associated with meiotic competence., *J Reprod Dev.*, 2007, 53(5):1043-52.
- Inoue A, Chen Z, Yin Q, Zhang Y. : Maternal Eed knockout causes loss of H3K27me3 imprinting and random X inactivation in the extraembryonic cells., *Genes Dev.*, 2018, 32(23-24):1525-1536.
- Inoue A, Jiang L, Lu F, Suzuki T, Zhang Y. : Maternal H3K27me3 controls DNA methylation-independent imprinting., *Nature.*, 2017, 547(7664):419-424.
- Inoue K, Ogonuki N, Kamimura S, Inoue H, Matoba S, Hirose M, Honda A, Miura K, Hada M, Hasegawa A, Watanabe N, Dodo Y, Mochida K, Ogura A. : Loss of H3K27me3 imprinting in the Sfbmt2 miRNA cluster causes enlargement of cloned mouse placentas., *Nat Commun.*, 2020, 11(1):2150.

- Jenc J, Rebay I. : Identification of transcriptional targets of the dual-function transcription factor/phosphatase eyes absent., *Dev Biol.*, 2007, 310(2):416-29.
- Jin C and Felsenfeld G. : Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes & development.*, 2007, 21(12), 1519-29.
- Jukam D, Shariati SAM, Skotheim JM. : Zygotic Genome Activation in Vertebrates., *Dev Cell.*, 2017, 42(4):316-332.
- Kamakaka RT, Biggins S., : Histone variants: deviants?, *Genes Dev.*, 2005, 19(3):295-310.
- Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, Sasaki H. : Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting., *Nature.*, 2004, 429(6994):900-3.
- Khosla S, Dean W, Brown D, Reik W, Feil R. : Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes., *Biol Reprod.*, 2001, 64(3):918-26.
- Kigami D, Minami N, Takayama H, Imai H. : MuERV-L is one of the earliest transcribed genes in mouse one-cell embryos., *Biol Reprod.*, 2003, 68(2):651-4.
- Kobayashi H, Sakurai T, Imai M, Takahashi N, Fukuda A, Yayoi O, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Sotomaru Y, Suzuki Y, Kono T. : Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks., *PLoS Genet.*, 2012, 8(1):e1002440.
- Kruijsbergen IV, Hontelez S, Veenstra GJ. : Recruiting polycomb to chromatin., *Int J Biochem Cell Biol.*, 2015, 67:177-87.
- Lawitts JA and Biggers JD. : Culture of preimplantation embryos. *Methods in enzymology.*, 1993, 225, 153-64.

-
- Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP.: A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell.*, 1993, 72:73–84.
- Li A, Yu Y, Lee SC, Ishibashi T, Lees-Miller SP, Ausió J. : Phosphorylation of histone H2A.X by DNA-dependent protein kinase is not affected by core histone acetylation, but it alters nucleosome stability and histone H1 binding. *The Journal of biological chemistry.*, 2010, 285(23), 17778-88.
- Li E. : Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development., *Nat Rev Genet.*, 2002, 3(9):662-73.
- Lim HJ, Wang H. ; Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models., *Clin Invest.*, 2010, 120(4):1004-15.
- Lin CJ, Conti M, Ramalho-Santos M.: Histone variant H3.3 maintains a decondensed chromatin state essential for mouse preimplantation development. *Development.*, 2013, 140, 17, 3624-3634.
- Liu H, Aoki F. : Transcriptional activity associated with meiotic competence in fully grown mouse GV oocytes., *Zygote.*, 2002, 10(4):327-32.
- Lu X, Gao Z, Qin D, Li L. : A Maternal Functional Module in the Mammalian Oocyte-To-Embryo Transition., *Trends Mol Med.*, 2017, 23(11):1014-1023.
- Matoba S, Wang H, Jiang L, Lu F, Iwabuchi KA, Wu X, Inoue K, Yang L, Press W, Lee JT, Ogura A, Shen L, Zhang Y. : Loss of H3K27me3 Imprinting in Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos Disrupts Post-Implantation Development., *Cell Stem Cell.*, 2018, 23(3):343-354.
- Millar CB. : Organizing the genome with H2A histone variants., *Biochem J.*, 2013, 449(3):567-79. doi: 10.1042/BJ20121646.
- Miyano T, Manabe N. : Oocyte growth and acquisition of meiotic competence. *Society of Reproduction and Fertility supplement.*, 2007, 63:531-8.
-

-
- Montellier E, Bousouar F, Rousseaux S, Zhang K, Buchou T, Fenaille F, Shiota H, Debernardi A, Héry P, Curtet S, Jamshidikia M, Barral S, Holota H, Bergon A, Lopez F, Guardiola P, Pernet K, Imbert J, Petosa C, Tan M, Zhao Y, Gérard M, Khochbin S. Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev.* 2013, 27(15):1680-92.
- Nakamura T, Arai Y, Umehara H, Masuhara M, Kimura T, Taniguchi H, Sekimoto T, Ikawa M, Yoneda Y, Okabe M, Tanaka S, Shiota K and Nakano T. : PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nature cell biology.*, 2007, 9(1), 64-71.
- Nakamura T, Liu YJ, Nakashima H, Umehara H, Inoue K, Matoba S, Tachibana M, Ogura A, Shinkai Y and Nakano T. : PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature.*, 2012, 486(7403), 415-9.
- Nashun B, Yukawa M, Liu H, Akiyama T, Aoki F. : Changes in the nuclear deposition of histone H2A variants during pre-implantation development in mice. *Development.* 2010, 137, 3785-3794.
- Niwa H., : How is pluripotency determined and maintained?, *Development.* 2007, 134(4):635-46.
- Ooga M, Fulka H, Hashimoto S, Suzuki MG, Aoki F. : Analysis of chromatin structure in mouse preimplantation embryos by fluorescent recovery after photobleaching. *Epigenetics* 2016 11(1) : 85-94.
- Pehrson JR, Changolkar LN, Costanzi C, Leu NA.: Mice without macroH2A histone variants. *Mol Cell Biol.* 2014,34(24):4523-33.
- Pusarla RH, Bhargava P. : Histones in functional diversification. Core histone variants. *FEBS J.*, 2005, 272(20):5149-68.
- Quinn P and Begley AJ. : Effect of human seminal plasma and mouse accessory gland extracts on mouse fertilization in vitro. *Australian journal of biological sciences.*, 1984, 37, 3, 147-52.
-

-
- Saitou M, Kagiwada S, Kurimoto K. : Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development.*, 2012 ;139(1):15-31.
- Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. : Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Developmental biology.*, 2002, 241, 1, 172-182.
- Sasaki H, Matsui Y. : Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet.*, 2008 ;9(2):129-40.
- Seo J, Kim K, Chang DY, Kang HB, Shin EC, Kwon J, Choi JK. : Genome-wide reorganization of histone H2AX toward particular fragile sites on cell activation., *Nucleic Acids Res.*, 2014, 42(2):1016-25.
- Shinagawa T, Huynh LM, Takagi T, Tsukamoto D, Tomaru C, Kwak HG, Dohmae N, Noguchi J, Ishii S.: Disruption of Th2a and Th2b genes causes defects in Spermatogenesis. *Development.*, 2015, 142(7):1287-92.
- Shinagawa T, Takagi T, Tsukamoto D, Tomaru C, Huynh LM, Sivaraman P, Kumarevel T, Inoue K, Nakato R, Katou Y, Sado T, Takahashi S, Ogura A, Shirahige K, Ishii S. : Histone Variants Enriched in Oocytes Enhance Reprogramming to Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell.*, 2014 14, 217-227.
- Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, Rossant J. : Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst., *Development.*, 2005, 132(9):2093-102.
- Subramanian V, Mazumder A, Surface LE, Butty VL, Fields PA, Alwan A, Torrey L, Thai KK, Levine SS, Bathe M, Boyer LA. : H2A.Z acidic patch couples chromatin dynamics to regulation of gene expression programs during ESC differentiation., *PLoS Genet.*, 2013, 9(8):e1003725.
- Söker T, Dalke C, Puk O, Floss T, Becker L, Bolle I, Favor J, Hans W, Hölter SM, Horsch M, Kallnik M, Kling E, Moerth C, Schrewe A, Stigloher C, Topp S, Gailus-Durner V, Naton B, Beckers J, Fuchs H, Ivandic B, Klopstock T, Schulz H, Wolf E, Wurst W, Bally-Cuif L,

-
- de Angelis MH, Graw J. : Pleiotropic effects in *Eya3* knockout mice., *BMC Dev Biol.*, 2008, 8:118.
- Takahashi N, Gray D, Strogantsev R, Noon A, Delahaye C, Skarnes WC, Tate PH, Ferguson-Smith AC. : ZFP57 and the Targeted Maintenance of Postfertilization Genomic Imprints., *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 2015, 80:177-87.
- Turinetto V, Giachino C. : Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions., *Nucleic Acids Res.*, 2015, 43(5):2489-98.
- Wang H and Dey SK. : Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet.*, 2006,;7(3):185-99.
- Wang J, Wang L, Feng G, Wang Y, Li Y, Li X, Liu C, Jiao G, Huang C, Shi J, Zhou T, Chen Q, Liu Z, Li W, Zhou Q. : Asymmetric Expression of LincGET Biases Cell Fate in Two-Cell Mouse Embryos., *Cell.*, 2018, 175(7):1887-1901.
- Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, Marques CJ, Zakhartchenko V, Boiani M, Arand J, Nakano T, Reik W, Walter J. : 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nature Communication.*, 2011, 2, 241.
- Wu G, Lei L, Schöler HR. : Totipotency in the mouse., *Journal of molecular medicine.*, 2017, 95(7):687-694.
- Wu T, Liu Y, Wen D, Tseng Z, Tahmasian M, Zhong M, Rafii S, Stadtfeld M, Hochedlinger K, Xiao A. : Histone variant H2A.X deposition pattern serves as a functional epigenetic mark for distinguishing the developmental potentials of iPSCs., *Cell Stem Cell.*, 2014, 15(3):281-294.
- Xu PX, Adams J, Peters H, Brown MC, Heaney S, Maas R.: *Eya1*-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia., *Nat Genet.*, 1999, 23(1):113-7.
- Xu PX, Woo I, Her H, Beier DR, Maas RL. : Mouse *Eya* homologues of the *Drosophila* eyes absent gene require Pax6 for expression in lens and nasal placode., *Development.*, 1997, 124(1):219-31.
-

- Yamamoto R, Abe K, Suzuki Y, Suzuki MG and Aoki F. : Characterization of gene expression in mouse embryos at the 1-cell stage. *The Journal of reproduction and development*. 2016, 62(1):87-92.
- Yamamoto R, Aoki F. : A unique mechanism regulating gene expression in 1-cell embryos. *The Journal of reproduction and development*., 2017, 63(1):9-11.
- Yeung CK, Wang G, Yao Y, Liang J, Tenny Chung CY, Chuai M, Lee KK, Yang X. : BRE modulates granulosa cell death to affect ovarian follicle development and atresia in the mouse., *Cell Death Dis.*, 2017, 8(3):e2697.
- Yin S, Jiang X, Jiang H, Gao Q, Wang F, Fan S, Khan T, Jabeen N, Khan M, Ali A, Xu P, Pandita TK, Fan HY, Zhang Y, Shi Q. : Histone acetyltransferase KAT8 is essential for mouse oocyte development by regulating reactive oxygen species levels., *Development*., 2017, 144(12):2165-2174.
- Yukawa M, Akiyama T, Franke V, Mise N, Isagawa T, Suzuki Y, Suzuki MG, Vlahovicek K, Abe K, Aburatani H, Aoki F.: Genome-wide analysis of the chromatin composition of histone H2A and H3 variants in mouse embryonic stem cells., *PLoS One*., 2014, 9(3):e92689.
- Zuccotti M, Giorgi Rossi P, Martinez A, Garagna S, Forabosco A, Redi CA. : Meiotic and developmental competence of mouse antral oocytes., *Biol Reprod.*, 1998, 58(3):700-4.

謝辞

本論文を完成するにあたり、卵や胚に関して全く分からなかった私に終始懇切丁寧なご指導ご鞭撻を賜りました東京大学 大学院新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 資源生物制御学分野 青木不学 教授に心より感謝申し上げます。

研究対象が異なるにもかかわらず貴重なご助言をくださいました同大学 大学院同分野 鈴木雅京 准教授のご厚意に感謝致します。

本研究を進めるにあたり様々な助言を頂きました、当研究室出身および所属の河村真愛氏、船屋智史 氏、峰翔太朗 氏、笠原良太 氏、王媛 氏、杉江拳太 氏に心から感謝致します。

他の研究室にも関わらず実験の手法のご教授と機材の使用を快く受けて頂きました、東京大学 大学院新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 動物生殖システム分野の皆様へ感謝致します。

本研究で実験するにあたり、抗TH2A抗体を提供して頂いた国立研究開発法人理化学研究所 分子遺伝学研究室 主任研究員 石井俊輔 教授に心より感謝申し上げます。

最後に、研究生活を行うにあたって暖かく応援して下さった家族に深く感謝致します。