

## 論文の内容の要旨

論文題目     マウス発生におけるH2A変異体の役割

氏    名     月岡 大

哺乳動物ではその生活環の中で様々な発生イベントが起きる。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制御されている。

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。一般的にクロマチン構造が緩むとその領域内にある遺伝子の発現は促進されることが知られている。さらにクロマチンの構成因子である 4 種類のコアヒストン(H2A、H2B、H3、H4)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。コアヒストンの中でも H2A には H2A を含め TH2A、H2A.X、H2A.Z、macroH2A など多くのヒストン変異体が存在する。しかし、H2A 変異体の中でも TH2A と H2A.X のマウス発生における役割が明らかになっていない。また、着床前初期発生期ではクロマチン構造の緩みがダイナミックに変化することが分かっており、中でも 1 細胞期胚期(受精卵)は最も緩いクロマチン構造を形成していることが明らかになっている。TH2A と H2A.X は着床前初期発生期の初期に多く核局在しており、クロマチン構造の緩みの変化と相関があるが、未だ着床前初期発生への TH2A と H2A.X の寄与については明らかになっていない。そこで本研究では、第一に哺乳動物であるマウス発生における TH2A と H2A.X の寄与について TH2A 欠損マウスおよび H2A.X 欠損マウスを用いて明らかにし、次いで、着床前初期発生期における TH2A と H2A.X のクロマチン構造と転写への寄与について明らかにすることとした。

発生における TH2A の寄与を明らかにするため TH2A ヘテロ変異体間の交配を行い、その仔の遺伝型の比について解析した。その結果、TH2A が両アリルで欠損した仔の割合は理論値(25%)から有意には外れていなかった。また、生後 21 日齢の TH2A 欠損マウスの体重について調べた結果、体重への影響は見られなかった。これらの結果より TH2A の欠損は初期胚発生およびその後の成長に寄与していないことが明らかになった。次に、TH2A を欠損した際の生殖能力への影響を明らかにするため、TH2A 欠損マウスを用いて交配を行い、得られた仔の数(産子数)

を求めた。その結果、TH2A 欠損雌マウスの産子数が減少しており、TH2A は雌の生殖能力に関与していることが示された。雌の生殖能力の低下の原因として、卵巣の発達、卵形成、母性 TH2A 欠損による着床前初期発生、また胎児の発生を支持する子宮機能などの異常が可能性として考えられた。しかし、これらについて解析したところ TH2A 欠損による異常を検出することはできなかった。これらの事から着床後の発生不良が新たな可能性として考えられた。また過去の研究で着床以前の DNA のメチル化(5mC)と H3K27me3(27 番目リジンのトリメチル化)は着床後の発生に関与することが報告されている。そこで最後に、母性 TH2A 欠損による DNA のメチル化(5mC)と H3K27me3(27 番目リジンのトリメチル化)の核局在レベルを調べた。その結果、母性 TH2A 欠損により、1 細胞期胚において 5mC レベルが雌雄の両前核で減少し、H3K27me3 レベルが雌性前核で減少していた。したがって、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となっていることが考えられる。

次に、発生における H2A.X の寄与を明らかにするため H2A.X ヘテロ変異マウス間の交配を行い、生後直後の仔の遺伝型の比について解析した。その結果、H2A.X 欠損マウスの出生率が減少することが分かった。さらに、生後 0 日目の体重では H2A.X 欠損マウスの体重が低かった。また一部の H2A.X 欠損マウスで眼球が形成されていない個体が見られた。次に、H2A.X 欠損マウスの出生率の減少がどの時期から起きているか明らかにするため、H2A.X ヘテロ変異体間の体外受精から得られた着床前初期発生期の最終ステージである胚盤胞期胚において遺伝型比を解析した。その結果、H2A.X 欠損胚は予想される比で発生していた。これらの結果から H2A.X の発生不良は着床後の初期胚から起きることが示された。また、興味深いことに H2A.X 欠損で見られた表現型は遺伝背景により変化することが明らかになった。今回、解析に用いた H2A.X 変異マウスは交雑種(BDF1)を元に 6 度の戻し交配を行って純系統(C57BL/6J)の遺伝背景に近づけたものである。この戻し交配の過程でその都度、H2A.X ヘテロ変異間の交配実験を行った結果、戻し交配 3 度目までは H2A.X 欠損マウスの出生率に有意差は検出されなかったが、戻し交配 4 度目以降の交配実験において H2A.X 欠損マウスの出生率に有意に減少が見られた。この結果から戻し交配の進行に伴い H2A.X 欠損マウスの出生率が減少したことが示された。これにはマウスの遺伝背景が C57BL/6J のものに近づいたことが起因していることが考えられたことから、最終の戻し交配を終えた H2A.X ヘテロ変異マウスと DBA/2 マウスを用いて、BDF1 遺伝背景を持つ H2A.X ヘテロ変異マウスを獲得し同様の交配実験を行った。その結果、H2A.X 欠損マウスの出生率は回復した。さらに、C57BL/6J 遺伝背景の H2A.X 欠損で見られた体重の減少や眼球形成の異常について BDF1 遺伝背景で解析したところ、C57BL/6J 遺伝背景と同様に BDF1 遺伝背景でも体重の減少は見られたが、眼球形成の異常は観察されなくなった。これらの結果からマウス発生において H2A.X は着床後初期胚発生および眼球の形成に寄与しているが、それらは遺伝背景に依存することが示された。

着床前初期胚への TH2A と H2A.X の機能を明らかにするため、初めに TH2A(または H2A.X)欠損 1 細胞期胚における TH2A(または H2A.X)の発現について解析した。その結果、1 細胞期胚で発現している TH2A と H2A.X のほとんどが卵由来の母性因子であることが明らかにな

った。次に、母性 TH2A または母性 H2A.X 欠損による着床前初期発生への影響について解析したところ、発生不良は見られなかった。しかし、これらが互いに相補し合うことで、初期発生への影響が見られなかったという可能性が考えられた。そこで、母性 TH2A および H2A.X 両欠損胚を作製し、その発生を調べたところ、2 細胞期より発生の遅延および停止が確認された。この結果から、母性 TH2A と H2A.X は着床前初期発生期において互いに機能を補償し合っていることが考えられた。次に、母性 TH2A、母性 H2A.X またはその両方を欠損したことによる、クロマチンの組成への影響を明らかにするため、他のヒストン変異体の核局在量について解析した。その結果、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。次に、FRAP 法を用いてクロマチン構造の緩みへのこれらの変異体欠損の影響について解析した。母性 TH2A 欠損胚ではクロマチン構造の緩みへの影響は見られなかったが、母性 H2A.X 欠損胚と母性 TH2A/H2A.X 欠損胚では、雄性前核において締まったクロマチン構造が形成されていることが明らかとなった。最後に各 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 細胞期胚で特異的に多く発現することが知られている遺伝子を RT-PCR で解析した。さらに、1 細胞期胚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や遺伝子間領域からの転写が起こることが知られていることから、それらの解析も行った。各 H2A 変異体の欠損は 1 細胞期胚で発現が開始する遺伝子とレトロトランスポゾンの *MuERV-L* の発現には影響がなかった。しかし、遺伝子間領域からの転写は母性 TH2A 欠損胚と母性 TH2A/H2A.X 欠損胚において抑制されていた。これらの結果より、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。このことから母性 TH2A/H2A.X 欠損胚においては、母性 TH2A 欠損によるクロマチン構造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変化が伴う遺伝子発現の異常という、それぞれ独立した作用が重なった結果、またはヌクレオソーム数が減少したことが発生不良を引き起こしたと考えられる。

TH2Aは雌の生殖能力に関与し、また1細胞期においてエピジェネティック修飾であるDNAのメチル化やヒストン修飾の維持に寄与しており、これが着床後の発生調節に関与していることが示唆された。H2A.Xは着床後の発生、眼球の形成に遺伝背景依存的に関与していることが示された。着床前初期発生において、TH2Aは遺伝子間領域からの転写に関与し、H2A.Xはクロマチン構造の緩みに関与していることが分かった。さらに、母性TH2AとH2A.Xを両方欠損することで初めて重大な発生不良が起きることが明らかになり、これは母性TH2Aと母性H2A.Xの欠損によるそれぞれの影響が重なった結果とヌクレオソーム数の減少が原因であると考えられる。本研究においてマウス発生におけるTH2AとH2A.Xの様々な役割について明らかにすることができた。