

## 第三章

着床期胚の休眠および活性化時における  
ヒストン修飾の変化

## 緒言

前章までの研究から、 $E_2$  の刺激の有無によって生じる休眠胚と活性化胚では、胚の総転写活性が大きく変化するだけでなく、各々の遺伝子の発現パターンも大きく変化することが明らかとなった。実際、着床期の胚盤胞では、卵巣からの  $E_2$  の刺激によって発現の上昇する遺伝子が、他にも数多く報告されている (Basak et al. 2002; Dardik et al. 1992; Mohamed et al. 2004; Paria et al. 1999; Raab et al. 1996; Smith et al. 1997; Wang et al. 2003; Zhao et al. 2000)。また、近年の DNA マイクロアレイを用いた解析でも休眠胚と  $E_2$  を投与し活性化させた胚の間で幅広い種類の遺伝子の発現パターンが変化することが報告された (Hamatani et al. 2004b)。しかし、このような遺伝子発現の変化を引き起こす制御機構は明らかになっていない。そこで本章では、着床期胚の遺伝子発現制御機構における  $E_2$  の役割を示すため、 $E_2$  の刺激の有無によって生じる着床期胚の休眠化と活性化において、遺伝子の発現パターンや転写量の変化を生み出すエピジェネティックな制御機構を明らかにすることを試みた。

ヒストン修飾は遺伝子発現を制御する主要なメカニズムである。クロマチンを構成するコアヒストン N 末端の Lysine 残基はアセチル化あるいはメチル化されることによって遺伝子発現の活性化あるいは抑制に関与する (Latham and Schultz 2001; Li 2002; van Steensel 2005)。ヒストン H3 および H4 の N 末端にはアセチル化される Lysine 残基が多数存在する。これらの残基はそれぞれアセチル化されるパターンや遺伝子発現への関与が異なる (Kurdistani et al. 2004; Lachner et al. 2003; Pokholok et al. 2005)。ヒストン H3 でアセチル化されることが知られている 4 カ所の Lysine 残基のうち、N 末端から 9 番目の Lysine 残基 (K9) と K18 は異なるヒストンアセチラーゼ (HAT) によってアセチル化され (Grant

et al. 1999; Lachner et al. 2003; Sterner and Berger 2000)、ゲノム上の異なる領域に修飾が付加されることが報告されている (Daujat et al. 2002)。アセチル化された K9 と K18 はどちらも遺伝子の活性化と関係するが (Kurdistani et al. 2004; Pokholok et al. 2005)、それぞれ独立して遺伝子の活性化へ関与していることが示唆されている (Daujat et al. 2002)。一方、ヒストン H4 でアセチル化される 4 カ所の Lysine 残基のうち、K5 および K12 はいくつもの共通の HAT によってアセチル化され (Kimura and Horikoshi 1998; Makowski et al. 2001; Smith et al. 1998)、染色体上の同じ領域に局在が見られ (Worrad et al. 1995)、共同して TAFII250 をリクルートすることで遺伝子発現を制御していることが報告されている (Huang et al. 2005)。

Lysine 残基のメチル化もまた遺伝子発現の制御において重要な役割を担っている。メチル化は修飾を受ける残基により全く逆の二つの機能を果たす。すなわちヒストン H3K4 のメチル化は転写の活性化に関わるのに対し、ヒストン H3K9 や H3K27 のメチル化は転写の抑制に働くのである。さらに、ヒストン H3K9 では三種類のメチル化状態、すなわちモノメチル化、ジメチル化、トリメチル化の機能もまたそれぞれ異なっていると考えられている (Arney and Fisher 2004; Lachner et al. 2003)。モノメチル化の機能は未だよくわかっていない。ジメチル化は哺乳類に見られる不活性化された X 染色体上など、条件的ヘテロクロマチンやユークロマチン内の不活性な領域に局在する (Rice et al. 2003; Rougeulle et al. 2004; Tachibana et al. 2005)。G9a や SETDB1 など、幾つかのヒストン H3K9 特異的ヒストンメチル転移酵素 (HMTase) はユークロマチン上に局在し遺伝子の抑制に関与する (Ogawa et al. 2002; Schultz et al. 2002; Tachibana et al. 2002)。これに対し、ヒストン H3K9 のトリメチル化修飾は構成的ヘテロクロマチンといわれるゲノムの凝集度が高い領域の形成に関与する (Arney and Fisher 2004)。Suv39h

はヒストン H3K9 のトリメチル化を触媒する HMTase で、セントロメア周辺のヘテロクロマチン内にあるサテライトリピート領域の Dnmt3b 依存的な DNA メチル化にも関与する (Adenot et al. 1997; Lehnertz et al. 2003; Peters et al. 2003; Schotta et al. 2004)。現在報告されている唯一のヒストン脱メチル化酵素である LSD1 は、ヒストン H3K9 のモノメチル化およびジメチル化修飾は脱メチル化できるが、トリメチル化は脱メチル化できない (Metzger et al. 2005)。このように、ヒストン H3K9 の異なったメチル化状態は、それぞれに特異的な HMTase あるいは脱メチル化酵素によって、不活性なクロマチンの中でも別の種類のドメイン上に修飾がなされるようである (Rice et al. 2003)。

遺伝子発現の制御に関わるエピジェネティックな修飾として、ヒストンが関わる別のタイプの修飾が存在する。ヒストン H3 (H3.1) の変異体であるヒストン H3.3 は DNA 複製非依存的に転写活性の高い領域に組み込まれる (Ahmad and Henikoff 2002b; Janicki et al. 2004)。したがって、ヒストン H3.3 による H3.1 の置換は、それまでにすでに修飾されて存在したヒストン H3.1 を除去することで遺伝子発現を調節している可能性がある。

胚盤胞期になると胚を構成する細胞は性質の異なる二種類の細胞、すなわち内部細胞塊 (ICM) と栄養膜細胞 (TE) へと分化を開始する。ICM は将来胚体へと分化し、TE は胎子側胎盤へと分化する。胚盤胞の時期から ICM と TE は遺伝子発現のパターンには相違が生じ始めており、このことから ICM や TE の転写活性を制御するエピジェネティック修飾にも相違が生じていると予測される。実際、幾つかのヒストン修飾は ICM と TE とで検出されたレベルが異なり (Morgan et al. 2005)、幾つかのクロマチン再構成遺伝子の発現も、ICM あるいは TE 由来の ES 細胞、TS 細胞でそれぞれ異なることが報告されている (Tanaka et al. 2002)。これらのクロマチン再構成遺伝子は休眠胚と活性化胚とで発現が異

なるという報告もある (Hamatani et al. 2004b)。したがって、休眠胚と活性化胚で ICM と TE とでは遺伝子発現の制御が異なることもあり得る。

このようにヒストン修飾は、遺伝子の転写活性と密接に関連しており (Kurdistani et al. 2004; Pokholok et al. 2005)、しかも修飾を受ける残基や修飾のレベルによって遺伝子発現への関与の程度や関与する遺伝子の数や種類も様々に異なっており、その機能も異なっていることが予測されている。そこで本章では、休眠胚と活性化胚に於ける様々なヒストン修飾のパターンを調べ、これらのヒストン修飾のうちいずれの修飾が、着床期の胚の休眠化や E2 投与時の胚の活性化における遺伝子発現の変化に関与しているのか、明らかにすることを試みた。本研究では、様々なヒストン修飾の中でも比較的解析が進んでいるヒストン H3K9 のアセチル化およびメチル化、ヒストン H3K18 のアセチル化、ヒストン H4 のアセチル化と H3.3 の置換について、交配後 4.0 日目の胚、および休眠胚と活性化胚における修飾を免疫染色により検出した。

---

## 材料と方法

### (1) 胚の採取

胚の採取は、第二章と同様に行った。交配後 4.0 日目の正常発生胚と、交配後 9.5 日目の休眠胚、および E<sub>2</sub> 投与後 16 時間の交配後 9.5 日目活性化胚を、WM を用いた子宮貫流により採取した。

### (2) 免疫染色

採取した胚は洗浄後、3.7% PFA/PBSで一晩4°Cにて固定した。固定した胚は0.3% BSA/PBSで洗浄後、0.5% Triton X-100で室温15分間処理し、細胞膜を可溶化した。その後0.3% BSA/PBSで洗浄し、一次抗体を含む0.3% BSA/PBS中に胚を移し、4°Cで一晩反応させた。一次抗体として、抗アセチル化H3K9抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, Cat. No. 9671)、抗アセチル化H3K18抗体 (Abcam, Cambridge, MA, Cat. No. ab1191)、抗アセチル化H4K5抗体 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, Cat. No. 06-759)、抗アセチル化H4K12抗体 (Upstate Biotechnology, Cat. No. 06-761k)、抗ジメチル化H3K9抗体 (Upstate Biotechnology, Cat. No. 07-212)、抗トリメチル化H3K9抗体 (Abcam, Cat. No. ab8898)、抗ヒストン H3.3 抗体 (Abcam, Cat. No. ab4263) を用いた。抗トリメチル化H3K9抗体は0.3% BSA/PBSにて100倍希釈して用い、その他の一次抗体は50倍希釈して用いた。0.3% BSA/PBSで洗浄後、胚に結合した一次抗体はFITC 標識の二次抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) により標識した。0.5 mg/ml propidium iodideと 50 µg/ml RNase Aを含むPBSで37°C、30分間処理してDNAを染色後、0.3% BSA/PBSで洗浄し、25%、50%、75% VectaShield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) /PBSに5分間ずつなじませて胚の形状を維持し、

VectaShieldに封入した。蛍光はCarl Zeiss LSM 510共焦点レーザースキャン顕微鏡で検出した。

## 結果

### (1) ヒストン H3K9 のアセチル化

成体の体細胞を用いたこれまでの研究では、ヒストン H3K9 のアセチル化修飾は遺伝子を多くコードしている領域の、特に制御領域で高いレベルで検出されており (Roh et al. 2005)、多くの遺伝子の転写活性化に関与することが報告されている (Kurdistani et al. 2004; Martin et al. 2004)。しかし本研究ではこの修飾レベルは、胚の総転写活性の変化に対して相関した変化を示さなかった (図 3-1)。ICM と TE を比べた場合、交配後 4.0 日目の胚、休眠胚、活性化胚のいずれも修飾のレベルは常に ICM より TE で高かった。核内での局在をより詳細に観察したところ、ヒストン H3K9 のアセチル化シグナルは PI の染まりの弱い、ユークロマチンと考えられる空間に斑状に分布していた (図 3-2)。

### (2) ヒストン H3K18 のアセチル化

ヒストン H3K18 のアセチル化修飾は、ヒストン H3、H4 のアセチル化サイトの中でもとりわけ転写活性との高い相関が報告されている (Kurdistani et al. 2004)。しかし今回は、ヒストン H3K9 のアセチル化修飾と同様に転写活性との相関は認められなかった。ヒストン H3K18 のアセチル化シグナルはいずれの胚の ICM でも高く検出された (図 3-3)。興味深いことに、休眠胚や活性化胚でのシグナルは ICM の中でも原始内胚葉では低く胚盤葉上層になる細胞で高かった。このような結果から、ヒストン H3K18 のアセチル化修飾は、胚盤胞においては細胞の多能性の維持に関わる遺伝子の発現に関与しており、従って分化の進んでいない多能性の高い細胞で修飾量が高く、分化が進行するにつれて低下した可能性が示唆された。核内では、活性化胚の TE は PI の染まりの弱い、ユーク



ロマチンと考えられる空間に斑状のシグナルが見られ、その他の胚では PI で強く染まった部分の周囲を取り巻く形のシグナルが検出された (図 3-4)。

### (3) ヒストン H4K5 と H4K12 のアセチル化

ヒストン H4K5 と H4K12 はどちらも Hat1、Esa1、そして Tip60 等の酵素によってアセチル化され (Kimura and Horikoshi 1998; Makowski et al. 2001; Parthun et al. 1996; Smith et al. 1998)、そのアセチル化修飾は遺伝子の活性化と相関している。ヒストン H4 のアセチル化はまず K16 から開始され、次に K8 と K12 がアセチル化されて最後に K5 がアセチル化される傾向がある (O'Neill and Turner 1995; Thorne et al. 1990; Turner and Fellows 1989)。従って K5 のアセチル化はヒストン H4 が高アセチル化状態にあることを示していると考えられる。そこでまず、K5 のアセチル化修飾の検出を試みた。しかし残念なことに、抗アセチル化 H4K5 抗体が胚の免疫染色に適当でなく明瞭な画像が得られなかった。このため次にヒストン H4K12 のアセチル化修飾の検出を試みた。

ヒストン H4K12 のアセチル化レベルはいずれの種類の胚でもほとんど変化が見られず、転写活性との相関は検出されなかった (図 3-5)。シグナルのパターンも三種類の胚間で同様であり、いずれの胚も TE のシグナルの方が ICM より高かった。核内では核小体以外の核内全体に斑状のシグナルが散在していた (図 3-6)。

### (4) ヒストン H3K9 のジメチル化とトリメチル化

ヒストン H3K9 のジメチル化とトリメチル化修飾は、共に HP1 やポリコーム複合体などのヘテロクロマチン構成に関わる因子をリクルートすることで、遺伝子発現を抑制することが知られている (Czermin et al. 2002; Kondo et al. 2004;

Kuzmichev et al. 2002; Lachner et al. 2003; Lund and van Lohuizen 2004; van Steensel 2005)。

ヒストン H3K9 ジメチル化修飾のシグナルは、いずれの胚でも TE では低く検出された (図 3-7)。ICM では休眠胚のみで高いシグナルが検出された。核内では、活性化胚の TE でのみ、ユークロマチンと考えられる領域に斑状のシグナルが検出された (図 3-8)。その他の部位や胚では、ほとんどのシグナルが PI で強く染まるヘテロクロマチンと考えられる領域に局在しており、これらの核ではヒストン H3K9 のジメチル化がヘテロクロマチンの形成に関与しているものと推察された。

ヒストン H3K9 トリメチル化修飾のシグナルは、ICM ではいずれの胚の核でも常に低かった (図 3-9)。TE では活性化胚でのみ核に明確なシグナルが検出され、そのほかの胚ではシグナルは低かった。核内では、ヘテロクロマチンと思われる DNA が凝集した塊状の部分に強いシグナルが検出され、ヒストン H3K9 のトリメチル化修飾は、ジメチル化修飾と共にヘテロクロマチン領域で遺伝子の不活化に関与していることが示唆された (図 3-10)。

### (5) ヒストン H3.3

ヒストン H3.3 は DNA 複製非依存的にヌクレオソーム内に組み込まれ、細胞周期を通して転写活性の高い領域に蓄積する (Ahmad and Henikoff 2002b; Mito et al. 2005; Schwartz and Ahmad 2005)。

ヒストン H3.3 のシグナルレベルは、三種類の胚間での総転写活性の相違とよく相関していた。すなわち、ヒストン H3.3 のシグナルは交配後 4.0 日目胚と活性化胚で高く、休眠胚では低く検出された (図 3-11)。このような結果は、ヒストン H3.3 が胚盤胞における E<sub>2</sub> 依存的な転写活性の制御において何らかの関与を

していることを示唆している。核内では、核小体にヒストン H3.3 の強いシグナルが局在し、ユークロマチン領域には比較的低いシグナルが分布していた（図 3-12）。核小体へのシグナルの局在は交配後 4.0 日目の胚と活性化胚において顕著であり、休眠胚では核小体のシグナルの低下が著しかった。

## 考察

本章では、着床期の胚の休眠化および活性化における遺伝子発現の変化に対して関連しうる様々なエピジェネティックな修飾の変化を調べ、このうち幾つかの修飾が胚の総転写活性の変化に対応した変化を示すことを明らかにした。結果の概要を表 3-1 に示す。本研究では、調べた複数のヒストン修飾のうちヒストン H3.3 と H3K9 のジメチル化修飾だけが総転写活性の変化に相関または逆相関した変化を示した (図 3-7、11)。この結果は、この二つの修飾が、着床期胚の休眠化あるいは活性化時における広範な遺伝子発現の変化に関して重要な役割を担っていることを示唆するものである。

ヒストン H3.3 が転写活性の盛んな領域に組み込まれていることを示した報告は数多い (Ahmad and Henikoff 2002b; Janicki et al. 2004; McKittrick et al. 2004; Mito et al. 2005; Schwartz and Ahmad 2005)。本研究でもこれらの報告と一致する結果を得た。すなわち総転写活性の低い休眠胚ではヒストン H3.3 のレベルは低く、総転写活性の高い交配後 4 日目胚や活性化胚ではヒストン H3.3 のレベルも高かった。また、ヒストン H3.3 の検出量の変化は、核小体において特に顕著であった。ヒストン H3.3 の強いシグナルは活性の高い胚の核小体でのみ観察され、休眠胚の核小体では観察されなかった。ヒストン H3.3 は、rRNA をコードした rDNA の活性の高い領域に組み込まれているという報告がある (Ahmad and Henikoff 2002a; Ahmad and Henikoff 2002b)。したがって、活性化胚に於いて核小体でヒストン H3.3 の組み込みが増加したことは、ヒストン H3.3 が rRNA の合成を盛んにし、しいては翻訳効率の上昇を促していることを示唆するものである。実際、休眠胚が活性化した時にはタンパク質合成も急上昇するという報告もある (Nieder et al. 1987)。また酵母では、rDNA 領域の不活性化メカニズムの一つと

して、Sir2 の関与が報告されている。Sir は低アセチル化状態のヒストン H3 や H4 と相互作用し、SIR 複合体を作ってクロマチン上に広がり遺伝子をサイレンシングする (Moazed 2001)。このことから、マウス着床期胚では、胚の活性化時にヒストン H3 (H3.1) に代わって H3.3 がヌクレオソーム内に組み込まれることにより、rDNA 領域のクロマチン上から SIR 複合体を除去し、rDNA の転写を活性化させている可能性も考えられる。

このようにヒストン H3.3 置換の促進は、活性の高い胚に於いて様々な遺伝子の転写活性を高めるだけでなく、活性化した胚に残存する mRNA の翻訳効率を上げることで迅速な細胞活性の回復を可能にしていることが示唆された。しかし、このようなヒストン H3.3 置換量の変化が E<sub>2</sub> からのシグナルによって引き起こされるメカニズムは明らかではない。

これに対し、ICM におけるヒストン H3K9 ジメチル化修飾量の変化は休眠胚で高く、活性化胚で減少しており、この変化はヒストン H3K9 ジメチル化修飾が、ICM で発現する着床期の胚発生進行に必須な遺伝子の発現を休眠中には一時的に抑制し、胚の活性化時に発現させる機構として貢献していることを示していると考えられる。休眠胚と活性化胚を比較した場合、発現量が変化する遺伝子の中には、TE 由来の TS 細胞よりも ICM 由来の ES 細胞で発現が高いことが報告されている遺伝子が数多く存在し (Hamatani et al. 2004b; Tanaka et al. 2002)、これらの遺伝子は着床期胚でも TE よりも ICM で高い発現をしていると予測される。このことから、ヒストン H3K9 ジメチル化修飾は着床期の胚発生進行に関与するこれらの遺伝子が休眠期に発現するのを抑制していることが示唆される。

ヒストンのメチル化修飾は、これまで安定的な修飾であり比較的長期に渡って遺伝子発現を抑制制御すると認識されてきた (Kondo et al. 2004; Lachner et al.

2003; van Steensel 2005)。しかし、本結果はヒストン H3K9 のジメチル化修飾が、短期間のうちに容易に変化する事を示唆している。本研究では、休眠胚の ICM に見られたジメチル化修飾は、母体に E<sub>2</sub> を投与してからわずか 16 時間の後の活性化胚では、ほとんど失われることが示された。また、H3K9 を特異的にメチル化する HMTase 活性を持つ E2F6.com-1 は HP1 $\gamma$  を介してターゲットプロモーターに結合し、G0 期の遺伝子発現の抑制に関わるという報告も (Ogawa et al. 2002)、ヒストン H3K9 ジメチル化修飾の柔軟な可逆性を支持する。このような迅速な修飾量の変化機構には二つの可能性が考えられる。一つは近年報告された新規の脱メチル化酵素 LSD1 の関与である。LSD1 はヒストン H3K9 のモノメチル化およびジメチル化修飾を特異的に脱メチル化する能力を有する (Metzger et al. 2005; Shi et al. 2004)。この酵素の発現や活性が休眠胚の活性化時には急増しているのかもしれない。また一つには、K9 がメチル化されたヒストン H3.1 が、K9 がメチル化されていないヒストン H3.3 と置換されることでその領域の脱メチル化が進行していることも考えられる。実際、活性化された胚では組み込まれたヒストン H3.3 の量が増加していた。

さらに、活性化胚の TE でヘテロクロマチンでなくユークロマチン上に斑状のヒストン H3K9 ジメチル化シグナルが検出されたことは、この修飾がユークロマチン上で、クロマチンの凝集を伴わない転写の不活性化に関与している可能性を示すものである。ヒストン H3K9 ジメチル化修飾と共に、そのメチル化酵素である G9a やジメチル化修飾に結合する HP1 $\gamma$  もユークロマチンに局在するという報告はこれを支持する (Arney and Fisher 2004; Jones et al. 2000; Ogawa et al. 2002; Tachibana et al. 2005)。

すなわち、ヒストン H3K9 ジメチル化修飾は G9a や E2F6.com-1 によって付加され、HP1 $\gamma$  をリクルートすることで、条件的ヘテロクロマチンやユークロマチ

ン内にある特定の領域の遺伝子発現を一時的に抑制する機能を果たすものと考えられる。休眠胚のように G0 期にある細胞では、ヒストン H3K9 ジメチル化修飾は一時的に不要になった遺伝子の発現を抑え、G1 期への回復時に再び抑制を解除する柔軟な発現抑制メカニズムとして働いていると考えられる。

これまでの報告では、ヒストン H3K9 や K18 のアセチル化修飾は転写活性と強い相関があり (Kurdistani et al. 2004; Pokholok et al. 2005)、またヒストン H3K9 メチル化修飾は転写活性の抑制に関わっていることが示されている (Kondo et al. 2004; Lachner et al. 2003; van Steensel 2005)。しかし、本研究の結果では、調べたすべてのアセチル化修飾とヒストン H3K9 のトリメチル化修飾については総転写活性の変化との明らかな相関が認められなかった (表 3-1)。この結果より、ヒストンのアセチル化修飾やメチル化修飾によって転写活性が制御される遺伝子のうちで、この時期に遺伝子領域の修飾量が変化して発現量が変化した遺伝子は、その一部だけだったと考えられる。実際、休眠胚と活性化胚を比較した場合、発現量が大幅に変化する遺伝子数は約 2 万の遺伝子中で約 200 遺伝子と限られており (Hamatani et al. 2004b)、それ以前の胚発生において一回の卵割の前後で変化する遺伝子数と比べると、それは顕著に少ない (Hamatani et al. 2004a)。

ヒストン H4K12 のアセチル化修飾は、転写活性との相関を示した報告も存在するが (Durrin et al. 1991; Schubeler et al. 2004)、本研究ではヒストン H4K12 のアセチル化修飾は胚の総転写活性との相関を示さなかった。この結果は、ヒストン H4K12 のアセチル化修飾量は転写活性との相関が低いという、酵母における広範な遺伝子の解析結果と一致する (Kurdistani et al. 2004; Pokholok et al. 2005)。この結果はヒストン H4 のアセチル化修飾が、着床期の胚に於いては転写を活性化させる修飾としてではなく、むしろ遺伝子の発現パターンを次世代に遺伝させる「メモリーマーク」として働いている可能性を示している (Turner

1998; Smith et al. 2002)。

ヒストン H3K9 のトリメチル化修飾は、細胞の分化に関与している可能性がある。ヒストン H3K9 のトリメチル化修飾は HP1 $\alpha$  や HP1 $\beta$ 、その他の複合体構成因子とヘテロクロマチンを形成し、遺伝子発現の抑制制御に関与するといわれている (Lachner et al. 2003; Schotta et al. 2004)。しかし、本結果では、総転写活性の低い休眠胚でシグナルが低く、総転写活性の高い活性化胚の TE で高いシグナルが検出された (図 3-9、表 3-1)。これは、未分化の胚でシグナルが低く、分化の進行した TE でトリメチル化修飾が上昇したと見ることもできる。また、同じ TE 由来の TS 細胞でも、採取した胚の発生段階に依存して、TS から発現する遺伝子のプロファイルは異なっており (Tanaka et al. 2002)、TE は発生の進行に伴い徐々に多能性を失ってゆくことが示唆されている。これらの報告は、ヒストン H3K9 のトリメチル化修飾が分化によって不要になった遺伝子を安定的に、場合によっては半永久的に不活性化する機構として機能している可能性を示唆するものである。

以上のように、着床期胚の休眠化や活性化において、複数のヒストン修飾はそれぞれに異なった修飾パターンを示し、中でも H3K9 のジメチル化修飾と H3.3 の置換は、胚の休眠化や活性化に伴う転写活性の変化に関連して修飾レベルが変化することが示された。休眠胚の ICM で検出された H3K9 のジメチル化修飾の変化は、この修飾が特に ICM において、着床期胚の発生進行に関わる遺伝子の発現を抑制していることを示唆しており、ヒストン H3.3 の核小体への局在は、このヒストンが rRNA 合成を促進することで、活性化胚における翻訳効率を増加させていることを示唆するものである。そしてこれらの修飾は、着床期胚においても E<sub>2</sub> の刺激によってその修飾レベルを変化させ、遺伝子発現を制御しているものと考えられる。



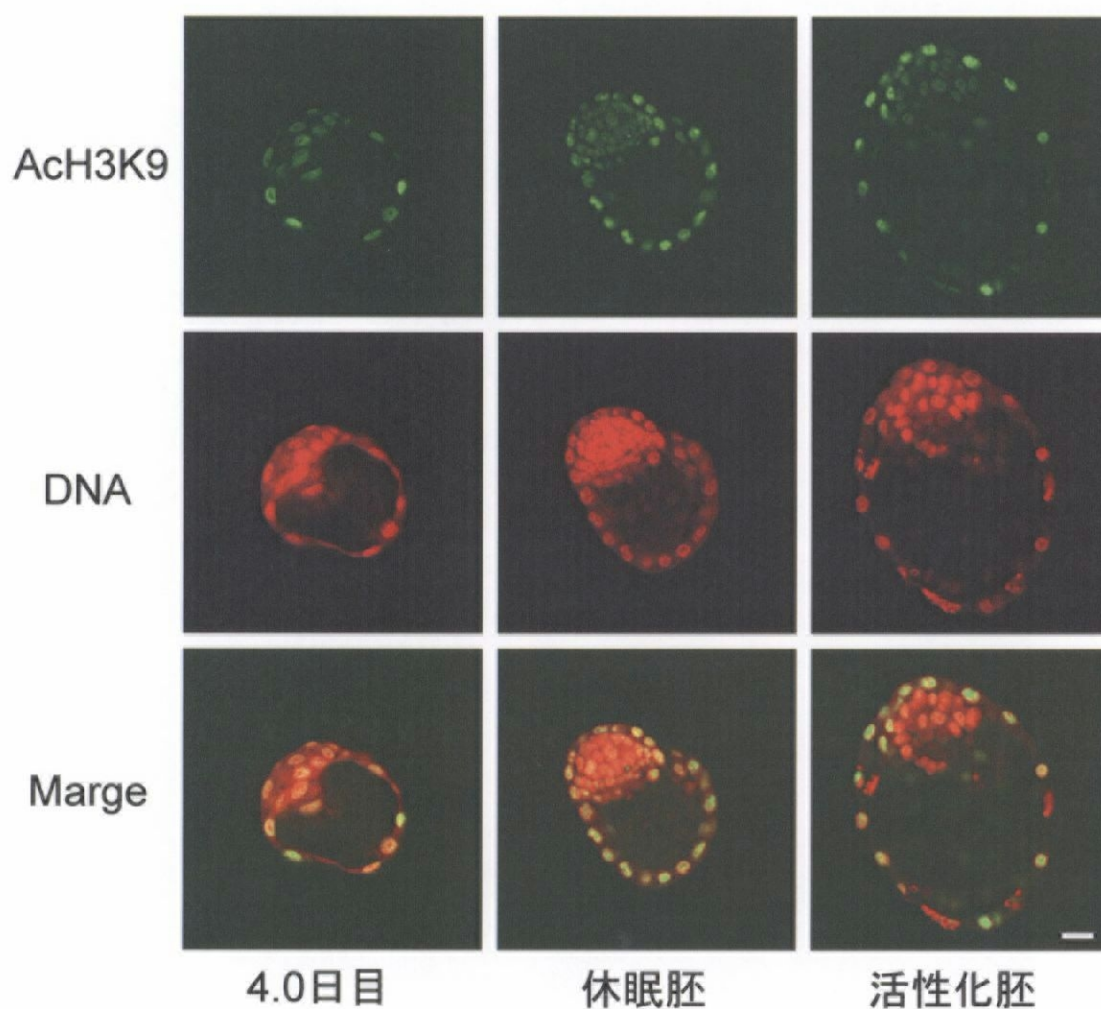


図 3-1 交配後 4.0 日目胚、休眠胚、活性化胚におけるアセチル化ヒストン H3 Lysine 9 (AcH3K9) の検出

抗 AcH3K9 特異的抗体を用いて免疫染色を行い、FITC 標識二次抗体を用いて検出した。DNA 染色には propidium iodide を用いた。実験は独立して 3 度行い同様の結果を得た。白棒線は 20  $\mu\text{m}$  を示す。

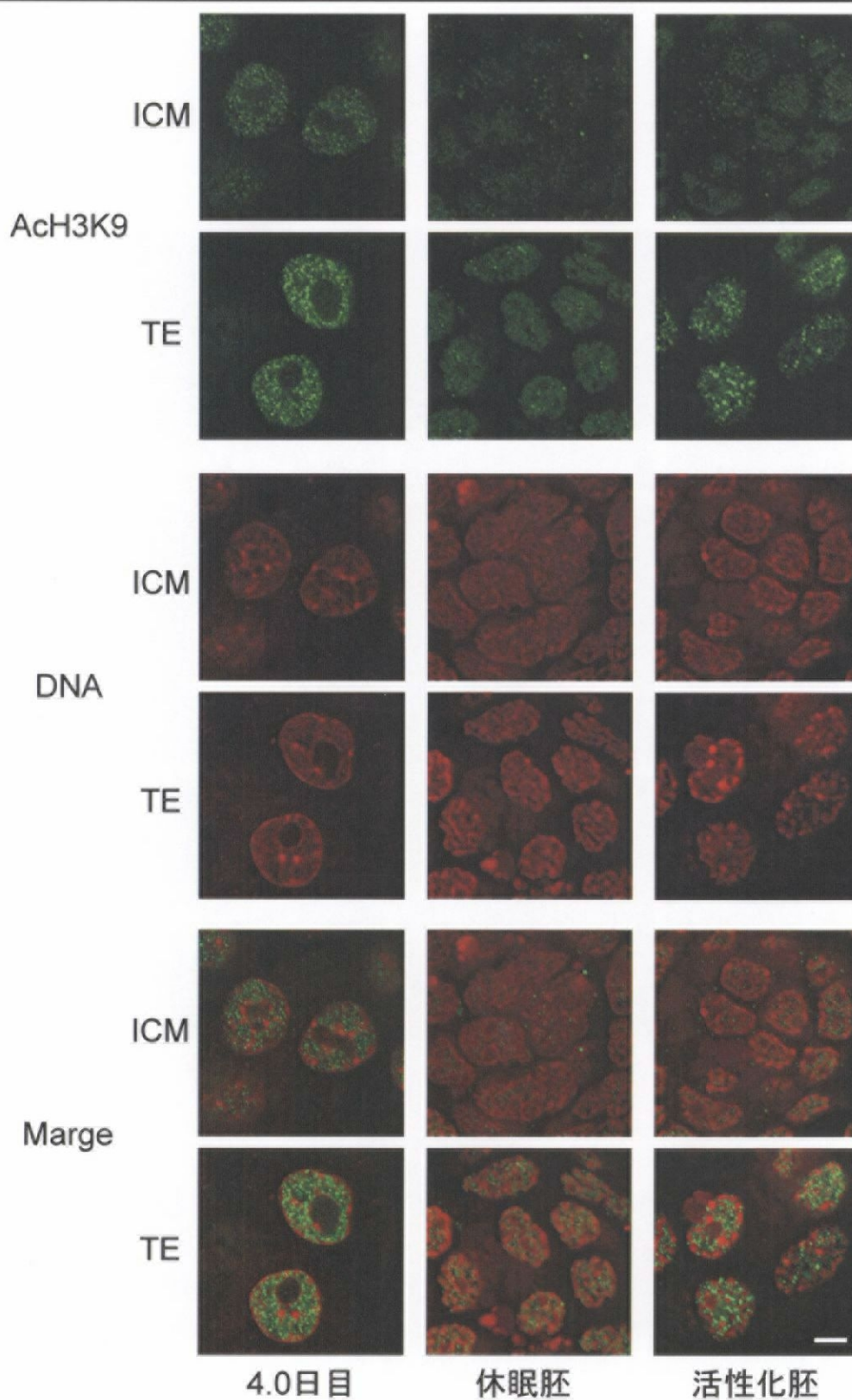


図 3-2 交配後 4.0 日目胚、休眠胚、活性化胚における AcH3K9 の検出  
それぞれの胚の ICM または TE の細胞を拡大して示す。白棒線は 5  $\mu\text{m}$  を示す。

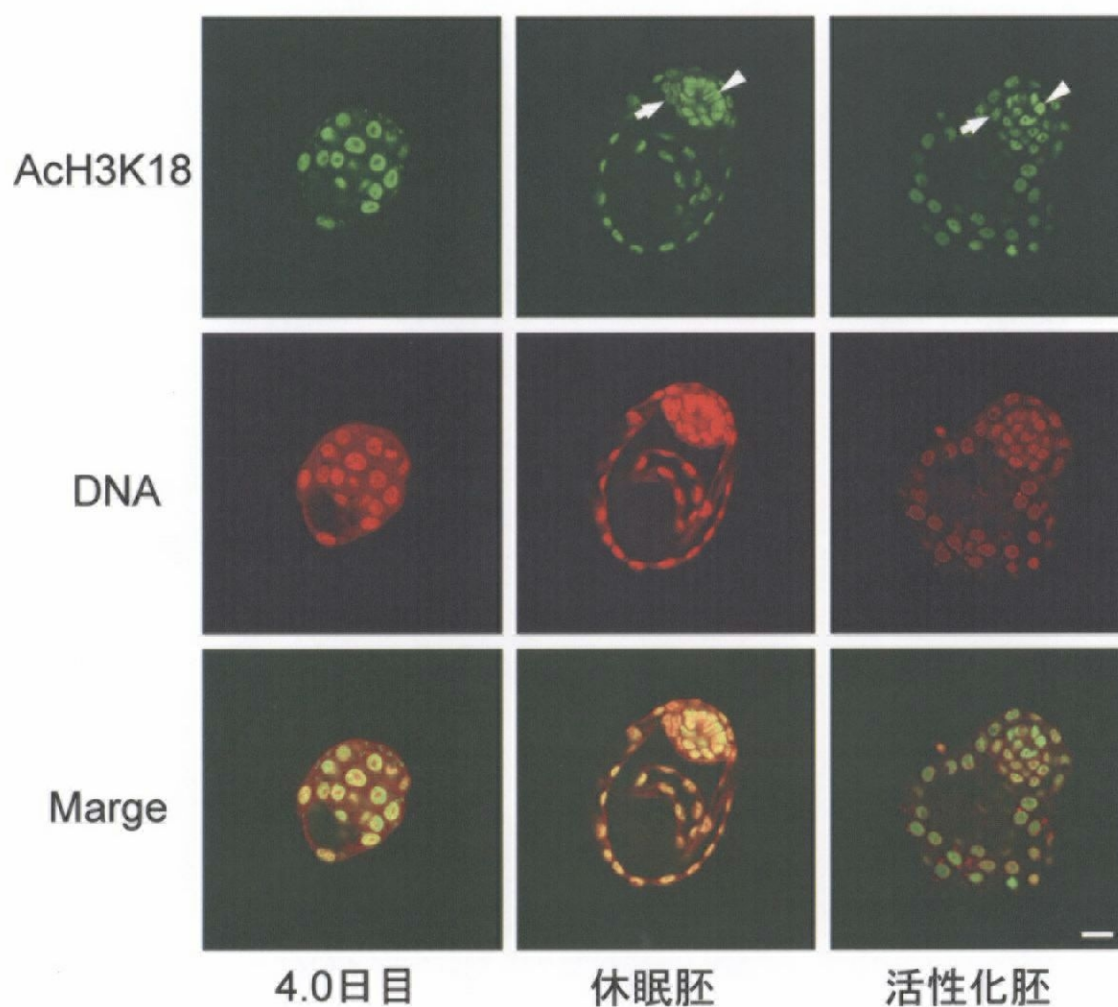


図 3-3 交配後 4.0 日目胚、休眠胚、活性化胚におけるアセチル化ヒストン H3 Lysine 18 (AcH3K18) の検出

抗 AcH3K18 特異的抗体を用いて免疫染色を行い、FITC 標識二次抗体を用いて検出した。DNA 染色には propidium iodide を用いた。実験は独立して 3 度行い同様の結果を得た。矢印は原始内胚葉の細胞、矢頭は胚盤葉上層になる細胞を示す。白棒線は 20  $\mu\text{m}$  を示す。



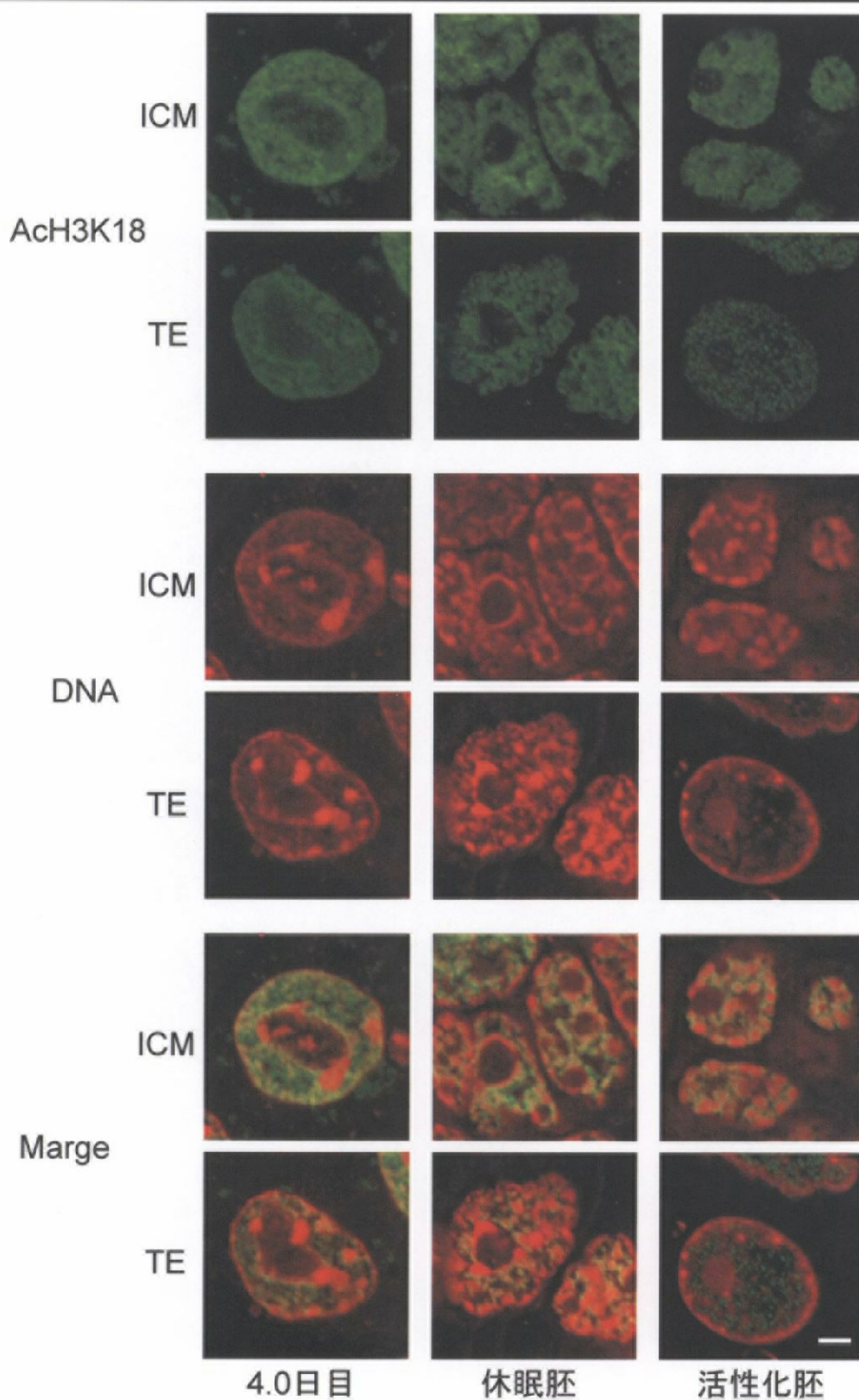


図 3-4 交配後 4.0 日目胚、休眠胚、活性化胚における AcH3K18 の検出  
それぞれの胚の ICM または TE の細胞を拡大して示す。白棒線は 5  $\mu\text{m}$  を示す。

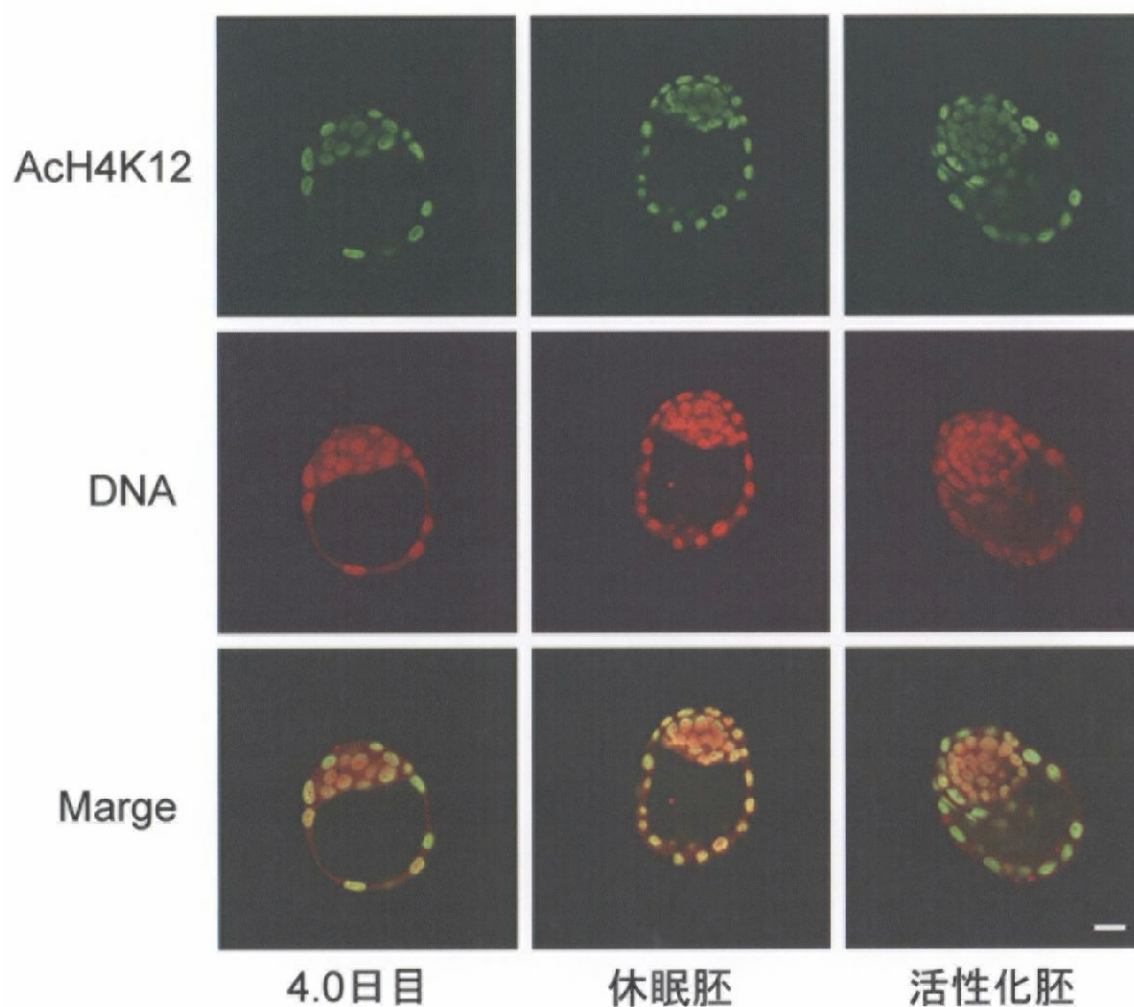


図 3-5 交配後 4.0 日目胚、休眠胚、活性化胚におけるアセチル化ヒストン H4 Lysine 12 (AcH4K12) の検出

抗 AcH4K12 特異的抗体を用いて免疫染色を行い、FITC 標識二次抗体を用いて検出した。DNA 染色には propidium iodide を用いた。実験は独立して 3 度行い同様の結果を得た。白棒線は 20  $\mu\text{m}$  を示す。

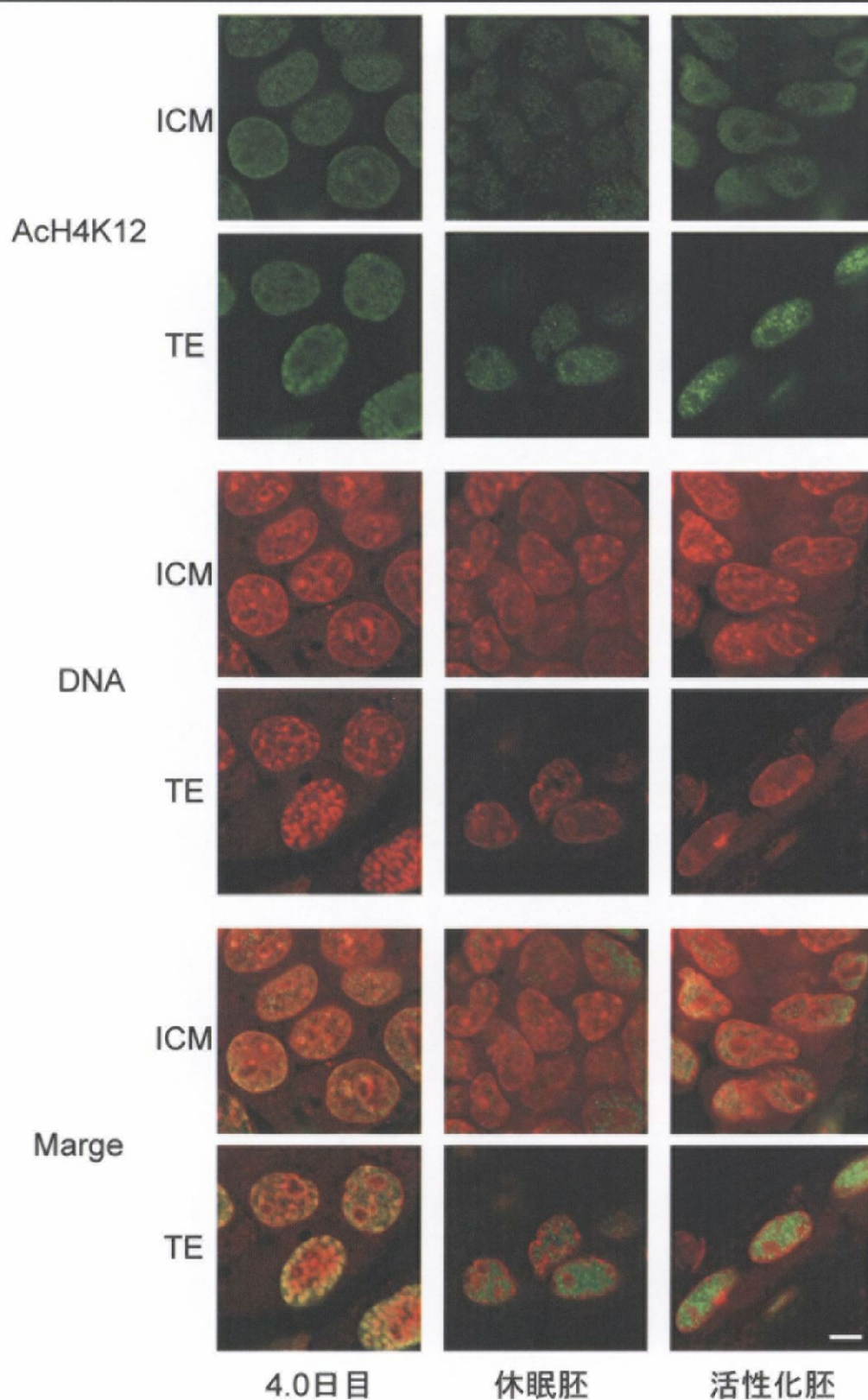


図 3-6 交配後 4.0 日目胚、休眠胚、活性化胚における AcH4K12 の検出  
それぞれの胚の ICM または TE の細胞を拡大して示す。白棒線は 5  $\mu\text{m}$  を示す。



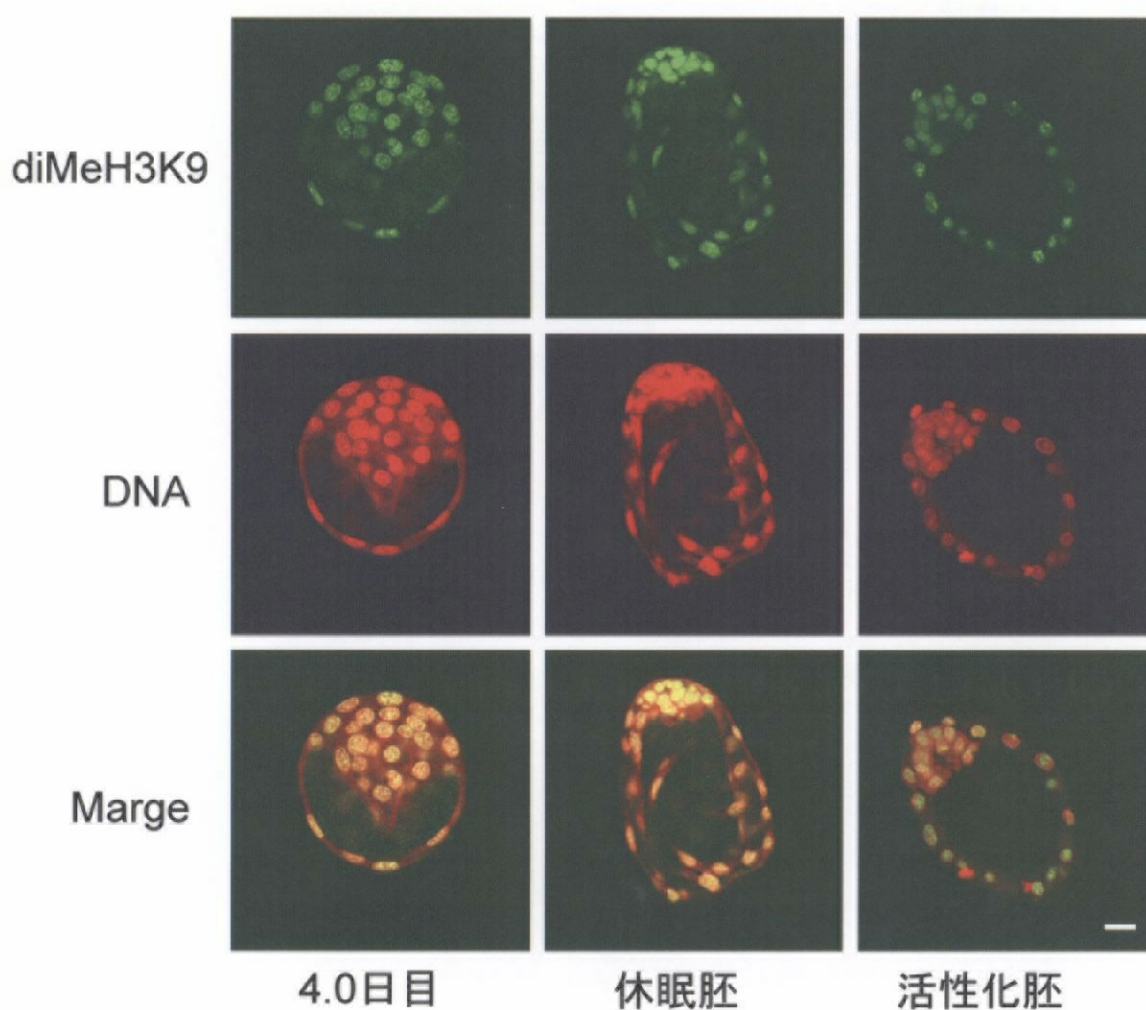


図 3-7 交配後 4.0 日目胚、休眠胚、活性化胚におけるジメチル化ヒストン H3 Lysine 9 (diMeH3K9) の検出

抗 diMeH3K9 特異的抗体を用いて免疫染色を行い、FITC 標識二次抗体を用いて検出した。DNA 染色には propidium iodide を用いた。実験は独立して 3 度行い同様の結果を得た。白棒線は 20  $\mu\text{m}$  を示す。

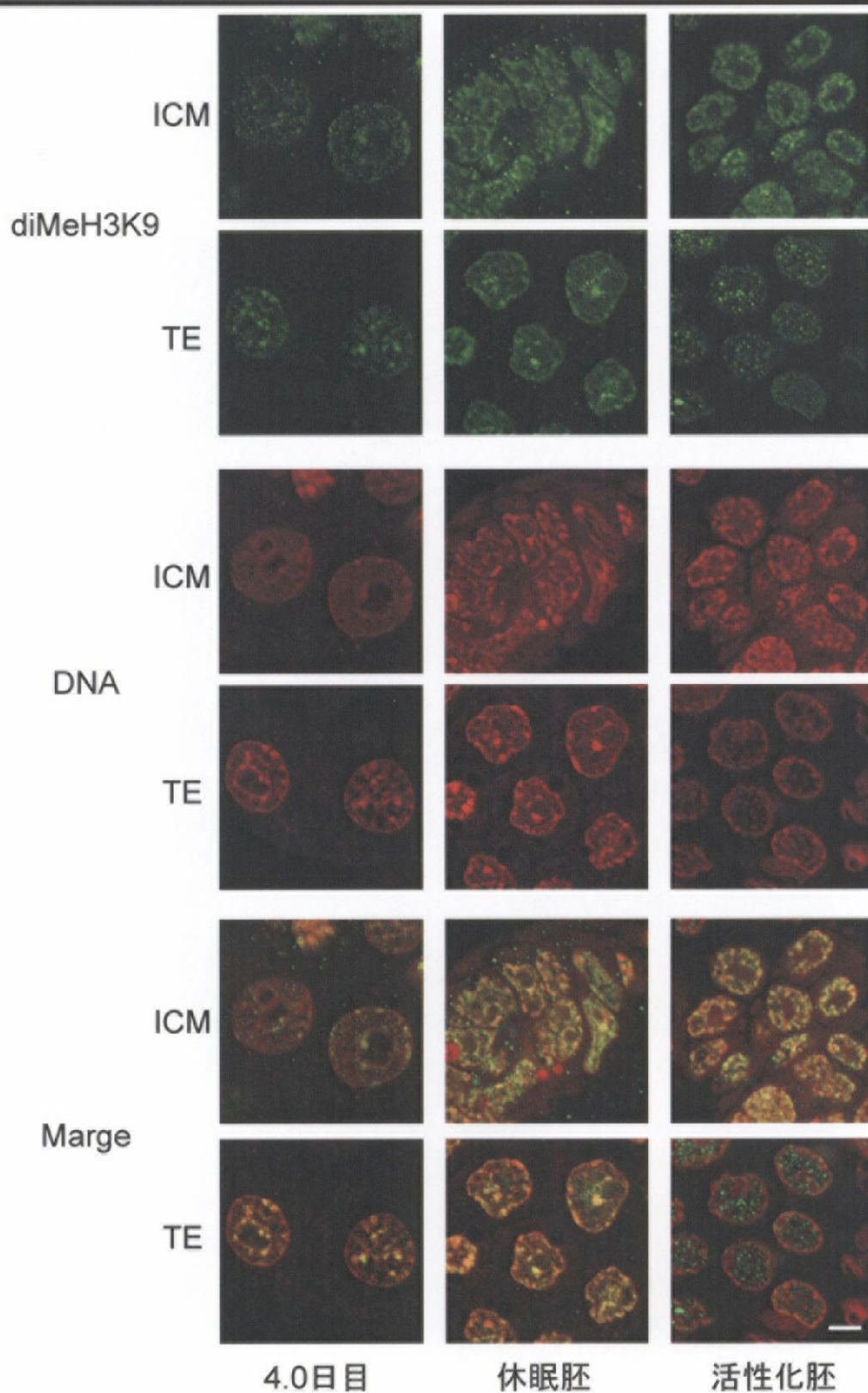


図 3-8 交配後 4.0 日目胚、休眠胚、活性化胚における diMeH3K9 の検出  
それぞれの胚の ICM または TE の細胞を拡大して示す。白棒線は 5  $\mu$ m を示す。



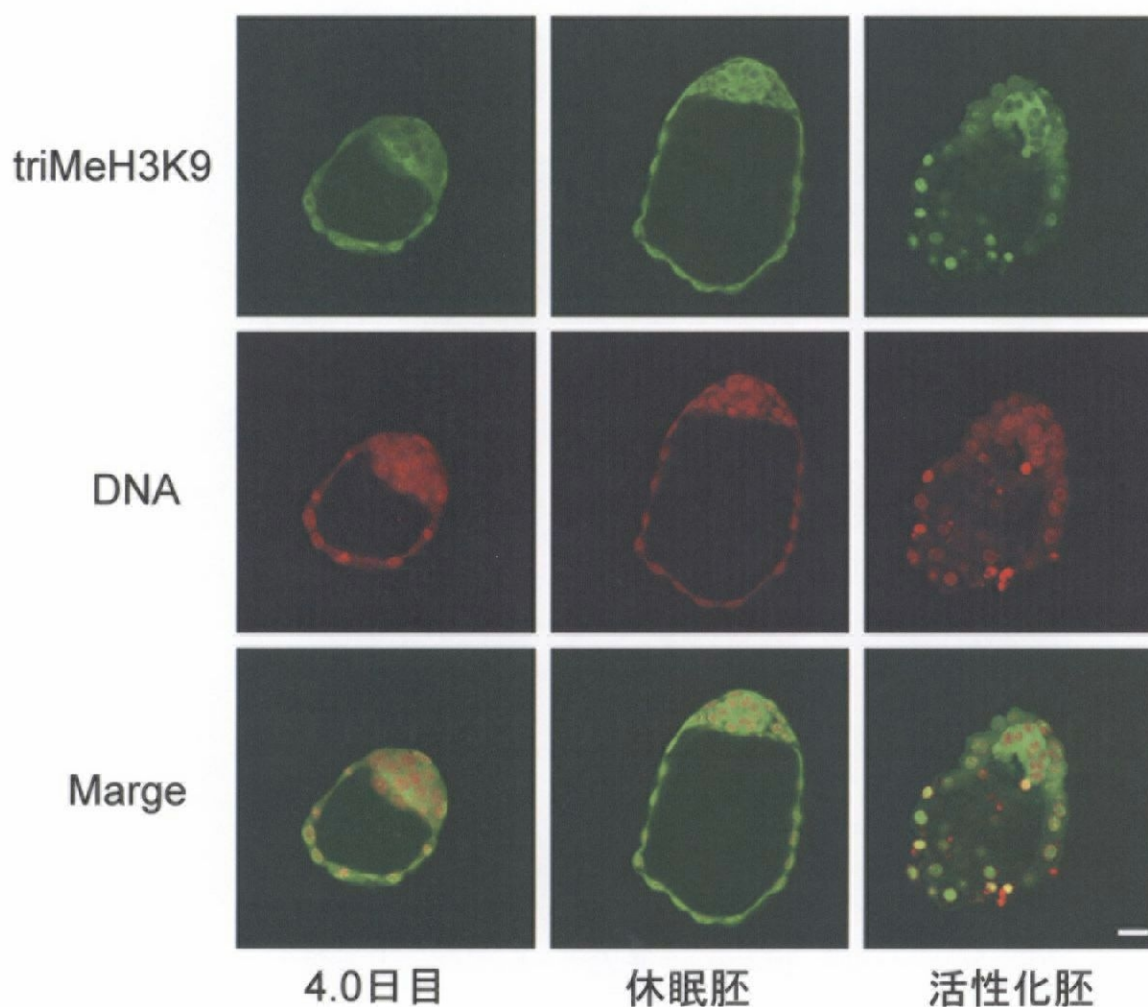


図 3-9 交配後 4.0 日目胚、休眠胚、活性化胚におけるトリメチル化ヒストン H3 Lysine 9 (triMeH3K9) の検出

抗 triMeH3K9 特異的抗体を用いて免疫染色を行い、FITC 標識二次抗体を用いて検出した。DNA 染色には propidium iodide を用いた。実験は独立して 3 度行い同様の結果を得た。白棒線は 20  $\mu\text{m}$  を示す。

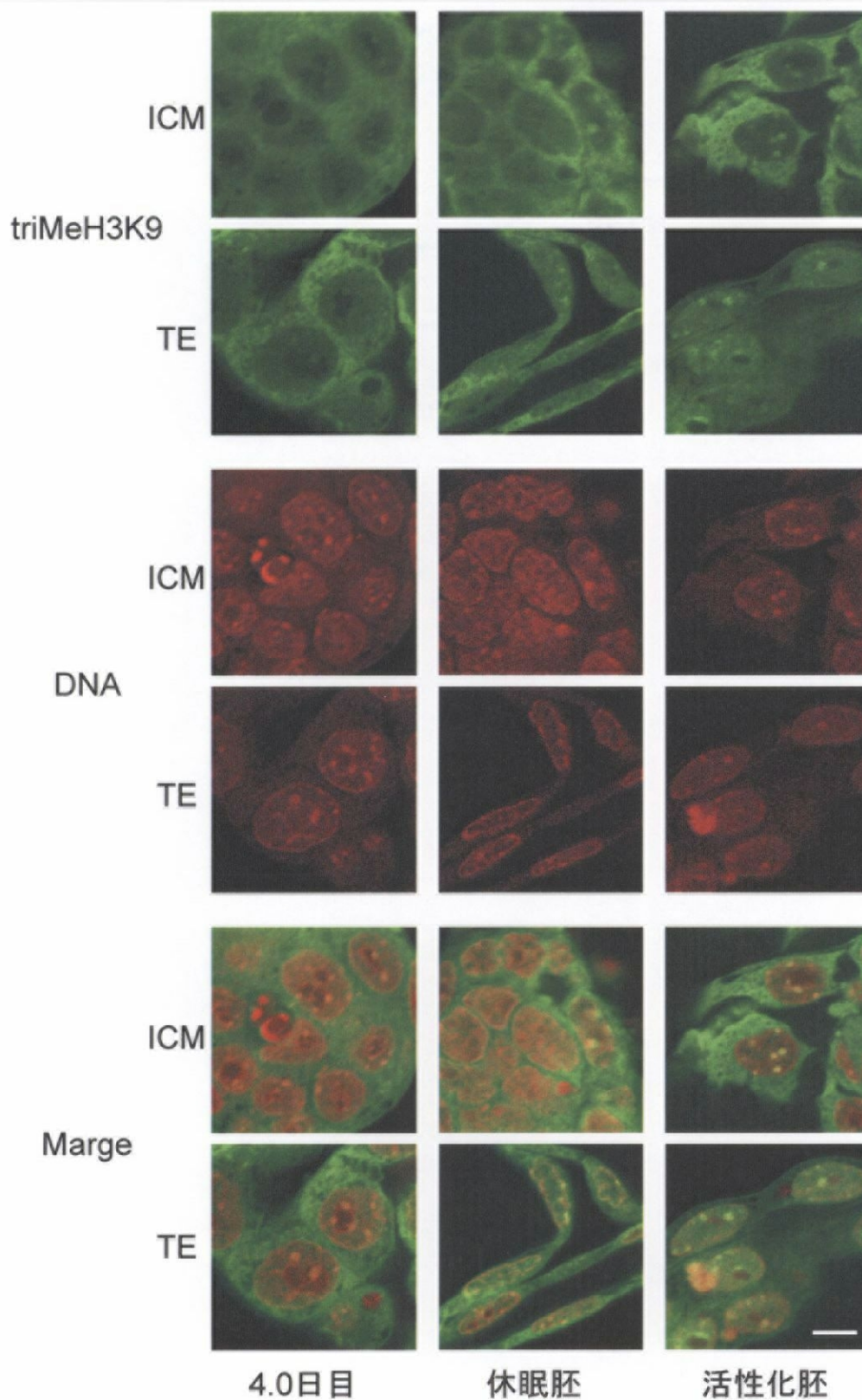


図 3-10 交配後 4.0 日目胚、休眠胚、活性化胚における triMeH3K9 の検出  
それぞれの胚の ICM または TE の細胞を拡大して示す。白棒線は 5  $\mu$ m を示す。

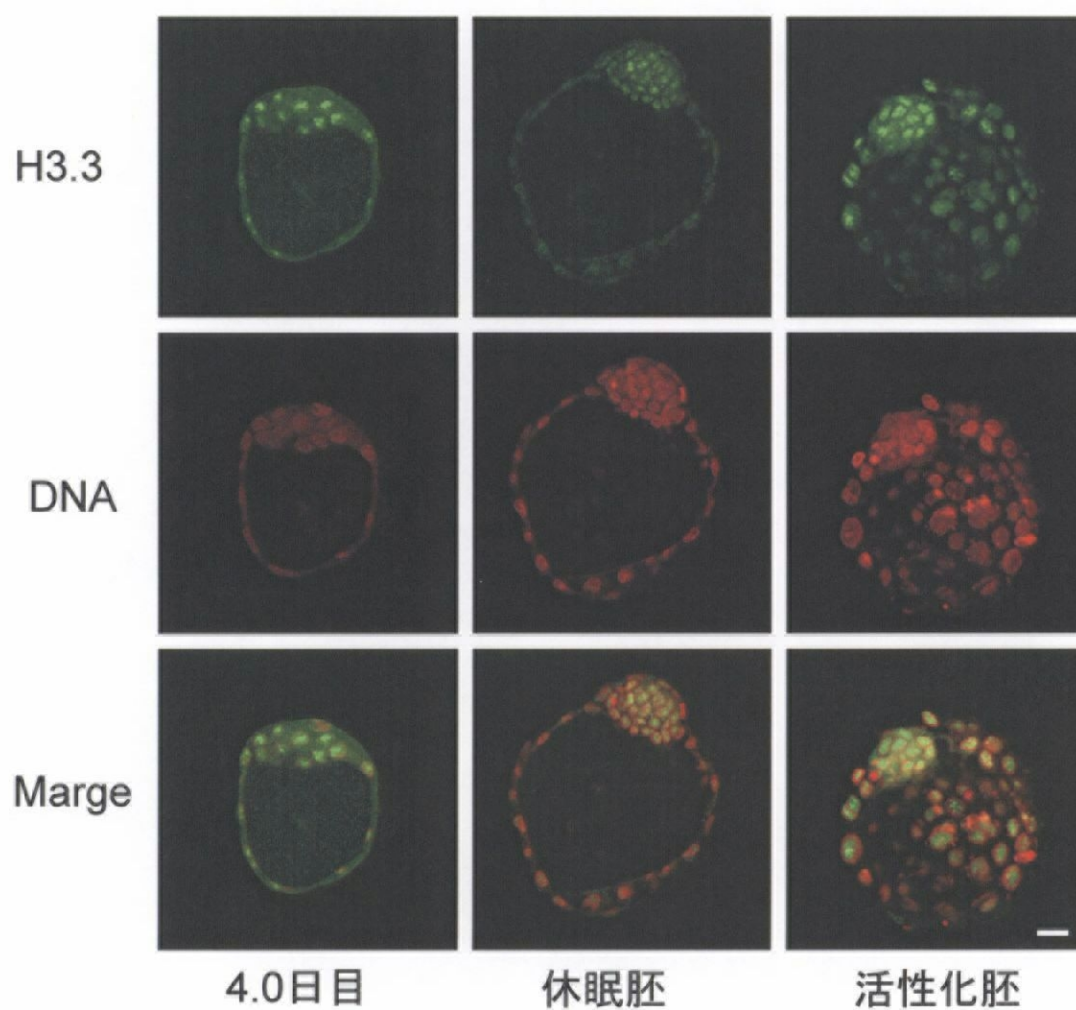


図 3-11 交配後 4.0 日目胚、休眠胚、活性化胚におけるヒストン H3.3 の検出  
抗 H3.3 特異的抗体を用いて免疫染色を行い、FITC 標識二次抗体を用いて検出した。DNA 染色には propidium iodide を用いた。実験は独立して 3 度行い同様の結果を得た。白棒線は 20  $\mu\text{m}$  を示す。



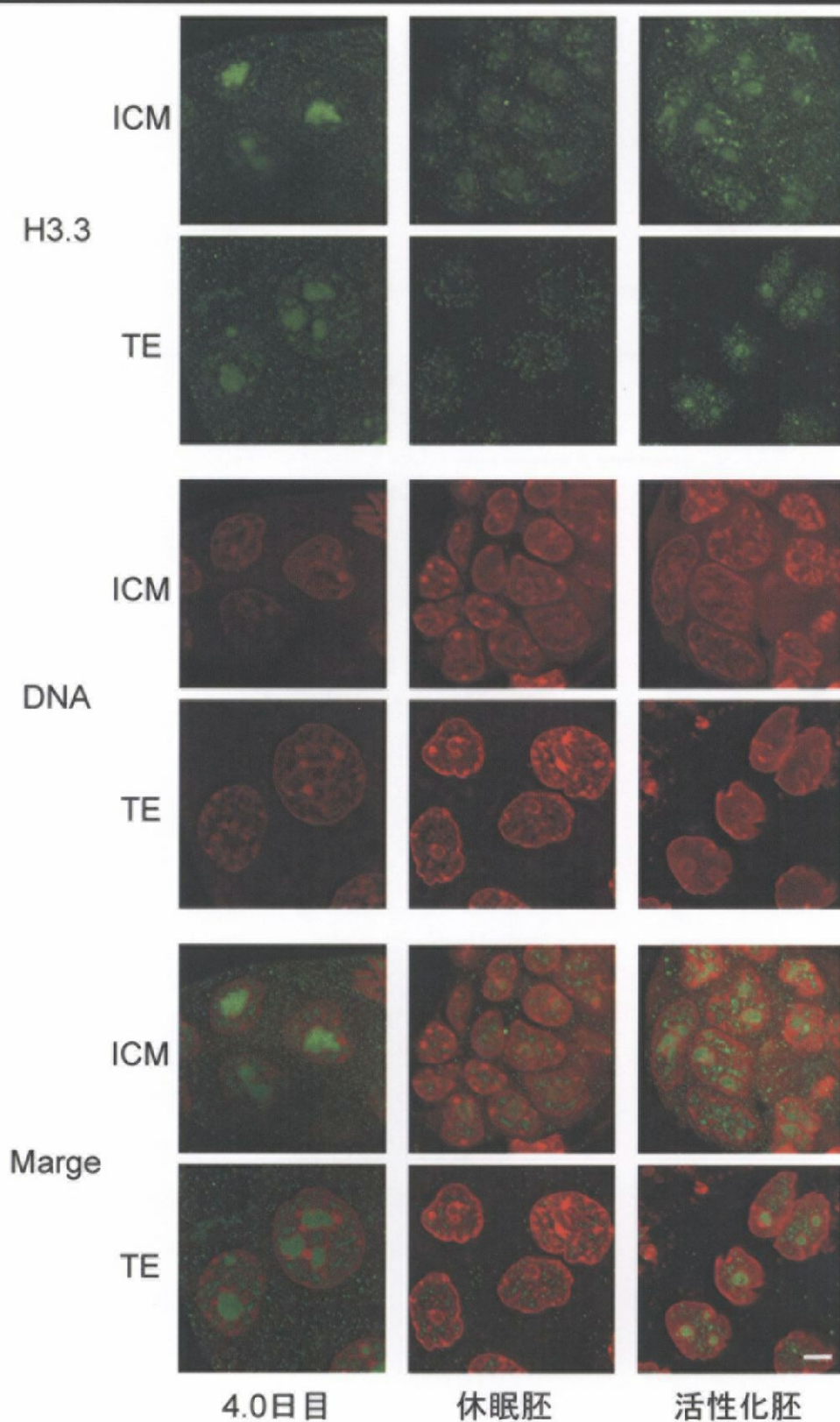


図 3-12 交配後 4.0 日目胚、休眠胚、活性化胚における H3.3 の検出  
それぞれの胚の ICM または TE の細胞を拡大して示す。白棒線は 5  $\mu\text{m}$  を示す。

表3-1 ヒストン修飾のレベル

		4.0日目		休眠胚	活性化胚
総転写活性		ICM* TE	高 高	低 低	高 高
転写活性化**	AcH3K9	ICM TE	低*** 高	低 高	低 高
	AcH3K18	ICM TE	高 低	高 低	高 低
	AcH4K12	ICM TE	低 高	低 高	低 高
	H3.3	ICM TE	高 高	低 低	高 高
転写抑制	diMeH3K9	ICM TE	低 低	高 低	低 低
	triMeH3K9	ICM TE	低 低	低 低	低 高

\*, ICMは内部細胞塊、TEは栄養外胚葉を示す。

\*\*, ヒストン修飾は、転写活性への関与の種類に基づいて分類した。

\*\*\*, 各々のヒストン修飾について検出されたシグナルレベルを、高い場合には「高」、低い場合には「低」で示した。