

論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 25 年度 進学

博士課程 4 年

氏名 羽田 政司

指導教官名 白髭 克彦

博士論文課題名

生殖細胞特異的ヒストンバリエントにおける 新規リン酸化修飾の発見と生理的機能の解明

1). 序論

真核生物の核内においてゲノムを収納しているヒストンタンパク質は、DNA の収縮・弛緩を制御する事によって染色体分配などの多様な生命現象に関与する。ヒストンによる下流現象の制御機構には多くの因子が関与するが、中でも「ヒストンの翻訳後修飾」や「ヒストンバリエントの置換」がよく知られている。ヒストンは多くの翻訳後修飾の標的となるが、それらは直接クロマチン構造に影響を与えたり、修飾に特異的に結合する因子をクロマチン上に誘導することによってその構造を調節している。一方、ヒストンにはアミノ酸配列がわずかに異なるヒストンバリエントの存在が認められており、普遍的なヒストンと置換されることによって特異的な機能を発揮する。いくつかのヒストンバリエントには組織特異性が認められ、特徴的なクロマチン構造の形成やそれに付随

する遺伝子発現調節を介して、それぞれの組織に固有な機能を担保すると考えられている。中でも精子の形成過程では多様なヒストンバリエーションの存在が報告されているが、それらの多くは未だ機能が解明されていない (Govin et al. 2007)。特に近年、精子を介したエピゲノム情報の次世代への持ち込みが注目されており、精子形成過程におけるヒストンバリエーションの生理学的機能の解析は重要な課題である。

本研究は、精巣特異的ヒストン H2A バリエーションである TH2A における 127 番目のトレオニン残基の新規リン酸化修飾を同定したという修士課程の成果を受けて、その性質のさらなる解析を試みたものである。このリン酸化 TH2A を pTH2A と称する。本リン酸化部位はカノニカル H2A には存在せず、一方でヒトの TH2A にはセリン残基として保存されている。TH2A は最近、精子形成に重要な機能を有することが報告されたが、その詳細な機能は未だ明らかにされていない (Shinagawa et al. 2015)。以上のことから、TH2A がそのリン酸化を介して特徴的なクロマチン構造変換や精子形成に関与する可能性を疑い、生体内におけるその制御や機能の解析を試みた。

2). 研究結果

まずマスマスプロトメトリー解析で同定した pTH2A の生体内における存在を確認するために、抗 pTH2A 特異抗体を作製した。抗 pTH2A 抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果から、生体内で確かに pTH2A は存在しており、更に精子を含む制限された細胞種において特に濃縮されていることがわかった。次に TH2A がリン酸化修飾を受ける時期を明らかにするため、免疫染色法によって精子形成過程での pTH2A の動態を解析した。その結果興味深いことに、pTH2A は精子核凝集期と第 1 減数分裂中期の 2 段階において存在し、前者のシグナルは成熟精子まで継続していた。以上の結果から、成熟精子における pTH2A は精子核凝集期にリン酸化されていることを明らかにした。

一方の精母細胞第 1 減数分裂中期における pTH2A の局在は、マーカー分子との共免疫染色の結果、セントロメア領域への顕著な濃縮が確認された。これは雌の生殖細胞、すなわち卵母細胞においても同様であった。雌の第 1 減数分裂期の染色体分配は加齢と共にエラーが蓄積し、いわゆる「卵子の老化」と密接に関係する。そこで老化卵における pTH2A レベルの変化を検証した結果、pTH2A は老化卵で有意に減少していた。次に pTH2A の動態および時期特異性を解析したところ、pTH2A は第 1 減数分裂中期の進行に伴い増加するが、第 2 減数分裂中期では消失し、更に体細胞分裂中期でも存在を確認できなかった。以上の結果から pTH2A は、第 1 減数分裂中期特異的にセントロメア領域に濃縮するヒストン修飾であり、メスにおいては加齢と逆相関することを明らかにした。

最近の研究により TH2A と TH2B (精巣特異的 H2B バリエーション) の欠損マウスでは、染色体を束ねる分子であるコヒーシンが第 1 減数分裂後の精母細胞に過剰に残存することが報告された (Shinagawa et al. 2015)。染色体間に局在するコヒーシンは第 1 減数分裂後期に分解されなければならないが、姉妹染色体間のセントロメア領域に局在しているものだけは Shugoshin-like 2 (SGOL2) に保護されることにより、正常な染色体分配を担保している (Lee et al. 2008)。以上の知見と pTH2A のセントロメア局在から、pTH2A はセントロメア領域における SGOL2 の過剰な局在を抑制している可能性が高いと考えられた。そこでこの仮説を検証するために、ゲノム編集技術を用いてリン酸化部位である 127 番目のトレオニン残基をアラニン残基に置換した変異マウスを作製した (*Th2a*^{TA/TA})。 *Th2a*^{TA/TA} 卵母細胞における SGOL2 の量を解析したところ、予想どおり SGOL2 の局在が促進されていた。さらに SGOL2 は分裂中期の染色体伸張も制御するが、上記の結果と一致して *Th2a*^{TA/TA} 卵母細胞では分裂時の染色体の張力が低下していた。以上の結果から、pTH2A の欠損は SGOL2 の増加や染色体張力の低下などの

異常を惹起することを明らかにした。

3). 本研究の成果

本研究では生殖細胞特異的な新規ヒストン修飾 pTH2A を発見し、それが精子核凝集期および第 1 減数分裂中期のセントロメア領域という制限された時期に存在することを明らかにした。更に第 1 減数分裂中期の pTH2A は、SGOL2 の量や染色体の張力に影響を与えることを明らかにした。以上のことから本研究の成果により、配偶子形成における新たなエピゲノムコードの存在とその影響を示し、更に卵の新規加齢マーカーという応用的な知見も提供することができた。

4). 参考文献

- Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, Thevenon J, Catena R, Davidson I, Garin J, Khochbin S et al. 2007. Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *Journal of Cell Biology* **176**: 283-294.
- Lee J, Kitajima TS, Tanno Y, Yoshida K, Morita T, Miyano T, Miyake M, Watanabe Y. 2008. Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells. *Nature Cell Biology* **10**: 42-U29.
- Shinagawa T, Linh My H, Takagi T, Tsukamoto D, Tomaru C, Kwak H-G, Dohmae N, Noguchi J, Ishii S. 2015. Disruption of Th2a and Th2b genes causes defects in spermatogenesis. *Development* **142**: 1287-1292.