

論文の内容の要旨

論文題目 Involvement of the asymmetric localization of histone H3 variants between parental genomes in mouse preimplantation development
(マウス1細胞期胚におけるヒストンH3変異体の局在および機能解析)

氏 名 河村 真愛

【序論】

新しい生命は、精子と卵が融合する受精によって生じるが、受精後の1細胞期胚では精子と卵由来のゲノムは混ざり合うことなくそれぞれ独立して核を形成する。これは、それぞれ雄性前核、雌性前核と呼ばれ、1細胞期胚の分裂期に初めて混ざり合い2細胞期胚へと分裂し、その後さらに分裂を繰り返して個体を形成していく(図1)。これまでに、雌雄の前核でクロマチン構造に関連した様々な性質の違いがあることが報告されている。まず、雌性前核と比べて雄性前核の方が転写活性が高く、DNA複製も速く終了する。この原因として雌性前核と比較して、雄性前核のクロマチン構造が緩んでいることが考えられている。すなわち緩んだクロマチン構造が高い転写活性および速いDNA複製を引き起こしているというものである。また、雄性前核ではヘテロクロマチンの形成に関与するH3K9のメチル化が雌性前核に比べて極めて低いレベルにあることが知られている。さらに核小体周辺のクロマチン構造が雌雄前核で異なっていることが報告されている。しかし、このような雌雄前核におけるクロマチン構造の違いを決定づける要因、さらには、その違いが発生にどのように関わっているのかについてはこれまでほとんど明らかにされていない。

クロマチン構造を決定する大きな要素としてヒストン変異体が挙げられる。クロマチンを構成する各ヒストンに

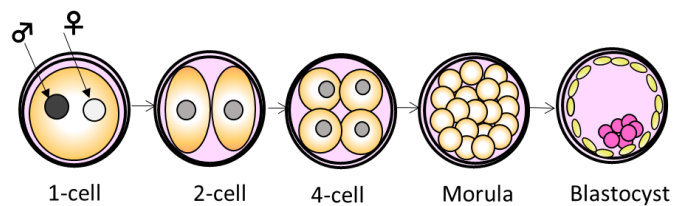


図1. 哺乳類の初期発生過程の概略図

は異なるアミノ酸配列を持つ変異体が存在し、これらの置き換えによってクロマチン構造が変化することが明らかになっている。哺乳類のコアヒストンH3には、主にH3.1、H3.2、そしてH3.3の3つの変異体が存在する。3つのH3変異体は互いにアミノ酸配列が非常に類似しているが、異なる機能を持つことが示唆されている。例えば、H3.1およびH3.2はヘテロクロマチンと呼ばれるDNA密度の高い領域に局在し、H3.3は、DNA密度の低いユークロマチンに局在

する。これまでに H3 変異体の局在および機能について、後期の着床前初期胚では明らかにされてきているが、1 細胞期胚においてほとんど明らかにされていない。

そこで本研究では、マウス 1 細胞期胚の雌雄前核においてクロマチン構造が異なっていることへの H3 変異体の関与を明らかにすることを目的とした。そのために、着床前初期胚における H3 変異体の局在、さらにはその調節機構を解析した。その結果、H3.1/H3.2 は雌雄の前核において局在が異なっており、さらにその原因が明らかになったことから、それらの局在を変化させることで、2 つの前核で異なったクロマチン構造を持つことの意義についての解明を試みた。

【結果と考察】

1. 受精後の初期胚における H3 変異体の局在および発現解析

ヒストン H3 変異体のアミノ酸配列が非常に似ているため、それぞれを識別する抗体の作製が困難であったが、近年ヒストン H3 変異体のうち H3.1/H3.2 を認識する抗体、H3.3 を認識する 2 種類の抗体が作製された。そこでこれらの抗体を用いて、着床前初期胚における内在性の H3.1/H3.2 および H3.3 の局在を解析した。免疫染色を行った結果、H3.3 は初期発生過程において常に核局在が検出されたものの、H3.1/H3.2 は 1 細胞期胚において核局在が殆ど見られなかった (図 2A)。しかしながら、検出シグナルを上昇させて解析したところ、H3.1/H3.2 は、1 細胞期胚の雌性前核においては主に核小体付近に局在し、雄性前核では核小体以外の領域に局在していることがわかった (図 2B)。このように雌雄前核間で H3.1/H3.2 の局在が異なることが明らかになったが、これまでの報告では、核小体付近のヘテロクロマチン構成および DNA 複製パターンが雌雄前核間で異なることが報告されており、これらに H3.1/H3.2 の局在が関与していることが考えられた。

1 細胞期胚において H3.1 および H3.2 がクロマチンに取り込まれない原因として 2 つのことが考えられる。1 つ目は、この時期において H3.1/H3.2 の発現量が低いという可能性である。2 つ目は、H3.1/H3.2 のヒストンシャペロンによるクロマチンへの取り込み効率が低いことが考えられる。そこでまず、1 つ目の可能性を検証するために、RNA シーケンスのデータベースを用いて初期胚における H3 変異体 mRNA の発現量比を算出した。その結果、1 細胞期胚において H3.1、H3.2 の発現量が H3.3 の発現量と比較して低いことがわかった。次いで 2 つ目の可能性を検証するために、1 細胞期胚における H3 変異体タンパク質のクロマチンへの取り込み効率を解析した。そのために、H3.1、H3.2、H3.3 のそれぞれに Flag タグを付加したタンパク質を

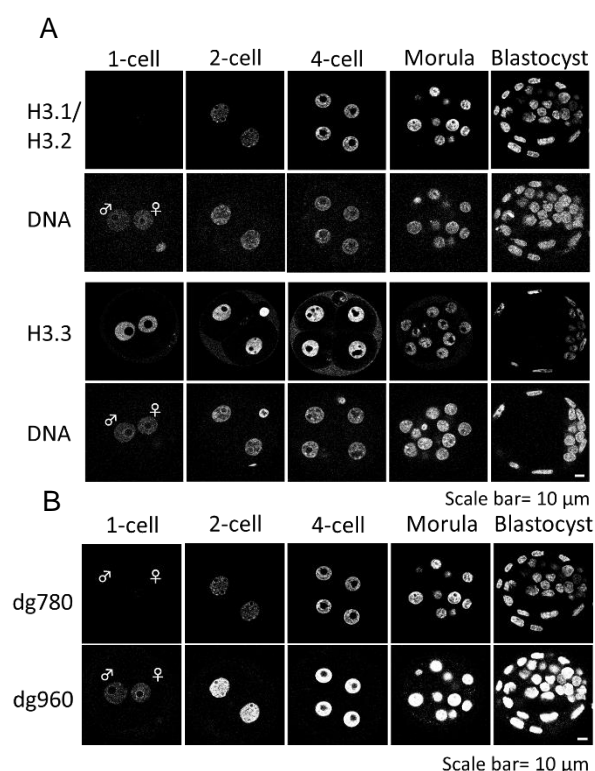


図 2. A. 着床前初期胚におけるヒストン H3.1/H3.2 または H3.3 の核局在 B. 検出シグナルを上昇したときの H3.1/H3.2 の核局在

コードする cRNA をそれぞれ 3、 10、 30、 100 ng/μl の濃度で未受精卵に顕微注入し、1 細胞期胚において取り込まれた Flag 付加タンパク質を定量した (図 3)。その結果、30 ng/μl 以下では H3.3 と比較して、H3.1、H3.2 の取り込み効率が有意に低いことが明らかになった。以上、これらの結果を総合すると、1 細胞期胚のクロマチンにおける H3.1、H3.2 の局在量が低レベルとなっている原因は、これらの発現量が低いこと、およびヒストンシャペロンによる取り込み効率が低いことの両方であることが示唆された。

2. 1 細胞期胚において、H3.1、H3.2 がクロマチンに存在しないことの生物学的な意義について

1 細胞期胚において、H3.1、H3.2 のクロマチン局在が低レベルであることの生物学的な意義について解析した。前述の解析において H3.1、H3.2、そして H3.3 をそれぞれ高い濃度 (100 ng/μl) で顕微注入した場合、H3.1、H3.2、そして H3.3 がほぼ同程度にクロマチンに取り込まれたことがわかった (図 3)。そこで、この実験系を用いて

1 細胞期胚のクロマチンに H3.1、H3.2 を強制的に取り

込ませ、その後の発生への影響を解析することにした。1 細胞期胚における H3 変異体の過剰発現が確認された後、胚盤胞期胚までの発生率を観察した (図 4)。その結果、H3.1、H3.2 過剰発現胚の発生率は、H3.3 過剰発現胚およびコントロール胚と比較して、2 細胞期以降の発生率が大幅に低下した。よって、H3.1、H3.2 は 1 細胞期胚においては他の発生時期に比べてクロマチンへの取り込み量が少ないことが初期発生に重要であることが示唆された。

また、興味深いことに、コントロール胚で僅かに見られた H3.1/H3.2 は雌性前核の核小体周囲のヘテロクロマチン領域に比較的多く局在していたが、過剰発現により H3.1/H3.2 は雄性前核の核小体周囲に多く観察されるようになった。そこで、この雄性前核における変化が発生停止に関与しているということが考えられたため、雌性単為発生胚を作製し、H3.1、H3.2 の過剰発現を行ったところ、発生に異常は見られなかった。したがって、H3.1/H3.2 が雄性前核のヘテロクロマチン領域に集積することで発生の異常が起こったものと考えられた。

3. H3.1、H3.2 強制取り込みの DNA 複製への影響

H3.1、H3.2 過剰発現胚が発生停止する原因を解析した。まず、H3.1、H3.2 過剰発現胚は、2 細胞期胚への卵割率が低かったことから、卵割が起こる時期を、時間を迫って詳細に解析したところ、H3.1、H3.2 過剰発現胚は発生を停止していたのではなく、2 細胞期への卵割時間が遅延していたことがわかった。そこで、1 細胞期において、細胞周期のどの時期で遅延が生じてい

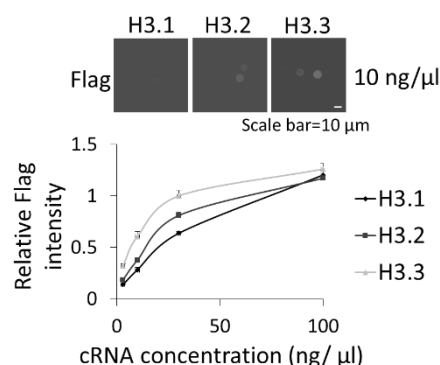


図 3. 1 細胞期胚における Flag-H3.1、Flag-H3.2、Flag-H3.3 の取り込み量を検出した免疫染色 (10 ng/μl) (上) および定量 (下)

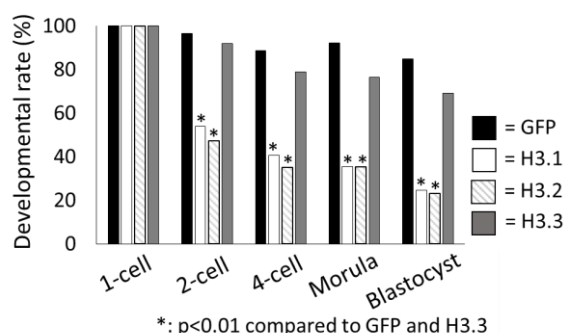


図 4. H3.1, H3.2, H3.3 cRNA を 100 ng/μl の濃度で顕微注入した際の発生率

るのかを調べるために DNA 複製のタイミングを解析した。H3.1、H3.2 過剰発現胚への BrdU

の取り込みを経時的に観察したところ、雌性前核においては、コントロール胚と同様に DNA 複製が進行していたが、雄性前核の DNA 複製は、コントロール胚と比較して、開始および進行が遅延していた(図 5)。さらに、H3.1、H3.2 過剰発現胚の雄性前核における DNA 複製の遅延を詳細に解析した。これまでに、1 細胞期胚の雌雄前核それぞれの核内の領域において、異なる順番で DNA 複製が起こることが知られている。すなわち、雄性前核において核膜周辺が最後に複製される一方で、雌性前核においては核小体周辺の DNA 複製が最後に起こる。そこで、H3.1、H3.2 過剰発現胚の雄性前核における複製パターンに変化が生じているかどうかを解析した。その結果、コントロール胚と比較して、H3.1、H3.2 過剰発現胚の雄性前核における核小体周辺の DNA 複製が顕著に遅れていることが明らかになった(図 6)。一方、雌性前核では、このような遅延が見られなかった。一般に体細胞では、ユークロマチン領域の DNA 複製は早期に起こる一方、ヘテロクロマチン領域の DNA 複製は遅く起こる。したがって、過剰発現により H3.1/H3.2 が雄性前核のヘテロクロマチン領域に多く集積していたという上記の結果も含めると、H3.1/H3.2 が雄性前核に集積することにより DNA 複製の遅延が起こり、それが発生停止につながったものと考えられる。

【結論】

1 細胞期胚の雌雄前核におけるクロマチン構造の違いに、H3.1/H3.2 の局在の差が関与していることが示唆された。1 細胞期胚で H3.1、H3.2 がクロマチンに取り込まれるような状況にすると、これらの変異体は雄性前核の核小体の周辺にあるヘテロクロマチン領域に集積し、DNA 複製の遅延から発生停止を引き起こすことが示された。また、1 細胞期胚において、H3.1/H3.2 がクロマチンに存在しないのは、H3.1/H3.2 の発現量が低いことおよびクロマチンへの取り込み効率が低いことの両方が原因となっていることが示唆された。以上をまとめると、雄性前核への H3.1、H3.2 の局在は発生に悪影響を及ぼすことから、これらの発現量を低下させるとともに取り込み効率を下げることで悪影響を防ぐというメカニズムが 1 細胞期胚で機能しているものと考えられる。

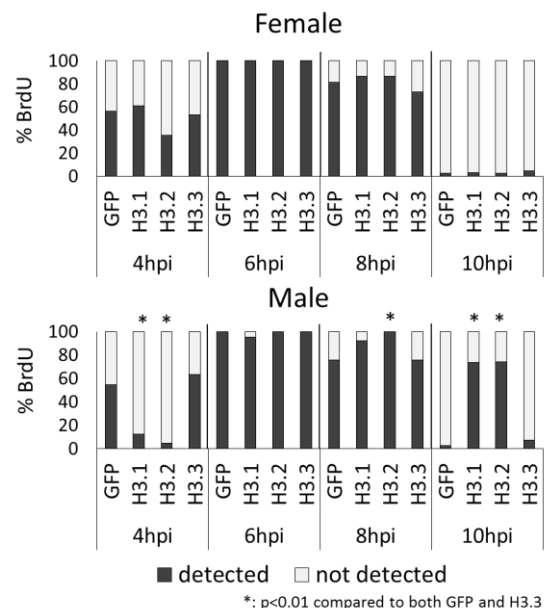


図 5. 受精後 4、6、8、10 時間における H3.1、H3.2、H3.3 過剰発現胚、コントロール胚における DNA 複製の有無。上：雌性前核 下：雄性前核

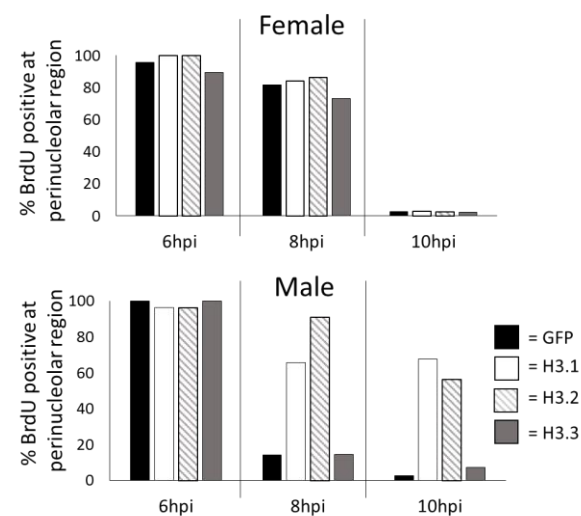


図 6. 雌雄前核における核小体周辺の DNA 複製の有無