

学位論文審査結果の報告書

氏 名 守田 昂太郎

生 年 月 日 昭和・平成 3年 3月 31日

本 籍 (国籍) 富 山 県

学位の種類 博 士 (工 学)

学位記番号 生 第 46 号

学位授与の条件 学位規程第5条該当
(博士の学位)

論 文 題 目 マウス初期胚の母性-胚性移行期における抗酸化機構とエピ
ジェネティックリプログラミングに関する研究

学位論文受理日 平成 30年 1月 24日

学位論文審査終了日 平成 30年 2月 7日

審 査 委 員

(主 査) 松本 和也 教授 

(副主査) 細井 美彦 教授 

(副主査) 三谷 匡 教授 

(副 査) 

(指導教員) 松本 和也 教授 

論文内容の要旨

受精卵は、分化全能性を獲得することにより、全ての細胞へ分化し、個体を形成する。分化全能性の獲得は、有性生殖を行う全ての生物に必須であり、この獲得機構に関する研究は、生命現象を明らかにするだけでなく、生殖補助医療、家畜動物の繁殖、iPS 細胞等の多能性幹細胞の作出効率を改善させることによる再生医療への貢献などが期待される。これまでの胚発生過程の研究では、酸化ストレスによる細胞の損傷を防ぐための抗酸化機構についてよく調べられてきた。また、受精卵が分化全能性を獲得し、正常に個体へ発生するためには、受精卵の細胞内の制御機構が母性から胚性へと移行する現象(maternal-to-zygotic transition: MZT)が必要とされ、それに先立って生じるエピジェネティックリプログラミングの研究も進められている。しかしながら、受精直後から MZT までの詳細な分子機構は十分に明らかになっておらず、新たな知見を得る必要がある。そこで、まず、受精直後の酸化ストレスの制御機構と、エピジェネティックリプログラミングに着目した。

活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)は細胞内のシグナル伝達や細胞周期の制御に関与する(Ray *et al.*, 2012; Reczek *et al.*, 2015; Tiwari *et al.*, 2016)。一方で、過剰な ROS はタンパク質、脂質、核酸を酸化させ、アポトーシス等を引き起こす物質であり、発生能を獲得するためには、卵子や胚における ROS を適切に調整する抗酸化機構が重要である(Guérin *et al.*, 2001, Takahashi *et al.*, 2012)。卵子では、ROS のレベルが排卵後から卵管内で一定に保たれているのに対し、受精直後には、ROS のレベルが上昇することが明らかになっている(Nasr-Esfahani *et al.*, 1996; Lopes *et al.*, 2010)。しかしながら、受精直後の MZT の抗酸化機構まではよく知られていない。そこで、第 2 章では、マウス受精卵における抗酸化機構を明らかにするために、受精卵で高発現する抗酸化酵素を探索した。2009 年、野老美紀子博士の博士論文における研究では、二次元電気泳動および MS 解析によって、マウス metaphase II (MII)期卵母細胞及び受精卵から発生過程の時期におけるタンパク質が同定され、それらのタンパク質の発現動態が網羅的に調べられている。この中の受精卵におけるタンパク質のリストを用いて、高発現する抗酸化酵素として、peroxiredoxin1 (PRDX1)及び PRDX2 を明らかにした。これらを含む PRDX のグループ (PRDX1-4)は主に特異的な還元サイクルで機能を維持し、細胞の様々な場所で、ROS のひとつである H_2O_2 を消去する機能を果たしていることがよく知られている(Neumann *et al.*, 2009)。そこで、PRDX が機能している場所を明らかにするために、 H_2O_2 消去によって生じる、過酸化された PRDX に対する抗体を用い、免疫染色を行った。その結果、

過酸化型 PRDX は受精直後に形成した雄性前核及び雌性前核に認められ、前核内の H_2O_2 消去に関与していることが示唆された。一方、卵丘細胞の核内では、過酸化型 PRDX が核内にほとんど認められず、細胞質で主に検出されたことから、受精卵の核内における H_2O_2 消去機構は特徴的であることが示唆された。次に、PRDX の前核内で H_2O_2 を消去する生物学的意義を調べた。受精卵の前核内で生じる現象として、エピジェネティックリプログラミングのひとつである雄性ゲノムの脱メチル化が挙げられる。そこで、 H_2O_2 消去と DNA 脱メチル化との関係を明らかにするために、まず、過剰な H_2O_2 で処理した受精卵の前核において、過酸化型 PRDX レベルが上昇していることを確認した。さらに、 H_2O_2 処理した受精卵の雄性前核では、エピジェネティックリプログラミング時に生じる 5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)の生成が有意に抑制されることが明らかになった。以上のことから、受精卵において内在性の PRDX は前核内の抗酸化機構に関与し、MZT の時期のエピジェネティックリプログラミングの現象にも関与していることが示唆された。

MZT 時には、DNA のメチル化やヒストンのメチル化及びアセチル化修飾などのエピゲノムがダイナミックに変化し、胚性ゲノムの活性化(zygotic genome activation: ZGA)によって mRNA の転写が行われる(Schier, 2007; Okada and Yamaguchi, 2017)。ZGA には、1 細胞期後期の雄性前核で生じる minor ZGA と 2 細胞期で生じる major ZGA が存在し、major ZGA に関してはこれまでによく研究されてきた(Aoki *et al.*, 1997; Okada and Yamaguchi, 2017)。近年、受精後の雄性ゲノムに蓄積される H3K4 のメチル化が minor ZGA の開始や初期胚発生に必要であることが示され、ヒストンのメチル化修飾と minor ZGA の関係性が認められている(Aoshima *et al.*, 2015)。しかしながら、minor ZGA 時の詳細な分子機構は不明である。他の知見では、B 細胞を用いた ChIP-seq による研究で、H3K4me3 と新規の修飾である H3R2 対称性ジメチル化修飾(H3R2me2s)がゲノム全体の転写開始点付近で共局在することが明らかにされている(Yuan *et al.*, 2012)。受精卵においても、minor ZGA 開始時期から H3K4me3 のシグナルが雄性前核で認められることが示されている(Dahl *et al.*, 2016)。そこで第 3 章では、受精直後のエピジェネティックリプログラミングと minor ZGA の詳細な知見を得るために、まず、H3R2me2s に着目し、その局在時期と機能を検討した。免疫染色により、H3R2me2s のシグナルは受精後 3 時間の早期から前核期の間、雌雄両ゲノムで認められた。次に、H3R2me2s の機能を調べるために、受精卵に多く存在している H3.3 とその変異体である H3.3R2A を mRNA のインジェクションにより卵子に過剰発現させ、受精卵の雄性前核における H3R2me2s を阻害した。その結果、H3.3R2A を発現させた受精卵の H3R2me2s のシグナルは minor ZGA の時期である受精後 10 時間で、H3.3 発現区と比較して有意に低下し、2 細胞期から 4 細胞期への発生も有意に低下した。さらに、H3.3R2A を発現させた受精卵では、mRNA 合成期に BrUTP

の取り込みが抑制され、RNA ポリメラーゼ II (Pol II)による mRNA 伸長反応の指標である Pol II Ser2P のシグナルも野生型と比較して有意に低下したことから、転写が阻害されていることが明らかになった。さらに、H3R2 の対称性ジメチル化に関わる PRMT5 及び PRMT7 の阻害剤(DS-437)を用いた実験でもまた、転写が阻害されていた。一方で、H3K4me3 のシグナルは H3.3R2A の発現や DS-437 処理によっても変化が認められなかった。以上のことから、受精卵における minor ZGA の開始には、H3R2me2s が必要であることが示唆され、H3K4me3 と H3R2me2s が独立した機構でメチル化されている可能性が示唆された。

次に、第 4 章では、H3R2me2s が関与する minor ZGA の詳細な機能を明らかにするために、卵巣タンパク質抽出液及び H3R2me2s-HA または H3R2A-HA ペプチドを用いた共免疫沈降法及び LC/MS/MS 解析を用いて H3R2me2s と相互作用するタンパク質を探索した。その結果、H3R2me2s-HA ペプチドを用いた実験区において 16 種類の特異的なタンパク質が同定された。また、データベース及び既報のプロテオーム解析の論文から、これらの 16 種類のタンパク質の内、14 種類がタンパク質または転写産物として受精卵に存在していることが明らかになった。これら 14 種類のタンパク質を GO 解析に供試し、タンパク質の機能ごとにアノテーションを行った結果、22 %が核内で機能し、転写活性や mRNA のプロセッシングに関与するタンパク質であることが明らかになった。以上の結果をまとめると、H3R2me2s は転写活性に関与するだけでなく、mRNA のプロセッシングに関わるタンパク質を仲介して転写後調節にも関与している可能性が示唆された。

本研究では、マウス初期胚における内在性の抗酸化酵素 PRDX が核の H₂O₂ 消去に関与し、エピジェネティックリプログラミングのひとつである雄性ゲノムの脱メチル化にも関与していることを示唆した。また、受精卵の H3R2me2s がリプログラミング後に生じる minor ZGA の転写機構に関与していることを示唆した。これらの研究成果は、全能性獲得に必要な MZT の理解に繋がることが期待される。

論文審査結果の要旨

哺乳動物において、受精卵が分化全能性を獲得する現象は、その発生にとって必須の事象である。特に、受精直後に起こる母性から胚性へ移行時期(maternal-to-zygotic transition: MZT)には、生殖細胞として終末分化した細胞である卵と精子が分化全能性を持つ細胞である受精卵に変換されるエピジェネティックリプログラミング(エピジェネティック情報〔遺伝子の発現を記憶するための情報〕のリプログラミング〔書き換え〕)の分子機構が正確に機能する必要がある。これまで、MZTにおけるエピジェネティックリプログラミングの分子機構について、多くの研究報告がされているものの、完全な理解までには至っていない。そこで、本研究では、以下に示す3つの観点から、詳細な分子機構の解明を図った。

第2章では、受精卵で高発現する抗酸化酵素を探索し、抗酸化酵素のエピジェネティックリプログラミングへの関与について検討した。過剰な活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)は酸化ストレスとなり、タンパク質、脂質、核酸を酸化させ、アポトーシス等を引き起こすため、発生能を獲得するためには、卵子や胚におけるROSを適切に調整する抗酸化機構が重要と考えられている(Guérin *et al.*, 2001, Takahashi *et al.*, 2012)。受精直後には、ROSのレベルが卵子と比較して上昇することが明らかになっているが(Nasr-Esfahani *et al.*, 1996; Lopes *et al.*, 2010)、受精直後のMZTの抗酸化機構までは明らかになっていない。そこで、マウス受精卵における抗酸化機構を明らかにするために、受精卵で高発現する抗酸化酵素を探索した。著者らの研究室では、二次元電気泳動およびプロテオミク解析で、マウス metaphase II (MII)期卵母細胞及び受精卵から発生過程の時期におけるタンパク質を同定し、それらのタンパク質の発現動態を網羅的に調べている(野老、博士論文、2009年)。著者は、その中から、peroxiredoxin1 (PRDX1)及びPRDX2を高発現する抗酸化酵素として発見した。これらを含むPRDXのグループ(PRDX1-4)は主に特異的な還元サイクルで機能を維持し、細胞の様々な場所で、 H_2O_2 を消去する機能を持つことが知られている(Neumann *et al.*, 2009)。そこで、PRDXが抗酸化に関わっている場所を明らかにするために、免疫染色を行った。その結果、過酸化型PRDXは受精卵の前核に局在し、 H_2O_2 消去に関与していることを示唆した。一方、卵丘細胞の核内では過酸化型PRDXはほとんど認められず、受精卵の核内の H_2O_2 消去機構は特徴的であることを示唆した。受精卵の前核内で生じる特徴的な現象として、DNA脱メチル化が知られている。そこで、 H_2O_2 消去とDNA脱メチル化との関係を明らかにするために、まず、 H_2O_2 で処理した受精卵の前核で、過酸化型PRDX

レベルが上昇していることを確認した。さらに、 H_2O_2 処理した受精卵の雄性前核では、5-メチルシトシン(5mC)が減少した後の、5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)が生成される過程が抑制されることを明らかにした。以上のことから、受精卵における内在性の PRDX が前核内の抗酸化機構に関与し、MZT の時期のエピジェネティックリプログラミングの現象にも関与していることを示唆した。

第 3 章では、H3R2me2s の minor 胚性ゲノムの活性化(zygotic genome activation: ZGA)への関与について検討した。MZT の時期では、DNA 及びヒストン修飾などがダイナミックに変化し、ZGA によって mRNA の転写が行われる(Schier, 2007; Okada and Yamaguchi, 2017)。マウスの ZGA には、1 細胞期後期で生じる minor ZGA と 2 細胞期で生じる major ZGA が存在している(Aoki *et al.*, 1997; Okada and Yamaguchi, 2017)。さらに近年では、minor ZGA と雄性ゲノムに蓄積される H3K4 のメチル化の関係性が報告されている(Aoshima *et al.*, 2015; Dahl *et al.*, 2016)。B 細胞では、H3K4me3 と H3R2me2s がゲノム全体の転写開始点付近に存在することが示されている(Yuan *et al.*, 2012)。しかしながら、minor ZGA 時の詳細な分子機構は未だ不明である。そこで、受精直後の minor ZGA の詳細な知見を得るために、H3R2me2s に着目し、その局在時期と機能を検討した。免疫染色により、H3R2me2s のシグナルは受精直後から雌雄両前核に存在していることを明らかにした。雄性の H3K4me3 は minor ZGA の時期に認められるため、今回の結果は、H3R2me2s が比較的早い時期からゲノムに存在していることを示唆している。次に、H3R2me2s の機能を調べるために、受精卵に H3.3 (野生型)と H3.3R2A (変異体)を発現させ、受精卵の雄性前核における H3R2me2s を阻害した。その結果、変異体を発現させた受精卵の H3R2me2s のシグナルは minor ZGA の時期である受精後 10 時間の胚で、野生型と比較して有意に低下し、2 細胞期から 4 細胞期への発生も阻害されることを明らかにした。また、変異体を発現させた受精卵の雄性前核では、mRNA 合成期に BrUTP の取り込みや転写伸長反応の指標である Pol II Ser2P のシグナルも野生型と比較して有意に低下し、転写が阻害されていることを認めた。さらに、H3R2me2s の阻害剤(DS-437)を用いた実験でもまた、転写が阻害されることを明らかにした。一方で、雄性前核の H3K4me3 のシグナルは変異体の発現や DS-437 処理によっても減少しなかった。以上のことから、H3R2me2s は H3K4me3 と独立した機構でメチル化され、minor ZGA に関与する新規のヒストン修飾であることを初めて明らかにした。

次に、第4章では、H3R2me2sが関与するminor ZGAの詳細な機能を明らかにするために、卵巣タンパク質抽出液及びH3R2me2s-HAまたはH3R2A-HAペプチドを用いた共免疫沈降法及びLC/MS/MS解析でH3R2me2sと相互作用するタンパク質を探索した。その結果、16種類のタンパク質を同定し、14種類が受精卵でタンパク質はまたは転写産物として存在していることをデータベースや論文等で確認した。これらのタンパク質を機能ごとに分類すると、核内においては、転写やmRNAプロセッシングに関与するタンパク質が最も多いことから、受精卵でもH3R2me2sが転写活性だけでなく、転写後調節にも関与している可能性を示唆した。

以上のように、本論文では、まずマウス初期胚における内在性の抗酸化酵素PRDXが核のH₂O₂消去に関与し、DNA脱メチル化過程にも関与していることを示唆した。次に、受精卵のH3R2me2sがminor ZGAの転写機構に関与していることを明らかにした。これらの研究成果は、受精卵の全能性獲得に必要なエピジェネティックリプログラミングの分子機構の深い理解に繋がる重要かつ新しい知見であることから、博士(工学)論文として価値あるものと認める。