

学位論文審査結果の報告書

氏 名 中 家 雅 隆

生 年 月 日 昭和(平成) 元 年 5 月 19 日

本 籍 (国籍) 和歌山

学位の種類 博 士 (工 学)

学位記番号 生 第 43 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 _____

マウス体細胞核移植胚におけるヒストンH2A.Zの動態と


細胞核内構造に関する研究


学位論文受理日 平成 29 年 1 月 27 日


学位論文審査終了日 平成 29 年 2 月 20 日


審 査 委 員

(主 査) 三 谷 匡 

(副主査) 細 井 美 彦 

(副主査) 松 本 和 也 

(副 査) 

(副 査) 

論文内容の要旨

哺乳類における体細胞核移植 (Somatic cell nuclear transfer : SCNT) 技術が確立されてから 20 年が経過した。しかしながら、SCNT 胚の発生率は依然として低く、またクローン産子にみられる様々な異常も改善されていない。細胞核内構造は、ゲノム機能発現の制御基盤となっていることが明らかとなってきたが、哺乳動物の初期発生過程では体細胞核とは大きく異なり、ゲノム全体のエピジェネティックな修飾に大きく影響していると考えられる。したがって、SCNT では分化状態下の遺伝子発現情報をリプログラムさせる過程で、遺伝子情報の収納や発現を司るクロマチンレベルの制御機構が大きく関与していると考えた。そこで本研究は、生存に必須だが初期胚で発現がみられず、SCNT でドナー細胞から持ち込まれることが予想されるヒストン H2A.Z に着目し、SCNT 胚の発生段階における局在と動態について解析した。また、SCNT 胚の発生能力を改善するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) の作用に着目し、主な HDACi が SCNT 胚でのヒストン H2A.Z の動態と発生に及ぼす影響について検討した。さらに、HDACi によるヒストン H2A.Z の除去機構について解析した。そして、ヒストン H2A.Z が主要な構成要素となっているペリセントロメア領域は体細胞と初期胚で構造が大きく異なり、ペリセントロメア近傍には母性因子や ZGA 関連遺伝子が数多くコードされていることに着目し、受精卵と SCNT 胚について 3D-FISH 法による染色体構造の解析を行なった。

第 2 章では、SCNT 卵子に持ち込まれるヒストン H2A.Z に着目し、IVF 胚と SCNT 胚におけるヒストン H2A バリエントの局在について解析した。さらに、TSA 処理が SCNT 胚におけるヒストン H2A バリエントの動態に及ぼす影響と TSA によるヒストン H2A.Z のクロマチンからの除去機構について検討した。ヒストン H2A.Z は、IVF 胚では前核期から 4 細胞期において局在はみられなかった。一方、ドナー体細胞となる卵丘細胞にはヒストン H2A.Z が存在し、核移植後 SCNT 胚ではヒストン H2A.Z が局在していることが明らかとなった。このことから、ドナー細胞から持ち込まれるヒストン H2A.Z が SCNT 胚に残存し、核移植後のクロマチンリモデリングに影響を及ぼしている可能性が示された。そこで、SCNT 卵子に TSA 処理を施したところ、SCNT 胚でみられたヒストン H2A.Z は SCNT 後 1 細胞期から 4 細胞期において選択的に除去されることが初めて明らかとなった。他のヒストン H2A バリエントについて検証した結果、ヒストン H2A については、IVF 胚、SCNT 胚、TSA 添加の有無に関わらず、細胞核内に局在し、顕著な差は認められなかった。ヒストン H2A.X については、IVF 胚、SCNT 胚ともに細胞核内に局在したが、TSA 処理により SCNT 胚の 2 細胞期でのシグナルが強くなる傾向がみられた。次に、TSA 以外の HDACi である Oxamflatin、Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)、バルプロ酸(VPA)を用いて同様の解析をした結果、Oxamflatin は TSA と同様のパターンを示し、SAHA では 1~2 細胞期でヒストン H2A.Z の消失がみられたが、4 細胞期からヒストン H2A.Z が出現した。一方、VPA では 1 細胞期でのヒストン H2A.Z

の局在がみられ、2~4細胞期で消失したが、桑実期に達しても内在性ヒストン H2A.Z の発現誘導が遅延している可能性があり、HDACi に対するヒストン H2A.Z の応答の違いが示唆された。そこで、異なる HDACi による SCNT 胚の発生能の改善効果について検討した。HDACi 未処理区では、2細胞期で発生を停止する胚が多かった。TSA、Oxamflatin、SAHA 処理区では、4細胞期へ発生する胚が多くみられたが、VPA 処理区では、2細胞期と桑実期で発生を停止する胚が他の HDACi 処理区と比較してやや多かった。これらの結果より、マウス SCNT における TSA 処理の効果として、ヒストン H2A.Z をクロマチンから選択的に除去する作用があることが初めて明らかにされた。さらに、ヒストン H2A.Z の局在と発生能にはクロマチンリモデリングと遺伝子発現制御を介した因果関係があり、受精卵と同様の発現動態を取ることが SCNT 胚の発生能の改善につながる可能性が示唆された。

第3章では、HDACi による SCNT 後のヒストン H2A.Z の除去機構を明らかにすることを目的として、ヒストン H2A.Z のリモデリングに関わる Tip60 ならびに ANP32E の局在と、ヒストン H3K56 のアセチル化ならびにヒストン H2A.Z のアセチル化の動態について解析した。その結果、ヒストン H2A.Z のリモデリングを担う主要因子である Tip60 と ANP32E は、IVF 胚、SCNT 胚、TSA 処理 SCNT 胚いずれにおいても初期卵割の間、細胞核に局在し、顕著な差は認められなかった。また、ヒストン H2A.Z が残留している TSA 未処理 SCNT 胚では、ヒストン H2A.Z のアセチル化がみられないことが示された。さらに、アセチル化ヒストン H3K56 は、IVF 胚、SCNT 胚ともに 1~4細胞期で細胞核内に局在していたものの、TSA 未処理 SCNT 胚では 1細胞期核においてシグナルが弱い傾向がみられた。これらの結果より、TSA はヒストン H3K56 のアセチル化を介して H2A.Z のアセチル化とクロマチンからの除去に関わっている可能性が示された。

第4章では、細胞核内高次構造がゲノム機能発現の制御基盤となっており、体細胞と初期胚では大きく異なることに着目した。特に、ペリセントロメア領域は体細胞ではヒストン H2A.Z が主要なヒストン H2A バリエーションであり、凝集してクロモセーターを形成することにより発現抑制されているが、受精後はヒストン H2A.Z を含まずクロマチン構造が緩んで発現を示すこと、ペリセントロメア近傍に発生関連遺伝子が数多くコードされていることから、細胞核内の空間配置を可視化する 3D-FISH 法を用いて、初期胚および SCNT 胚におけるペリセントロメア領域、ZGA 関連遺伝子座 (*Zscan4*)、7番染色体テリトリー (CT7) の時空間情報に関する解析を行った。本研究では、初期胚の 3D-FISH に適した簡便なチャンバー装置 (EASI-FISH chamber) を考案し、標的遺伝子座、ペリセントロメア領域、染色体テリトリー (CT) の同時視覚化に初めて成功した。ペリセントロメア領域の細胞核内配置については、線維芽細胞ではクロモセーターを形成し細胞核内で斑状に散在していた。それに対し、受精後 1細胞期および 2細胞期では、ペリセントロメア領域は核小体様構造 (NLB) を取り囲むように分布していたが、4細胞期になるとクロモセーター様の構造に再編成された。一方、TSA 未処理 SCNT 胚では、ペリセントロメア領域は凝集したまま NLB を取り囲むように分布してい

るものや細胞核内に斑状に散在しているものがあり、IVF 胚とは大きく異なっていた。CT7 については、初期胚の CT7 は ES 細胞や線維芽細胞に比して大きく、膨化して不定形を示し、NLB を取り囲んでいた。それに対して、TSA 未処理 SCNT 胚では、膨化した CT7 が核膜直下で扁平に伸展するような形状を示し IVF 胚とは大きく異なっていた。さらに、TSA 処理により CT7 は核膜寄りに伸展するものの、やや膨化し厚みのある形状を示した。*Zscan4* 遺伝子座の配置については、線維芽細胞では *Zscan4* は CT7 内部に位置していたが、1~4 細胞期胚では *Zscan4* は CT7 表面にみられた。また、ES 細胞でも *Zscan4* は CT7 表面に位置していた。一方、初期胚で転写活性のない RP23-240D19 領域は *Zscan4* とは逆の配置を示した。それに対して、TSA 未処理 SCNT 胚では、*Zscan4* は CT7 表面で核膜寄りに位置し、RP23-240D19 は CT7 から細胞核内部に向かって抜け出していたが、TSA 処理により *Zscan4* の配置は変わらないものの RP23-240D19 が核膜近傍へ配置がシフトした。1~4 細胞期胚と ES 細胞、線維芽細胞を用いて CT7 の容積を計測した結果、初期胚の CT7 は ES 細胞や線維芽細胞と比して著しく膨大していることが示された。また、TSA 処理の有無にかかわらず、SCNT 胚では IVF 胚と比べ、CT7 の容積が小さいことが明らかとなった。これらの結果より、受精後、ペリセントロメア近傍領域や CT の形態的・構造的変化、*Zscan4* 遺伝子座の CT7 内での移動が 1~4 細胞期で起きており、体細胞とは大きく異なっていることが明らかとなった。また、SCNT 胚では CT7 の細胞核内での配置、形状、容積が IVF 胚とは大きく異なることから、ゲノム機能発現に影響している可能性が示された。さらに、TSA 処理は SCNT 胚の細胞核高次構造について著しい影響は認めないものの、CT の構造の修正に働く可能性が示された。

以上、本研究結果から、受精直後の初期卵割期では存在しないヒストン H2A.Z が SCNT 胚ではドナー体細胞核から持ち込まれること、HDACi (TSA) は選択的にヒストン H2A.Z を除去することが初めて明らかにされた。さらに、ヒストン H2A.Z 除去の応答性は HDACi により異なっており、ヒストン H2A.Z の局在パターンが SCNT 胚の発生と相関を示すことから、ヒストン H2A.Z が SCNT 胚の発生に障害をもたらす一因となっている可能性が示された。したがって、ヒストン H2A.Z は SCNT 胚の発生能力の評価指標として利用できることが考えられる。HDACi 処理によるヒストン H2A.Z の除去については、ヒストンアセチル化を介したクロマチンリモデリングが働いていると考えられる。また、本研究では、3D-FISH 解析により、体細胞と初期胚、初期胚と SCNT 胚で、染色体構造や遺伝子座の空間配置が著しく異なることを初めて明らかにした。Maternal to zygotic transition (MZT) における細胞核ダイナミクスの解析は、発生プログラムにおけるゲノム機能発現のしくみや SCNT におけるリプログラミングの構造基盤を解き明かす有用な情報をもたらすことが期待される。受精におけるヒストン H2A.Z の除去は、ZGA に必要なクロマチンドメイン構造や染色体高次構造への変換の鍵を握ると考えられ、その分子機序の解明は、受精・発生のみならず、体細胞核移植や iPS 細胞研究における人為的リプログラミング技術の開発にも繋がるものである。

論文審査結果の要旨

クローンヒツジ“Dolly”(Wilmot *et al.*, 1997)による哺乳動物の体細胞核移植 (Somatic cell nuclear transfer: SCNT) 技術が確立されて 20 年が経過した今なお、SCNT 胚の発生率は依然として低く、またクローン産子にみられる様々な異常も改善されていない。分化した体細胞核が可逆的に全能性を再獲得するリプログラミング機構は、クローン技術や生殖生物学や発生生物学など基礎生物学のみならず、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) (Takahashi and Yamanaka, 2006) を利用した再生医療分野や生殖補助医療分野にも大きく寄与するものであり、そのメカニズムの解明が期待される。リプログラミングを司るエピジェネティック制御の分子機構については、DNA メチル化修飾やヒストン修飾、ヒストン置換、non-coding RNA など階層的な知見による統合的理解が進んでいる。そして近年、ゲノム機能発現の制御基盤として重要な役割を果たす細胞核内構造は、哺乳動物の初期発生過程では体細胞核とは大きく異なり (Aguirre-Lavin *et al.*, 2012)、ゲノム全体のエピジェネティック制御に大きく影響していることが明らかとなりつつある。本論文では、SCNT のリプログラム過程で、細胞核内構造の制御機構が大きく関与しているとの着想に基づき、生存に必須だが初期胚で発現がみられず、SCNT でドナー細胞から持ち込まれるヒストン H2A.Z に着目し、その動態と発生初期のゲノム機能発現に関わる構造基盤に及ぼす影響について、従前にはない切り口による解析を試みている。

第 2 章では、IVF 胚と SCNT 胚におけるヒストン H2A バリエーションの局在について蛍光免疫細胞化学的に解析している。さらに、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) 処理が SCNT 胚の発生能を改善する (Kishigami *et al.*, 2006) ことに着目し、ヒストンアセチル化を介したヒストン置換の観点から、ヒストン H2A バリエーションの動態に及ぼす影響について検討している。その結果、ヒストン H2A.Z は、既報 (Nashun *et al.*, 2010) 通り IVF 胚では前核期から 4 細胞期において局在はみられない一方で、ドナー体細胞にはヒストン H2A.Z が存在し、核移植後も SCNT 胚ではヒストン H2A.Z が細胞核内に局在していることを認めている。そして、SCNT 卵子に HDACi である TSA 処理を施したところ、ヒストン H2A.Z は SCNT 後 1~4 細胞期において選択的に除去されることを明らかにしている。さらに、標的とする HDAC サブクラスの異なる HDACi を用いて同様の解析を行った結果、HDACi によって SCNT 後のヒストン H2A.Z の除去パターンが異なること、また、1 細胞期ではヒストン H2A.Z が残留し 2 細胞期以降消失するが、桑実期に達しても内在性ヒストン H2A.Z の発現遅延を示したバルプロ酸 (VPA) 処理区では、2 細胞期と桑実期で発生を停止する胚の割合が他の HDACi 処理区と比較して高い傾向を認めている。Ono ら (2010) は VPA 処理 SCNT 胚では着床後の発生が著しく低下することを報告しており、本結果はヒストン H2A.Z の局在が胚性ゲノムの活性化 (ZGA) や morula-blastocyst transition に影響を与えている可能性を提示するものである。本章では、ヒストン H2A.Z が SCNT 胚のクロマチン構造に影響を及ぼし、リプログラミングに干渉している可能性を示すとともに、TSA 処理にはヒストン H2A.Z をクロマチンから選択的に除去する作用があることを初めて明らかにしており、従前にはないきわめて興味深い知見を提示している。さらに、ヒストン H2A.Z の局在を指標に、受精卵と同様の発現動態を取ることが SCNT 胚の発生能の改善につながる可能性についても提示するなど、クローン研究に新たな評価軸を提供する成果といえる。

第 3 章では、HDACi による SCNT 後のヒストン H2A.Z の除去機構を探ることを目的として、ヒストン H2A.Z のリモデリングに関わる分子ならびにヒストン修飾について蛍光免疫細胞化学的に解析している。その結果、ヒストン H2A.Z のリモデリングを担う主要因子である Tip60 と ANP32E は、IVF 胚、SCNT 胚、TSA 処理 SCNT 胚いずれにおいても初期卵割の間、細胞核内に局在していること、ただし ANP32E については、MII 期卵子の spindle に集積していることから、除核操作により大幅に減少している可能性を認めている。そして、アセチル化ヒストン H3K56 は、IVF 胚、SCNT 胚ともに 1~4 細胞期で細胞核内に局在していたものの、TSA 未

処理 SCNT 胚では 1 細胞期核においてシグナルが弱い傾向がみられ、さらに TSA 未処理 SCNT 胚では、ヒストン H2A.Z のアセチル化もみられないことを認めている。これらの結果は、排卵卵子にはヒストン H2A.Z のリモデリングを担う分子が蓄積されているが、SCNT 胚ではヒストンリモデリング分子の減少やヒストン H3K56 のアセチル化の低下、ヒストン H2A.Z の非アセチル化などの要因によりヒストン H2A.Z の除去機構が働かず、HDACi はヒストン H2A.Z の除去機構の活性化をもたらしている可能性を示しており、リプログラミングをもたらすクロマチンリモデリングの分子機構について興味深い知見を提示している。

第 4 章では、ヒストン H2A.Z が体細胞ではペリセントロメア領域の主要なヒストン H2A バリエーションである (Probst and Almouzni, 2011) ことに着目している。ペリセントロメア領域は、体細胞では凝集してクロモセーターを形成し発現抑制されているが、受精後はヒストン H2A.Z を持たずクロマチン構造が緩んで発現を示し (Probst *et al.*, 2010)、また、ペリセントロメア近傍には発生関連遺伝子が数多くコードされている。そこで、細胞核内の空間配置を可視化する 3D-FISH 法を駆使して、初期胚と培養体細胞でペリセントロメア領域、ZGA 関連遺伝子座 (*Zscan4*) (Falco *et al.*, 2007)、*Zscan4* をコードする 7 番染色体の染色体テリトリー (CT7) の時空間情報に関する解析を行っている。その結果、ペリセントロメア領域の細胞核内配置については、線維芽細胞ではクロモセーターを形成し細胞核内で斑状に散在するのに対し、受精後 1~2 細胞期では核小体様構造 (NLB) を取り囲むように分布し、4 細胞期になるとクロモセーター様の構造に再編成されること、そして TSA 未処理 SCNT 胚 1 細胞期では、ペリセントロメア領域は体細胞に類似した配置パターンを示すことを明らかにしている。CT7 については、初期胚では ES 細胞や線維芽細胞に比して大きく、膨化して不定形を示し、NLB を取り囲んでいるが、SCNT 胚では核膜直下で扁平に伸展するような形状を示し、著しく異なることを明らかにしている。また、TSA 処理による CT7 の形状の著しい変化は認められなかった。*Zscan4* 遺伝子座については、線維芽細胞では *Zscan4* は CT7 内部に位置していたが、1~4 細胞期胚や ES 細胞では CT7 表面に配置していること、一方、初期胚で転写活性のない RP23-240D19 領域は *Zscan4* とは逆の配置を示すことを明らかにしている。さらに、SCNT 胚では、*Zscan4* は CT7 表面にあり核膜寄りに位置し、TSA 処理を施しても配置は変わらないことを認めている。最後に、CT7 の容積の計測を行い、初期胚の CT7 は ES 細胞や線維芽細胞と比して著しく膨大していること、また、TSA 処理の有無にかかわらず、SCNT 胚では IVF 胚と比べ、CT7 の容積が小さいことを明らかにしている。これらの結果は、受精後、ペリセントロメア近傍領域や CT の形態的・構造的変化、*Zscan4* 遺伝子座の CT7 内での移動が 1~4 細胞期で起きており、体細胞とは大きく異なっていることを初めて見出したものであり、生殖生物学、発生生物学の新たな知見となるものである。さらに、SCNT 胚において、ペリセントロメア領域のクロモセーター化、CT7 の細胞核内での配置、形状、容積の IVF 胚との大きな相違、*Zscan4* 遺伝子座の核膜近傍への配置など、総じて細胞核内構造が受精卵とは著しく異なっており、ゲノム機能発現に大きく影響しうることを明確に示唆する重要な知見を提示している。また、本研究において考案したチャンバー装置 (EASI-FISH chamber; Embryo Anchoring for Spatial Information) は、簡便で再現性の高い初期胚 3D-FISH 解析を可能とし、当該研究領域へ大きく貢献する成果である。

以上のように、本論文は、SCNT において体細胞より持ち込まれるヒストン H2A.Z が、HDAC 阻害剤により選択的に除去されることを初めて明らかにするとともに、HDACi に応答したヒストン H2A.Z の局在パターンと SCNT 胚の発生能との相関など、ゲノム機能発現の構造的基盤を成すクロマチンの動態が SCNT 胚の発生に及ぼす影響について重要な知見を提示している。さらに、初期胚 3D-FISH 解析用チャンバーを考案し、体細胞と初期胚、初期胚と SCNT 胚で、染色体構造や ZGA 関連遺伝子座の空間配置が著しく異なることを初めて明らかにするなど、受精・発生における細胞核ダイナミクス研究に大きく貢献する論文ともなっている。このように、本論文は、発生プログラムにおけるゲノム機能発現のしくみや SCNT におけるリプログラミングの構造基盤の解明に寄与する内容であり、博士(工学)論文として価値のあるものと認める。