

博士論文 (要約)

**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**

羽田 政司

## 目次

論文内容の要旨	2
略語一覧	6
第1章 序論	7
第2章 材料と実験方法	13
第3章 実験結果	28
第4章 総合討論	61
参考文献	67
謝辞	71

## 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*<sup>TA/TA</sup>)。 *Th2a*<sup>TA/TA</sup> 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*<sup>TA/TA</sup> 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.

## 略語一覽

ACA;	anti-centromere antibody
GS cell;	germ-line stem cell
GV;	germinal vesicle
GVBD;	germinal vesicle break down
MI;	metaphase I
MII;	metaphase II
PNA;	peanut agglutinin
pTH2A;	phosphorylation of 127th threonine in TH2A
SAC;	spindle assembly checkpoint
SGOL2;	shugoshin-like 2
ssODN;	single-stranded oligo DNA
TH2A;	testis-specific H2A
TH2B;	testis-specific H2B

# 第 1 章 序論



## **第1節 はじめに**

ヒトのゲノムは約3億塩基対のDNAから構成されており全長2メートルにも達する。この長大なゲノムDNAを核内に収納しているものがヒストンタンパク質である。DNAとヒストンから構成される構造はヌクレオソームと呼ばれ、4種類のヒストンサブユニット(H2A, H2B, H3, H4)から成るヘテロ8量体に、146塩基対のDNAが巻きついた構造をしている(図1A)。ヌクレオソームを最小単位として更なる高次構造をとったものがクロマチンであり、その構造調節は染色体分配などの生命現象と密接な関係にある。

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、特異的な修飾結合因子を呼び込んだり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(カノニカル)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も認められ、特殊な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ントの存在が報告されているが(Govin et al. 2005; Govin et al. 2007)、それらの多くは未だ機能が解明されていない。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(Seong et al. 2011; Siklenka et al. 2015)、精子形成過程におけるヒストンバリエントの生理学的機能の解析は重要な課題となっている。

### **第1項、ヒストンリン酸化修飾と染色体分配**

クロマチンの構造はヒストンタンパク質への翻訳後修飾やヒストンバリエントの置換(後述)などによって厳密に制御されている。ヒストンはリジン/アルギニン残基へのメチル

化・アセチル化修飾などの多様な翻訳後修飾を受けるが、特に細胞分裂期に特徴的なものがセリン/トレオニン残基へのリン酸化修飾である。例えばヒストン H3 の 10 番目のセリン残基におけるリン酸化修飾は細胞分裂中期のマーカー修飾として有名だが、テトラヒメナでは細胞分裂中期における染色体凝集に重要であることが報告されている (Wei et al. 1999)。また、いくつかのヒストン修飾は特異的な結合因子をクロマチンに呼び込むことによって下流の現象を誘発する。その 1 例として、マウス H2A の 120 番目のトレオニン残基におけるリン酸化修飾には、正常な染色体分配に必須のタンパク質である Shugoshin (Sgo) が結合する (Kawashima et al. 2010)。

当初 Sgo は分裂酵母の減数分裂期において、姉妹染色体のセントロメア領域を束ねたコヒーシンを保護する分子として同定された (Kitajima et al. 2004)。Sgo を介してコヒーシンを保護する機構は種間での保存性が高く、第 1 減数分裂中期の姉妹染色体を同一方向へ分配するための普遍的分子基盤と考えられている (Watanabe 2012)。実際、マウスにおける Sgo ファミリータンパク質である SGOL2 の欠損マウスは、第 1 減数分裂期に染色体分配異常を呈し不妊である (Llano et al. 2008)。また最近の研究によって SGOL2 はコヒーシンの保護以外にも、セントロメア領域において特定のタンパク質と結合し、例えば染色体の伸張などを制御していることが報告された (Rattani et al. 2013)。Sgo がこのように多様な機能を発揮するためには、Sgo を正確にセントロメア領域に局在させる機構が必要である。分裂酵母では上述の H2A-pT120 (酵母では H2A-pS121) が唯一の制御機構として示されているが (Kawashima et al. 2010)、多くのヒストン遺伝子やヒストンバリエントが混在する哺乳類の減数分裂期では未だ議論の余地が残されている。

## **第 2 項, ヒストンバリエントと精子分化**

ヒストンは N および C 末端テールを除くコア領域と DNA が接するため、コア領域を構

成するアミノ酸配列全てがヌクレオソーム構造に影響を与える。それゆえにカノニカルヒストンとはアミノ酸配列がわずかに異なるヒストンバリエントからは特異的な構造が形成される。いくつかのヒストンバリエントは体細胞においても発現しているが、精子分化過程では他の細胞種に類を見ないほど大規模なクロマチン構造の再構成が行われるため、更に多様なヒストンバリエントが取り込まれる (図 1B)。

精子形成の最終過程において、精子核はゲノムの物理的補強・精子運動能獲得のために高度に凝集される。このためにヒストンバリエントを含む大部分のヒストンは、一部を残して核内から排除され、精巣特異的高塩基性タンパク質プロタミンに置換される。このプロタミン置換に先行して、マウスではヒストン H2A バリエントである H2AL1/L2 やヒストン H1 バリエントである HILS1 など取り込まれる (Yan et al. 2003; Govin et al. 2007)。従ってこのようなヒストンバリエントは、ヒストンの排斥あるいはプロタミン置換に重要であると考えられている。また減数分裂期のヒト精母細胞にはヒストン H3 バリエントである H3T が取り込まれており (Witt et al. 1996)、減数分裂期における機能が示唆されている。このように精子形成過程では多様なヒストンバリエントが時期特異的なクロマチン構造を形成しているとされているが、上記のものを含む大部分の精巣特異的ヒストンバリエントは未だその生理的機能が示されていない。一方でヒストン H2A, H2B の精巣特異的バリエントである TH2A と TH2B (TH2A/B) (Shires et al. 1976; Trostleweige et al. 1982) は、最近の研究によって精子形成と初期胚発生に重要であることが報告された。

### **第3項, 精巣特異的ヒストンバリエント TH2A と TH2B**

精子形成過程において TH2A/B は最も未分化な細胞である精原細胞の段階から発現しており、ほぼ全ての雄性生殖細胞のクロマチンに取り込まれている (Montellier et al. 2013; Shinagawa et al. 2015)。この発現パターンに対して、TH2A/B を欠損させた雄マウスは減数

分裂期に異常を呈するが、興味深いことに上述したコヒーシンが第 1 減数分裂後の細胞に過剰に残存してしまうことが報告されている (Shinagawa et al. 2015)。TH2A/B がどのようにコヒーシンに影響を与えているかは未だ示されていないが、TH2A/B の重要な機能の 1 つと考えられている。TH2A/B はまた、雌の減数分裂期の細胞である卵母細胞や受精卵にも発現しており、初期胚発生に伴い減少する。TH2A/B 欠損卵母細胞から得られた初期胚では、雄ゲノム由来の遺伝子発現に異常をきたし、初期胚の発生効率が低下することが示されている (Shinagawa et al. 2014)。TH2A/B によるこれらの機能は、TH2B 単独の欠損マウスは生殖可能な精子を生産できることを考慮すると (Montellier et al. 2013)、両者の協調的なものあるいは TH2A 単独のものとも考えられる。

#### **第 4 項, 精子マススペクトロメトリー解析による新規 TH2A リン酸化修飾の発見**

TH2A に関する過去の報告は極めて少ないが、私は修士課程に行った研究において、TH2A が成熟精子にも残存していること、更に TH2A の 127 番目のトレオニン残基がリン酸化修飾 (pTH2A) を受けている可能性をマススペクトロメトリー解析で見出していた (図 2)。アミノ酸配列が高度に保存されているヒストンファミリーでは、バリエーションに固有の修飾を発見するのは技術的に困難であり、実際これまでに複数同定されている精巣 (生殖細胞) 特異的ヒストンバリエーションの中で、その修飾に関する報告は皆無である。さらにこの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 (図 3A)。このユニークな特徴から pTH2A は、上述の TH2A/B 欠損マウスで見られた生殖細胞の表現型を含め、生殖細胞の分化に深く関与している可能性が期待された。

## **第2節, 本研究の課題と目的**

第1節で述べたように、精子の形成過程では、多様なヒストンバリエントが取り込まれることによって、精子形成に重要なクロマチン環境が構築されていると考えられている。これには数アミノ酸残基の差異がクロマチンの構造的変換を促す例に加え、ヒストンバリエント特異的な翻訳後修飾を介した制御も存在すると考えられるが、未だそのような報告はなく、本研究が最初の例になると考えられる。

本研究では修士課程研究で得られた成果を基盤とし、その発展とヒストンバリエントの修飾を介した生殖細胞分化の理解を目的として pTH2A 特異的認識抗体を作製し、生体内におけるその存在および動態を詳細に解析した。次に TH2A リン酸化部位をアラニン残基に置換した変異マウスを作出し、その表現型解析を通して pTH2A の生理学的機能の解析を試みた。

## 第 2 章 材料と実験方法

## **第1節, 材料**

### **第1-1項, プラスミドDNA**

- F-H2A/pMSCV ; マウス幹細胞ウイルス由来レトロウイルスベクターである pMSCV ベクターに、N 末端に Flag タグを融合したマウス H2A cDNA (NM\_175660) を挿入したもの。
- F-TH2A/pMSCV ; pMSCV ベクターに、N 末端に Flag タグを融合したマウス TH2A cDNA (NM\_175658) を挿入したもの。
- F-TH2A\_T127A/pMSCV ; F-TH2A/pMSCV において TH2A の 127 番目のトレオニン残基をアラニン残基に置換したもの。
- 3HA-Aurora C/pMSCV ; pMSCV ベクターに、N 末端に 3 連続の HA タグを融合したマウス Aurora kinase C (NM\_020572) を挿入したもの。
- pCR-gRNA\_cloning vector; Addgene から購入したもので (#41824)、CRISPR/Cas9 システムにおける guide RNA(gRNA) の鋳型配列が挿入されている。
- pcDNA3.3-hCas9 ; Addgene から購入したもので (#41815)、CRISPR/Cas9 システムにおけ hCas9 配列が挿入されている。
- hCas9/pcDNA3.1; pcDNA3.3-hCas9 の hCas9 配列を pcDNA3.1-poly (A) 83 vector に挿入したもの。

### **第1-2項, マウス**

全ての実験において 5-14 週齢の C57BL/6J Jcl, ICR, BDF1 (C57BL/6 系統と DBA/2 系統の混血) 系統のマウス(日本クレア)を使用した。ただし老化卵を用いた実験の際には、若齢と老齢マウスとして 2 ヶ月と 17-19 ヶ月齢の BDF1 系統マウスをそれぞれ使用した。

### **第 1-3 項, プライマー**

本研究において使用した全てのプライマーを表 1 (p. 58) にまとめた。

### **第 1-4 項, 1 本鎖オリゴ DNA**

「第 2-5 項, マウス受精卵における CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集」で用いる 1 本鎖オリゴ DNA は、以下の 135 塩基長の配列を合成し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で精製した (北海道システムサイエンス)。

5'GTCCTGCCCAACATCCAGGCCGTGCTGCTGCCCAAGAAGACCGAGAGCCACAAGTCCC  
AGGCCAAGTGAATTCTCCTGCACAAGACAGCAACCATCAGTTTAAACAAAAAGGCTCTTTT  
CAGAGCCACCTTCAT3'



## **第2節, 実験方法**

### **第2-1項, 細胞培養と遺伝子導入**

HEK293T細胞 (ATCC number; CRL-11268) はATCCから入手した。培養には Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose (DMEM, Wako) に 10 % fetal bovine serum (FBS), 1% GlutaMAX (Gibco), 1% penicillin, streptomycin (Gibco) を加えたものを使用した。Nocodazole (Sigma) を処理する際は、終濃度 100 nM となるように培地に添加し、1 昼夜培養した。一方プラスミド DNA の導入は Lipofectamin 2000 (Invitrogen) を用い、添付説明書に従って行った。

精子幹細胞 (GS 細胞) は 8 日齢の DBA/2 マウス精巣から Kubota らの方法に従って分離し、Aoshima らの方法に従って培養した (Aoshima et al. 2013)。培地は MEM $\alpha$  (Wako) に 2% knockout serum replacement (Gibco), 1 % GlutaMax, 1 % MEM non-essential amino acids solution (Gibco), 1 % penicillin, streptomycin, 0.1 % 2-mercaptoethanol (Gibco), 0.2 % bovine serum albumin (BSA, MP Biochemicals), 5 ug/mL insulin (Sigma), 10 ug/mL transferrin (Sigma), 0.5 mL/L Fatty Acid Supplement (Sigma), 7.6 ueq/L Free Fatty Acid mixture (Sigma), 30 nM sodium selenite (Sigma), 10 mM hepes-KOH, 60 uM putrescine (Sigma), 1 % MEM Vitamin solution (Gibco), 20 ng/mL Human GDNF Unconjugated (Peprotech) を加え、フィルター滅菌したものを使用した。また、フィーダー細胞として mitomycin C (Wako) 処理を施したマウス線維芽細胞を用いた。

### **第2-2項, *in-vitro* 転写 (IVT)**

T7 ポリメラーゼによる *in vitro* 転写が可能な pcDNA3.1-poly (A) 83 vector に目的の遺伝

子の cDNA を挿入したものをテンプレートとして用いた (Yamagata et al. 2005)。まず環状プラスミドを制限酵素 XbaI 消化により線状化し、アガロースゲル電気泳動とフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿にて精製した。gRNA のテンプレートは、T7 プロモーターとガイド配列を含むプライマーを用い、pCR-gRNA\_cloning vector を鋳型とした PCR 法にて増幅させた。IVT 反応は RiboMAX Large Scale RNA Production system T7 (Promega) に Ribo m7G cap analog (Promega) を添加させたもの、もしくは mMACHINE mMACHINE T7 Transcription kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。合成した RNA は Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel) で精製し、RNase-free の水に溶解させた。gRNA の場合は RiboMAX Large Scale RNA Production system T7 を Ribo m7G cap analog を添加せずに使用し、フェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行い、Illustra Microspin G-25 columns (GE Healthcare)にて精製した。

### **第 2-3 項, $\alpha$ -pTH2A 抗体の作製**

$\alpha$ -pTH2A 抗体の作製は Medical & Biological Laboratories corporation (MBL) に委託した。マウス pTH2A ペプチド (CKTESHKSQphoTK) を抗原として、2 ヶ月の間に 2 週間隔でウサギに投与した。得られた抗血清は pTH2A ペプチドでアフィニティー精製した後、非リン酸化反応画分をマウス TH2A ペプチド (CKTESHKSQTK) にて吸収精製し、リン酸化反応画分を濃縮した。

### **第 2-4 項, Germinal vesicle 期 (GV 期) 卵母細胞の採取と *in-vitro* 成熟**

GV 期卵母細胞は雌マウスに 7.5 I.U. の pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG; ASKA Pharmaceutical) を投与した 46 から 48 時間後に採取した。まず過排卵処理を施した卵巣を摘出し、D-MEM に 10% FBS を添加した培地内にて 27 ゲイジの針を用いて卵胞を破裂させた。この際、0.25 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; Sigma) を培地に添加す

ることにより、MI 期への自発的な進行を阻害した。十分成熟した GV 期卵母細胞を回収し、mTAM 培地に 5 mM L-carnitine (mTAML) と IBMX を添加した培地に移した。減数分裂を再開させるために IBMX 非添加の mTAML で GV 期卵母細胞を洗浄し、90 分以内に第 1 減数分裂中期に移行した細胞、すなわち核膜崩壊 (GVBD) を起こした細胞を回収して以降の実験に用いた。

薬剤処理を施す場合、5  $\mu$ M AZD1152 (Sigma), 0.5  $\mu$ M RO-3306 (Sigma), もしくは同量の DMSO を培地に添加した。

#### **第 2-5 項, マウス受精卵における CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集**

第 2 減数分裂中期 (MII 期) 卵母細胞は 7.5 I.U. の PMSG 処理を施した 46 から 48 時間後に 7.5 I.U. の human chorionic gonadotropin (hCG; ASKA Pharmaceutical) 投与し、16 から 17 時間後に採取した。簡単に、卵管膨大部をピンセットで破き、MII 期卵母細胞を HTF 培地 (ARK Resource) に移した。受精方法について、試験管内受精 (IVF) させる場合は、まず雄マウスの精巢上体尾部から採取した成熟精子を TYH 培地 (ARK Resource) に移し、37°C で 1 時間前培養した。この約 1/50 量の精子溶液を MII 期卵母細胞に添加し、37°C で 2 から 4 時間放置させることにより受精させた。一方自然交配にて受精させる場合は、hCG 投与後に雄マウスと一晩同居させ、プラグが確認できたマウスから上記の方法にて受精卵を採取した。

遺伝子導入の際は受精卵を M2 培地 (ARK Resource) に移し、100 から 150 ng/ $\mu$ l hCas9-mRNA, 25 ng/ $\mu$ l gRNA、そして 100 ng/ $\mu$ l の一本鎖 DNA オリゴヌクレオチドの混合液を導入した。具体的に、顕微鏡下にて空圧式マイクロインジェクター (Narishige) とピエゾマイクロナニピレーター (Prime Tech.) を用いて受精卵の細胞質と前核内に約 2 から 4 pl の

核酸混合溶液を注入した。

遺伝子導入した受精卵は 37°C で一晩培養することにより 2 細胞期初期胚まで成長させた。ゲノム編集効率を検討する際は、2 細胞期初期胚を KSOM 培地 (ARK Resource) に移し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で 4 から 5 日間培養することにより胚盤胞期初期胚まで発生させ、polymerase chain reaction (PCR) 法を用いたジェノタイピングにより確認した。一方胚移植する際は 2 細胞期初期胚を、偽妊娠処理させた ICR 雌マウスの子宮に移植した。

### **第 2-6 項, *Th2a*<sup>TA/TA</sup> マウスのジェノタイピング**

試薬

A solution;                                25 mM NaOH, 0.2 mM EDTA

B solution;                                40 mM Tris (unadjusted pH)

生後 5 日以降のマウスの指を 1 本切断し、A solution に懸濁させて 95°C で 45 分間放置した。次に等量の B solution を添加し、遠心することによって回収した上清をマウスゲノム粗抽出画分とした。目的のゲノム配列は、マウスゲノム粗抽出画分から Quick Taq HS (TOYOBO) を用いた PCR 法によって増幅させ、得られた PCR 産物を EcoRI (NEB) によって消化した。これを 3% アガロースゲルで展開し、90 bp サイズシフトしたバンドの量によって TA アレルの有無を判断した。

### **第 2-7 項, ウェスタンブロット法**

試薬

1st Ab dilute buffer;                    0.2 % Tween-20 in Odyssey Blocking Buffer (LI-COR)

2nd Ab dilute buffer;                    0.2 % Tween-20, 0.01 % SDS in Odyssey Blocking Buffer

TBS; 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl

TBST; 0.05 % Tween-20 in TBS

SDS-PAGEにより展開したサンプルを Immobilon-FLメンブレン (Millipore) に転写した。これを Odyssey Blocking Buffer (LI-COR) に室温で震盪させて、抗体の非特異的結合を防いだ。次に 1st Ab dilute buffer で適当量に希釈した以下の 1 次抗体をメンブレンと反応させた。α-DYKDDDDK タグ (1:3000; clone no. 1E6, Wako), α-H3 (1:3000; abcam), α-H3-pS10 (1:1000; cell signaling), α-HA (1:1000; clone no. 12CA5, Roche), α-TH2A (1:3000; (Shinagawa et al. 2014)) (1 µg/ml; 本研究で作製したもので、図 3E のみに使用), α-pTH2A (1 µg/ml; 本研究で作製したもの)。次に TBST で 3 回洗浄した後、適当量の IRDye 標識 2 次抗体 (LI-COR) を 2nd Ab dilute buffer で希釈して反応させた。TBST で洗浄したあと、Odyssey Class (LI-COR) で蛍光検出した。得られた画像は Odyssey imaging system (LICOR) または ImageJ software (National Institutes of Health) によって加工した。

## **第 2-8 項, *In-vitro* リン酸化反応**

### 試薬

IP buffer 500; 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP-40, 1 mM DTT

Kination buffer; 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>

Reaction buffer; 1 mM ATP, Proteinase inhibitor cocktail, Phostop (Roche), 4 µg/ml Flag peptides (Sigma-Aldrich) in kination buffer

3HA-Aurora C と F-TH2A を HEK293T 細胞に過剰発現させた。細胞懸濁液を PBS にて洗浄した後、IP buffer 500 に懸濁した。遠心にて回収したクロマチン沈殿物を IP buffer 500 に

て再懸濁させ、benzonase (Novagen) を添加して 4°C で 1 時間転倒混和させることによりゲノムを消化させた。その後、遠心にて不溶性タンパク質沈殿を除去し、クロマチン粗抽出画分を得た。次に、Anti-FLAG M2 Magnetic Beads (Sigma-Aldrich) あるいは Dynabeads Protein G に結合させた抗 HA 抗体 (clone no. 3F10, Roche) を用いて、クロマチン粗抽出画分に作用させた。抗体と抗原は 4°C で一昼夜転倒混和することにより結合反応させ、ビーズを IP buffer 500 にて 4 回、kination buffer にて 1 回洗浄した。洗浄後のビーズは reaction buffer にて再懸濁し、30°C で 1 時間攪拌させながらリン酸化反応させた。

### **第 2-9 項, 免疫染色法**

後述する各調製方法によって準備した試料に blocking buffer で希釈した以下の 1 次抗体を作用させた。α-pTH2A 抗体 (3 ng/μl; 本研究で作製したもの), α-TH2A 抗体 (3 ng/μl; (Shinagawa et al. 2014)), α-TH2A 抗体 ((Shinagawa et al. 2014)) に Alexa546 を Zenon Fluor Rabbit IgG Labeling kit (Life) にて標識したもの (1:100), α-SCP3 抗体 (1:1000; (Morimoto et al. 2012)), α-PRM2 抗体 (1:1000, 東京大学 分子細胞生物学研究所 白髭克彦研究室にて作製したもの), α-H3 抗体 (1:100, abcam), ACA (1:30; Antibodies online), α-SGOL2 抗体 (1:500, (Kawashima et al. 2010)), α-REC8 抗体 (1:500 (図 8), 1:200 (図 14); (Kim et al. 2015)), α-pAurora A/B/C 抗体 (1:100; Cell signaling), α-DSN1-pS100 抗体 (1:100; 東京大学 分子細胞生物学研究所 渡邊嘉典 教授からご分与頂いたもの), α-DYKDDDDK タグ抗体 (1:1000; clone no. 1E6, Wako)。試料を洗浄した後に、Alexa488-, 564-, 647-で標識した 2 次抗体 (Life) または fluorescein isothiocyanate-で標識した PNA (2 ng/μl; Sigma), そして Hoechst 33342 (Invitrogen) を作用させた。試料を再度洗浄した後、免疫染色画像を FV1000、FV1200 共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Olympus) 、または IX83 倒立型顕微鏡 (Olympus) によって取得した。卵母細胞の全体標本を撮影する際は、画像を z 軸方向に 1 μm 間隔で撮影した。得られた画像は FLUOVIEW software (Olympus) または ImageJ

software によって加工した。

## **第 2-10 項, 精巣凍結切片の免疫染色法**

### 試薬

4% PFA buffer;	4% paraformaldehyde (PFA) in PBS
1% PFA buffer;	1% PFA, 0.1% Triton X-100 in PBS
Sucrose buffer;	Sucrose in PBS
Citrate solution;	10 mM sodium citrate pH 6.0, 0.1% Tween-20
Blocking buffer;	5% goat serum (Vector) in TBST

雄マウスから摘出した精巣は 4% PFA buffer を用いて一晩固定した。この際 27 ゲイジの針で複数箇所穴を開けた。固定した精巣は 10%, 20%, 30% sucrose buffer で段階的に脱水した後、optimal cutting temperature (OCT) コンパウンド (Sakura Finetech) に包埋した。液体窒素で凍結した組織ブロックは、10 から 20 $\mu$ m の厚みで精巣凍結切片を切り出した後、ドライヤー (Panasonic) の冷風で 30 分間乾燥させた。減数分裂期精母細胞の pTH2A を検出する際は、未固定の状態でも OCT コンパウンドに包埋し、凍結切片作製後に 1% PFA buffer にて固定した。

切片は TBST で洗浄した後、凝集精子細胞の pTH2A を検出する際は citrate solution で抗原を賦活化させた。具体的に、切片を浸した citrate solution を沸騰させて 15 分間放置し、再び沸騰させて 30 分間放置した。TBST で洗浄した後、blocking buffer にて抗体の非特異的結合を防ぎ、免疫染色に供した。

## **第 2-11 項, 成熟精子の免疫染色法**

### 試薬

Suspension solution; 50 µg/ml heparin, 0.2% Triton X-100, 10 mM DTT in PBS

Fix buffer; 3.7% formaldehyde in PBS

Blocking buffer; 1% BSA in TBST

精巣上体尾部から採取した成熟精子を PBS にて洗浄した後、suspension solution にて懸濁した後、氷上で 30 分間放置した。TBST にて洗浄した後、fix buffer で室温にて 15 分間固定した。TBST にて再度洗浄した後、MAS コートスライドガラス (Matsunami Glass) にスポットし、完全に乾燥させた。次に 70%, 100% エタノールで室温、100% メタノールで -30°C, 30 分間固定した後、上述した citrate solution で抗原を賦活化させた。TBST で洗浄した後、blocking buffer にて抗体の非特異的結合を防ぎ、免疫染色に供した。

## **第 2-12 項, 精母細胞のクロモソームスプレッド法**

### 試薬

Hypotonic buffer; 30 mM Tris-HCl pH 7.2, 17 mM sodium citrate 5 mM EDTA, 50 mM sucrose

Sucrose buffer; 0.2M sucrose in PBS

Fix buffer; 1% PFA, 0.1% Triton X-100 in PBS

Blocking buffer; 5% goat serum in TBST

Shibuya らの方法に従った (Shibuya et al. 2014)。精細管をピンセットで細かく刻み、100 µm, 70 µm のセルストレイナー (BD Falcon) で段階的に濾過した。遠心にて細胞を回収し、hypotonic buffer で懸濁した後、氷上で 5 分間放置した。更に遠心することによって細胞質



画分を除去し、核沈殿物を sucrose buffer にて再懸濁した。この懸濁液を MAS コートスライドガラスにスポットし、同量の fix buffer を添加して湿潤環境下で室温 3 時間固定した。TBST で洗浄した後、blocking buffer にて抗体の非特異的結合を防ぎ、免疫染色に供した。

### **第 2-13 項, 卵母細胞のクロモソームスプレッド法**

#### 試薬

Fix solution;                    1% PFA pH 9.2, 0.15% Triton X-100, 3 mM DTT in distilled H<sub>2</sub>O  
adjusted to pH 9.2

Blocking buffer;                3% BSA in TBS

Kim らの方法に従った。卵母細胞の透明体を Tyrod's solution (Sigma Aldrich) を用いて除去した。4 から 9 個の卵母細胞を、fix solution を含んだ細いガラスキャピラリーで吸い上げ、MAS コートスライドガラスにスポットした。迅速に乾燥させた後に、TBS にて洗浄した。Blocking buffer にて抗体の非特異的結合を防いだ後、免疫染色に供した。

### **第 2-14 項, MI 期卵母細胞の全体標本の免疫染色法**

#### 試薬

Fix buffer;                      1.6% PFA, 100 mM 1, 4-piperazineethanesulfonate (= PIPES) pH  
7.0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100

Permeabilization buffer;    0.1% Triton X-100 in TBS

Blocking buffer;                3% BSA, 0.1% Triton X-100 in TBS

*In-vitro* で同調培養した卵母細胞を fix buffer にて室温 30 分間固定した。固定試料は permeabilization buffer で洗浄した後に blocking buffer に移した。1 次抗体は blocking buffer

または Triton X-100 を除いた (DSN1-pS100 の染色) blocking buffer にて適当量に希釈し、免疫染色を行った。相同染色体キネトコア間の距離を測定する際は、相同染色体キネトコアを同一平面上で撮影できた試料のみ解析に使用した。

### **第 2-15 項, HEK293T 細胞と GS 細胞の免疫染色法**

#### 試薬

4% PFA buffer;	4% PFA in PBS
Permeabilization buffer;	0.1% Triton X-100 in PBS
Blocking buffer;	5% goat serum in TBST

HEK293T 細胞および GS 細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュ (Iwaki) に播種し、適切な密度になるまで上述した方法によって培養させた。細胞を PBS にて洗浄し、4% PFA buffer にて室温で 15 分間固定した。固定後の細胞は permeabilization buffer で透過処理を行った。Blocking buffer にて抗体の非特異的結合を防いだ後、免疫染色に供した。

### **第 2-16 項, 精子のアクリジンオレンジ染色**

#### 試薬

Fix solution;	Ethanol:acetone = 1:1
Staining solution;	0.019% acridine orange (同仁化学), 76.2 mM sodium citrate, 14.2 mM NaHPO <sub>4</sub> in distilled H <sub>2</sub> O adjusted to pH 2.5

精巣上体から採取した精子を PBS で洗浄し、約  $5 \times 10^5$  細胞をスライドガラスに塗布して乾固させた。スライドガラスはエタノールとアセトンの等量混合液に浸して 4°C, 1 時間放置した。PBS で洗浄した後、staining solution で室温 7 分間処理した。水で軽く洗浄した後、

ロングパスフィルターを用いて 1 本鎖 (630-650 nm) 及び 2 本鎖 (520 nm) DNA に取り込まれたアクリジンオレンジの蛍光を検出した。

#### **第 2-17 項, 免疫染色画像の定量方法**

MI 期卵母細胞全体標本の免疫染色画像の定量方法を、pTH2A と ACA 染色を例として記す (図 18)。約  $1.19 \mu\text{m} \times 1.19 \mu\text{m}$  の関心領域 (ROI) を各 ACA 輝度の最大値が得られる平面上において設定し、ACA の平均輝度 ( $I_{ACA}$ ) を測定した。次にバックグラウンドの平均輝度 ( $I_{Back}$ ) を測定するために新たな ROI を、ACA に設定した ROI の外部に手動で設定した。ACA の値は、ACA の平均輝度から細胞質の平均輝度を差し引くことによって計算した ( $I_{ACA-Back}$ )。同じ ROI を用いて、共免疫染色した pTH2A の値も計算した ( $I_{pTH2A-Back}$ )。1 つの動原体における pTH2A の相対値は、pTH2A の値を ACA の値で補正することによって求めた ( $(I_{pTH2A-Back})/(I_{ACA-Back})$ )。ただし、老齢卵における pTH2A の値は、同じ方法で計算した DNA の値で補正した。この方法によって基本的には全ての動原体 (40 個) における pTH2A の相対値を求め、それらの平均値を 1 つの卵母細胞における定量値とした。

MI 期卵母細胞のクロモソームスプレッド法による、pTH2A と ACA 共免疫染色画像の定量方法を記す。約  $1.49 \mu\text{m} \times 1.49 \mu\text{m}$  の ROI を用いて pTH2A と ACA の平均輝度を測定した。バックグラウンドの平均輝度を測定するために、画像の 4 角に手動で ROI を設定した。pTH2A 及び ACA の値は、それぞれの平均輝度から 4 つのバックグラウンドの平均輝度の平均値を差し引くことによって計算した。1 つの動原体における pTH2A の相対値は、pTH2A の値を ACA の値で補正することによって求めた。この方法によって 1 細胞辺り少なくとも 20 個以上の動原体における pTH2A の相対値を求め、それらの平均値を 1 つの卵母細胞における定量値とした。

MII 期卵母細胞のクロモソームスプレッド法による、REC8 と ACA 共免疫染色画像の定量方法を記す。MII 期のクロモソームスプレッド法はサンプル間におけるバラつきが大きいため、同程度の広がり方を示す画像を選び、解析に用いた。ROI は ACA と REC8 を囲うように手動で設定し、平均輝度を測定した。バックグラウンドの平均輝度を測定するため、染色体腕部に 4 つの ROI を手動で設定した。REC8 及び ACA の値は、それぞれの平均輝度から 4 つのバックグラウンドの平均輝度の平均値を差し引くことによって計算した。1 つの卵母細胞から少なくとも 15 個以上の染色体を定量し、更に ACA の値が平均値に近い 10 個を抽出した。全ての染色体における ACA の平均値を計算し、ACA の値が平均値よりも大きいものを「ACA high」、低いものを「ACA low」グループとした。各染色体における REC8 の相対値は、REC8 の値を ACA の値で補正することによって求めた。

上記の定量方法は ImageJ software を用いて行った。また全ての定量の際には盲検法を採用し、定量結果に主観が影響しないようにした。具体的に、画像の名前を伏せた状態でランダムに並び替えて定量した。統計学的な解析方法はそれぞれの図に記した。

## 第 3 章 実験結果

本章の内容は、雑誌等への出版を計画しているため公表することはできない。5年以内に出版予定である。

## 第 4 章 総合討論

## **第1節 本研究のまとめ**

本研究では配偶子形成期特異的に存在する新規ヒストン修飾 pTH2A に着目し、その生体内における機能を解析した。その結果、以下の点を明らかにした。

- 1), 生殖細胞特異的ヒストン H2A バリエーション TH2A Thr127 におけるリン酸化修飾を新規に同定した。
- 2), pTH2A は MI 期の精母細胞と卵母細胞、更に凝集精子細胞において特異的に存在しており、前者ではセントロメア領域に濃縮していた。
- 3), MI 期における pTH2A は Aurora B/C-CDK1 経路によって制御されていた。
- 4), 老化卵では pTH2A 量が減少していた。
- 5), pTH2A の欠損はセントロメア領域における SGOL2 の増加や染色体張力の低下、MII 期におけるコヒーシン残存量の増加などの異常を惹起した。

本研究の成果によって、配偶子形成期における新たなエピゲノムコードの存在を示したという学術的な知見のみでなく、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。



## 第2節, 本研究の成果・今後の展望

### 第2-1, MI期のpTH2A制御に関する考察

細胞分裂中期特異的なヒストン修飾はいくつか報告されているが、現在までにMI期とMII期または体細胞分裂中期を区別できるものは知られていなかった。本研究の解析でpTH2AがMI期特異的なヒストン修飾であり、更にそれがセントロメア領域に濃縮することを示した。このようなpTH2Aの時空間的な特異性はそのリン酸化酵素によってもたらされると考えられるが、MI期のタンパク質が概ね残存すると考えられるMII期でpTH2Aが存在しないことを考慮すると、リン酸化酵素の制御機構として遺伝子発現というより染色体構造などのMI期特異的な現象が関与していると考えられる。実際MI期の姉妹染色体の構造はMII期や体細胞分裂中期と異なり、コヒーシンによるセントロメア領域の接着を介して姉妹動原体が同一方向に配向している。従って、pTH2Aのリン酸化酵素およびその制御機構を明らかにすることによって、MI期特異的なセントロメア環境の構築に関する知見が得られると期待される。

生体内におけるpTH2Aの機能に関して、*Th2a<sup>TA/TA</sup>* 卵母細胞ではセントロメア領域のSGOL2局在量の増加や染色体張力の低下などの異常が観察された。これらはいずれも生殖能力の欠損に直結するほど重篤なものではなかったが、pTH2AがMI期の染色体分配機構に関与していることを示している。SGOL2は、セントロメア領域に修飾されたH2A-pT120に直接結合することによって局在特異性が担保されている。例えば分裂酵母では、マウスのH2A Thr120に対応するSer121をアラニン残基に変異すると、Sgoがセントロメア領域に局在できなくなる。またTH2Aのリン酸化部位(Thr127)はThr120に近い位置に存在することを考慮すると、pTH2A欠損がSGOL2増加を招いた原因として以下の2つの可能性が考えられる。1), pTH2Aが欠損したことによってH2AあるいはTH2A-pT120が増加した。

2), pTH2A によって SGOL2 のセントロメア局在が一部阻害されていた。pTH2A が SGOL2 の局在に影響を与える意義は定かではないが、pTH2A と SGOL2 の関係性をより詳しく解析することによって、新たな MI 期の染色体分配制御機構の一端が解明されると期待される。

### **第 2-3 項, 老化卵における pTH2A 減少に関する考察**

ヒトを含む哺乳類において、母体年齢と卵母細胞の染色体分配異常は密接な関係にある。全ての卵母細胞は胎児期に形成され、排卵されるまでの間を第 1 減数分裂前期の途中で停止している。よって長期間卵巣内に留まっていた卵母細胞には加齢と共に様々な異常が蓄積されてしまうが、特にコヒーシオンを含むセントロメア周辺因子の機能欠損は深刻で、老化に伴う不均等な染色体分配の主な要因と考えられている (Chiang et al. 2010)。

本研究の第 1-5 項の解析において、老化卵では pTH2A 量が顕著に減少していたことから、pTH2A が卵の老化と相関するヒストン修飾であることを示した。これまでの研究でも H3K79me2 や H4K14ac などのヒストン修飾が卵子の老化によって減少すると報告されているが (Liang et al. 2012)、いずれもゲノム全体に存在する性質のものであることから、加齢によるヒストン修飾とセントロメア周辺因子の異常との関係性は議論されることはなかった。従って pTH2A はセントロメア領域に存在し、かつ老化によって減少することが示されている唯一のヒストン修飾であるという点に関しても意義が大きい。

一方で pTH2A の欠損は SGOL2 の増加を誘発することを示したが、老化に伴う SGOL2 の動態は未だ結論が得られていない状況にある (Lister et al. 2010; Yun et al. 2014b)。その 1 つの要因として、マウス老化卵における SGOL2 の減少がマウス系統に依存しており、例えば C57Bl6/J 系統等では変化しないことが挙げられる (Yun et al. 2014a)。SGOL2 の欠損は多くのセントロメア周辺因子の異常を惹起してしまうことから、老化・pTH2A・SGOL2

の関係性を調べることにより、卵子の老化に伴う染色体分配異常を予防できることが期待される。

#### **第 2-4 項, 配偶子形成における pTH2A 欠損マウスの表現型に関する考察**

本研究では pTH2A は特徴的な染色体局在を呈することを示した一方で、作出した *Th2a*<sup>TA/TA</sup> マウスは正常な生殖能力を維持していた。この原因として、pTH2A の欠損をある種の補償経路が補ったものと考えられる。このような補償経路の存在は他のヒストンバリエーションおよびヒストン修飾の異常でも報告されており、例えば生殖細胞特異的ヒストン H2B バリエーションである TH2B の欠損が知られている (Montellier et al. 2013)。TH2B を欠損させたマウスは生殖可能な成熟精子を生産できるが、雄性生殖細胞におけるカノニカル H2B の発現と特定のヒストン修飾の上昇が観察されている。TH2B の機能としてヌクレオソーム構造を不安定化させることが報告されており (Govin et al. 2007)、TH2B 欠損によって上昇するヒストン修飾の中には同様の効果を与えるものが含まれていることから、これらが TH2B 欠損を補っているものと考えられている。その他にも細胞分裂中期のマーカー分子として知られている H3-pS10 の欠損が挙げられる。テトラヒメナにおける H3 Ser10 の変異は細胞分裂中期に染色体凝集異常を呈するが、分裂酵母ではそのような影響は見られない (Wei et al. 1999; Hsu et al. 2000)。この原因として分裂酵母では H2B の N 末端配列におけるリン酸化修飾が、H3-pS10 の機能を代替したものと考えられている (Banerjee and Chakravarti 2011)。H2B は H3 Ser10 と同様 Ipi1/Aurora ファミリータンパク質によってリン酸化修飾を受けるとされており、分裂酵母の H2B N 末端領域に存在するセリン残基は、H3 Ser10 と同じく塩基性アミノ酸残基に取り囲まれており、テトラヒメナではそのような類似性は保存されていない。以上に示した例のように pTH2A の欠損も、例えば TH2A Thr127 周辺のリン酸化修飾 (TH2A Thr120, Ser122, Ser125) や TH2B のリン酸化修飾などが補っている可能性が考えられる。

## **第 2-5, 精子核凝集期の pTH2A 制御に関する考察**

精子の形成過程でヒストンは多様な翻訳後修飾を受けるが、伸張精子細胞における H4 のアセチル化修飾を最後に、ヒストン修飾による精子クロマチン制御は完了するとされていた。これは上述のアセチル化修飾によって構造的に不安定化されたクロマチンからヒストンが排斥され、更にプロタミンが取り込まれることによって核が高度に凝集するからである (Govin et al. 2004)。

しかし本研究の解析で、TH2A はプロタミン置換以降の凝集精子細胞期にリン酸化修飾を受け、成熟精子まで維持されていることを示した。この精子核凝集期における pTH2A 制御機構として以下の 2 つの可能性が考えられる。1),核凝集後のクロマチンにおいてリン酸化酵素が直接修飾している。2), 細胞質においてリン酸化修飾をうけた TH2A がクロマチンに取り込まれている。これらの可能性は、プロタミンによる核凝集以降にも精子クロマチンの再編成が起きていることを示唆している。従って、凝集精子細胞期における pTH2A およびそのリン酸化酵素の機能を明らかにすることによって、新たな精子クロマチン構造の制御機構が解明される。

## 参考文献

- Aoshima K, Baba A, Makino Y, Okada Y. 2013. Establishment of Alternative Culture Method for Spermatogonial Stem Cells Using Knockout Serum Replacement. *Plos One* **8**.
- Banerjee T, Chakravarti D. 2011. A Peek into the Complex Realm of Histone Phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* **31**: 4858-4873.
- Bao J, Bedford MT. 2016. Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Reproduction (Cambridge, England)* **151**: R55-70.
- Chiang T, Duncan FE, Schindler K, Schultz RM, Lampson MA. 2010. Evidence that Weakened Centromere Cohesion Is a Leading Cause of Age-Related Aneuploidy in Oocytes. *Current Biology* **20**: 1522-1528.
- Davydenko O, Schultz RM, Lampson MA. 2013. Increased CDK1 activity determines the timing of kinetochore-microtubule attachments in meiosis I. *Journal of Cell Biology* **202**: 221-229.
- Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S. 2004. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* **271**: 3459-3469.
- Govin J, Caron C, Rousseaux S, Khochbin S. 2005. Testis-specific histone H3 expression in somatic cells. *Trends in Biochemical Sciences* **30**: 357-359.
- 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.
- Hsu JY, Sun ZW, Li XM, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, Grushcow JM, Brame CJ, Caldwell JA, Hunt DF et al. 2000. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* **102**: 279-291.
- Kawashima SA, Yamagishi Y, Honda T, Ishiguro K-i, Watanabe Y. 2010. Phosphorylation of H2A by Bub1 Prevents Chromosomal Instability Through Localizing Shugoshin. *Science* **327**: 172-177.
- Kim J, Ishiguro K-i, Nambu A, Akiyoshi B, Yokobayashi S, Kagami A, Ishiguro T, Pendas AM, Takeda N, Sakakibara Y et al. 2015. Meikin is a conserved regulator of meiosis-I-specific kinetochore function. *Nature* **517**: 466-471.
- Kitajima TS, Kawashima SA, Watanabe Y. 2004. The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* **427**: 510-517.
- Kitajima TS, Ohsugi M, Ellenberg J. 2011. Complete Kinetochore Tracking Reveals Error-Prone Homologous Chromosome Biorientation in Mammalian Oocytes. *Cell* **146**: 568-581.

- 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.
- Liang XW, Ma JY, Schatten H, Sun QY. 2012. Epigenetic changes associated with oocyte aging. *Sci China-Life Sci* **55**: 670-676.
- Lister LM, Kouznetsova A, Hyslop LA, Kalleas D, Pace SL, Barel JC, Nathan A, Floros V, Adelfalk C, Watanabe Y et al. 2010. Age-Related Meiotic Segregation Errors in Mammalian Oocytes Are Preceded by Depletion of Cohesin and Sgo2. *Current Biology* **20**: 1511-1521.
- Llano E, Gomez R, Gutierrez-Caballero C, Herran Y, Sanchez-Martin M, Vazquez-Quinones L, Hernandez T, de Alava E, Cuadrado A, Barbero JL et al. 2008. Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Genes & Development* **22**: 2400-2413.
- Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Zhang K, Buchou T, Fenaille F, Shiota H, Debernardi A, Hery P, Curtet S et al. 2013. Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes & Development* **27**: 1680-1692.
- Morimoto A, Shibuya H, Zhu X, Kim J, Ishiguro K-i, Han M, Watanabe Y. 2012. A conserved KASH domain protein associates with telomeres, SUN1, and dynactin during mammalian meiosis. *Journal of Cell Biology* **198**: 165-172.
- Rattani A, Wolna M, Ploquin M, Helmhart W, Morrone S, Mayer B, Godwin J, Xu W, Stemmann O, Pendas A et al. 2013. Sgol2 provides a regulatory platform that coordinates essential cell cycle processes during meiosis I in oocytes. *Elife* **2**.
- Russell LD, Ettlin RA, Hikim APS, Clegg ED. 1993. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. *International Journal of Andrology* **16**: 83-83.
- Sadeghi MR, Hodjat M, Lakpour N, Arefi S, Amirjannati N, Modarresi T, Jadda HH, Akhondi MM. 2009. Effects of Sperm Chromatin Integrity on Fertilization Rate and Embryo Quality Following Intracytoplasmic Sperm Injection. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* **1**: 173-180.
- Schuh M, Ellenberg J. 2007. Self-organization of MTOCs replaces Centrosome Function during Acentrosomal Spindle Assembly in Live Mouse Oocytes. *Cell* **130**: 484-498.
- Seong K-H, Li D, Shimizu H, Nakamura R, Ishii S. 2011. Inheritance of Stress-Induced, ATF-2-Dependent Epigenetic Change. *Cell* **145**: 1049-1061.
- Shibuya H, Ishiguro K-i, Watanabe Y. 2014. The TRF1-binding protein TERB1 promotes chromosome movement and telomere rigidity in meiosis. *Nature Cell Biology* **16**: 145-156.
- 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.
- Shinagawa T, Takagi T, Tsukamoto D, Tomaru C, Linh My H, Sivaraman P, Kumarevel T, Inoue K, Nakato R, Katou Y et al. 2014. Histone Variants Enriched in Oocytes Enhance Reprogramming to Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **14**: 217-227.
- Shires A, Carpenter MP, Chalkley R. 1976. CYSTEINE-CONTAINING H2B-LIKE HISTONE FOUND IN MATURE MAMMALIAN TESTIS. *Journal of Biological Chemistry* **251**: 4155-4158.
- Siklenka K, Erkek S, Godmann M, Lambrot R, McGraw S, Lafleur C, Cohen T, Xia J, Suderman M, Hallett M et al. 2015. Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. *Science* **350**.
- Soderstrom KO, Malmi R, Karjalainen K. 1984. BINDING OF FLUORESCCEIN ISOTHIOCYANATE CONJUGATED LECTINS TO RAT SPERMATOGENIC CELLS IN TISSUE-SECTIONS - ENHANCEMENT OF LECTIN FLUORESCENCE OBTAINED BY FIXATION IN BOUINS FLUID. *Histochemistry* **80**: 475-579.
- Tanno Y, Kitajima TS, Honda T, Ando Y, Ishiguro K-i, Watanabe Y. 2010. Phosphorylation of mammalian Sgo2 by Aurora B recruits PP2A and MCAK to centromeres. *Genes & Development* **24**: 2169-2179.
- Trostleweige PK, Meistrich ML, Brock WA, Nishioka K, Bremer JW. 1982. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TH2A, A GERM CELL-SPECIFIC VARIANT OF HISTONE-2A IN RAT TESTIS. *Journal of Biological Chemistry* **257**: 5560-5567.
- Tsukahara T, Tanno Y, Watanabe Y. 2010. Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature* **467**: 719-U111.
- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. 2013. One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell* **153**: 910-918.
- Watanabe Y. 2012. Geometry and force behind kinetochore orientation: lessons from meiosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**: 370-382.
- Wei Y, Yu LL, Bowen J, Gorovsky MA, Allis CD. 1999. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* **97**: 99-109.
- Witt O, Albig W, Doenecke D. 1996. Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. *Experimental Cell Research* **229**: 301-306.
- Yamagata K, Yamazaki T, Yamashita M, Hara Y, Ogonuki N, Ogura A. 2005. Noninvasive visualization of molecular events in the mammalian zygote. *Genesis* **43**: 71-79.
- Yan W, Ma L, Burns KH, Matzuk MM. 2003. HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-

- like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 10546-10551.
- Yang K-T, Li S-K, Chang C-C, Tang C-JC, Lin Y-N, Lee S-C, Tang TK. 2010. Aurora-C Kinase Deficiency Causes Cytokinesis Failure in Meiosis I and Production of Large Polyploid Oocytes in Mice. *Molecular Biology of the Cell* **21**: 2371-2383.
- Yoshida S, Kaido M, Kitajima TS. 2015. Inherent Instability of Correct Kinetochores-Microtubule Attachments during Meiosis I in Oocytes. *Developmental Cell* **33**: 589-602.
- Yun Y, Holt JE, Lane SIR, McLaughlin EA, Merriman JA, Jones KT. 2014a. Reduced ability to recover from spindle disruption and loss of kinetochore spindle assembly checkpoint proteins in oocytes from aged mice. *Cell Cycle* **13**: 1938-1947.
- Yun Y, Lane SIR, Jones KT. 2014b. Premature dyad separation in meiosis II is the major segregation error with maternal age in mouse oocytes. *Development* **141**: 199-208.



## 謝辞

本研究の機会と終始懇切なる御指導を賜りました東京大学 分子細胞生物学研究所 白髭克彦 教授に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、終始御指導頂きました東京大学 分子細胞生物学研究所 岡田由紀 准教授、牧野吉倫 助教に心より感謝致します。また、有益な御助言を頂きました東京大学 分子細胞生物学研究所 渡邊嘉典 教授、京都大学大学院 医学研究科 寺井健太 特任准教授に深く感謝申し上げます。

本研究において、マウス卵母細胞の実験手技を御指導いただきました東京大学 分子細胞生物学研究所 金智慧 助教、バイオインフォマティクス解析手法を御指導いただきました東京大学 分子細胞生物学研究所 増田晃士 研究員に厚く御礼を申し上げます。また、終始活発な議論を交わして下さいました東京大学 分子細胞生物学研究所 病態発生制御研究分野の皆様に深く感謝致します。

最後に、温かい励ましで応援して下さいました祖父母、父、母、兄、妹、義父、義母、そして妻 加奈子と娘 陽咲に深く感謝致します。

平成 28 年 7 月 22 日

東京大学大学院 農学生命科学研究科

応用生命工学専攻 博士 4 年

羽田 政司