



Regulation of chromosome morphology by histone modifications in pig oocytes

Bui, Hong Thuy

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2005-03-25

(Date of Publication)

2020-07-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3281

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003281>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 192 】

氏 名・(本 籍) Bui Hong Thuy (ヱトナム)
博士の専攻分野の名称 博士(学術)
学 位 記 番 号 博い第528号
学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当
学位授与の 日 付 平成17年3月25日

【 学位論文題目 】

Regulation of Chromosome Morphology by Histone
Modifications in Pig Oocytes
(ブタ卵母細胞におけるヒストン蛋白質の修飾による染色体
の形態の制御に関する研究)

審 査 委 員

主 査 教 授 宮野 隆
教 授 三宅 正史
教 授 深見 泰夫
教 授 吉川 潮

Summary

In mammalian fetal ovaries, oogonia enter the meiotic cell cycle to become primary oocytes, and then they are arrested at the diplotene stage of the first meiotic prophase. During this arrest, some of the oocytes start to grow. Fully-grown oocytes resume meiosis under the stimulation of gonadotropic hormones, and mature to metaphase II. During this oocyte maturation, chromosomes start to condense, and Cdc2 kinase and MAP kinase become active. The chromosome condensation is the first step of the oocyte maturation and has been thought to be induced by Cdc2 kinase. However, the cause of the chromosome condensation has not been understood completely. Morphological change in chromosomes in somatic cells has been implicated by histone modification. Histone N-terminal tails provide sites for a variety of post-translational modifications including acetylation, phosphorylation and methylation.

The main objective of this research was to investigate the regulation of chromosome morphology by histone modification in pig oocytes during the growth, maturation and activation. In addition, the study was carried out to determine the involvement of histone H3 modifications in the change in chromosome morphology of the somatic nuclei transferred into *in vitro*-matured pig oocytes. Finally, the possible involvements of histone modifications induced by some inhibitors that had been shown to affect on chromosome morphology were investigated.

In Chapter 2, the correlation between chromosome condensation and histone H3 phosphorylation at serine 10 (H3-S10) during maturation of pig oocytes was examined. The phosphorylation of histone H3-S10 was first detected in the clump of condensed chromosomes at the diakinesis stage, and thereafter it was maintained until metaphase II. The kinase assay showed that histone H3 kinase activity was low in oocytes at the germinal vesicle stage and increased markedly at the diakinesis stage, and that the high activity was maintained until metaphase II. To elucidate the involvement of Cdc2 kinase, MAP kinase, and histone H3 kinase on the chromosome condensation and histone H3 phosphorylation, the effects of protein phosphatase 1/2A (PP1/PP2A) inhibitors on the chromosome condensation, phosphorylation of histone H3-S10, and activities of histone H3, Cdc2 and MAP kinases were investigated. The results showed that inhibitors of PP1/PP2A induced rapid chromosome condensation associated with histone H3-S10 phosphorylation after 2 h of treatment. Both histone H3 kinase and MAP kinase were activated in the treated oocytes, although Cdc2 kinase was not activated. In oocytes treated with a PP1/PP2A inhibitor (calyculin A) and a MEK inhibitor (U0126), neither Cdc2 kinase nor MAP kinase were activated, although histone H3 kinase was still activated and the chromosomes condensed with histone H3-S10 phosphorylation. The inhibitor experiments made clear that the chromosome condensation correlated with histone H3 kinase activity, but not with Cdc2 kinase and MAP kinase activities. These results demonstrate the phosphorylation of histone H3-S10 occurs in condensed chromosomes during maturation.

In Chapter 3, correlation between the morphological change of chromatin/chromosome and histone H3 modifications were investigated throughout oocyte growth, maturation and activation.

The results indicated that the modulation of chromatin configurations from decondensed state to peri-nucleolar heterochromatin sheath during oocyte growth involved the change in the levels of histone H3 acetylation at lysine 9 (H3-K9), H3-K14 and H3-K18. The phosphorylation of histone H3-S10 and H3-S28 was not involved in the change in the chromatin morphology in growing oocytes. The data also showed that the complete acquisition of histone H3 methylation corresponded to the formation of heterochromatin in fully-growth oocytes. Early maturation, phosphorylation of H3-S28 was detected in condensing chromosomes in the oocytes at GV II-IV stage after 9 h of maturation culture, and then histone H3-S10 was phosphorylated. During the maturation, all the histone H3 acetylation levels decreased dramatically, however, methylation of histone H3-K9 was maintained. After electro-activation, acetylation of H3-K14, H3-K9 and H3-K18 reappeared at anaphase II, telophase II and the pronucleus stage, respectively. The reappearance of acetylated H3-K9 was concomitant with the drop of phosphorylation levels of H3-S10 and H3-S28 at this stage. Chromosomes were completely decondensed and H3-S10 was completely dephosphorylated at the time of pronucleus formation. The methylation of H3-K9 was maintained during maturation and after activation until pronucleus stage in the oocytes. These findings suggest that chromatin/chromosome morphologies of pig oocytes are regulated by acetylation/deacetylation and phosphorylation/dephosphorylation of histone H3. It was also shown that the oocytes in secondary follicles lacked histone H3-K9 methylation and the methylation was established correlative with oocyte growth. Although histone acetylation and phosphorylation were reversible, the stable methylation of H3-K9 was maintained throughout the oocyte maturation and activation. Furthermore, it is suggested that the ordered phosphorylation of histone H3 at S10 and S28 is thought to be influenced by other modification, acetylation of neighboring lysines in the histone H3 molecule.

In Chapter 4, nuclei of somatic cells were transferred into *in vitro*-matured pig oocytes, and their histone H3 modifications were investigated in relation to the change in the chromosome morphology. A series of phenomena were observed in the somatic nuclei during first 2 h after nuclear transfer; chromosome condensation to form metaphase-like configuration, nuclear membrane disassembly, decrease in histone H3 acetylation levels, and increase in histone H3 phosphorylation levels. These results showed that nuclear remodeling including histone H3 modifications of injected somatic nuclei took place in the oocytes under the regulation of oocyte cell cycle. In the next experiment, oocytes injected with nuclei of somatic cells were electro-activated, and chromosome morphology of oocytes and somatic cells was examined in correlation with their histone modifications in the same ooplasm. In most of the case, chromosomes of somatic cells showed similar morphological change to those of oocytes. They also showed similar change in histone H3 phosphorylation and acetylation as oocytes. These results suggest that histone H3 phosphorylation and acetylation, but not methylation, of transferred somatic nuclei are controlled by oocyte cytoplasm.

In Chapter 5, it was examined whether meiosis-specific deacetylation and phosphorylation of histone H3 were affected by three different chemical inhibitors that had known to regulate

(氏名 : Bui, Hong Thuy No. 3)

meiotic maturation of oocytes. The inhibitors were a histone deacetylase (HDAC) inhibitor trichostatin A, a protein synthesis inhibitor cycloheximide, and a tyrosine phosphatase inhibitor vanadate. The results showed that HDAC inhibition induced maturation arrest, protein synthesis inhibition maintained histone H3 acetylation, and tyrosine phosphatase inhibition caused heterochromatin decondensation and maintenance of histone H3 acetylation. The data indicated that all the three different inhibitors prevented the meiotic resumption of pig oocytes. Although the induced chromatin configurations were different among treatments, acetylation of histone H3-K14 and dephosphorylation of H3-S10 were maintained.

The correlation of juxtapositional histone H3 modifications of oocytes can be summarized in a model as follows: During their growth phase, histone H3-K9 become methylated for establishment of the maternal gene imprinting and histone H3-K9, H3-K14 and H3-K18 are acetylated for the transcriptional activity. When the fully-grown oocytes are stimulated by gonadotropins and start their maturation, histone H3-S28 and then H3-S10 become phosphorylated for the meiotic chromosome condensation. The phosphorylation of H3-S10 is accompanied by the deacetylation of H3 at K9, K14 and K18. In oocytes at metaphase I and II, histone H3 at S10 and S28 are phosphorylated and K9, K14 and K18 are deacetylated completely. After activation of matured oocytes, H3-S10 and then H3-S28 become dephosphorylated for decondensation of chromosomes and H3-K9, H3-K14 and H3-K18 are reacetylated for preparing the zygotic transcription. Although histone acetylation and phosphorylation are reversible, the stable methylation of H3-K9 is maintained throughout the oocyte maturation and activation.

The oocyte growth, maturation, and activation are complex processes, which include transcription, meiotic arrest with condensed heterochromatin, chromosome condensation and decondensation, two consecutive meiotic divisions, and genomic imprinting, for producing the female gamete, egg. The work described in this dissertation suggests that oocytes have unique ability to manage these complex processes through the histone, at least core histone H3 modifications in chromatin. The phosphorylation of histone H3 is the first sign of oocyte maturation, and the balance of histone H3 kinase and PP1/PP2A activities regulates the phosphorylation leading to the chromosome condensation. The acetylation of histone H3 during oocyte growth and reacetylation after oocyte activation perhaps concern the transcriptional activities. The deacetylation during oocyte maturation and after somatic nuclear transfer may concern in erasing some memories in oocyte growth and differentiated state, respectively, to create the undifferentiated or totipotent embryos. Since the sites for the modifications are within the short histone tail, the juxtaposition of the modification sites is thought to provide cross-regulations of different modifications. When histone deacetylases are inhibited, histone H3 is not phosphorylated and the meiotic resumption is arrested. In contrast to the phosphorylation and acetylation, the energetic stability of histone H3 methylation through the maturation and activation perhaps contributes to the oocyte maternal epigenetic memory.

氏名	Bui, Hong Thuy		
論文 題目	Regulation of chromosome morphology by histone modifications in pig oocytes (ブタ卵母細胞におけるヒストン蛋白質の修飾による染色体の形態の制御に関する研究)		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	宮 野 隆
	副 査	教 授	三 宅 正 史
	副 査	教 授	深 見 泰 夫
	副 査	教 授	吉 川 潮
	副 査		印
要 旨			
哺乳類の卵母細胞は、第一減数分裂前期で休止した状態で体積を増加させ、発育する。発育を完了した卵母細胞は、性腺刺激ホルモンの刺激を受けて減数分裂を再開し、第二減数分裂中期へと成熟する。発育の完了に近づくにつれて卵母細胞の核内のクロマチンは形態を変化させる。成熟過程では凝縮した染色体が形成され、その後の活性化過程で染色体は脱凝縮する。本研究では、クロマチン/染色体を構成するコアヒストン蛋白質のひとつであるヒストン H3 の修飾に着目し、ブタ卵母細胞を用いて、その発育、成熟、活性化の過程において起こるヒストン蛋白質の修飾とクロマチン/染色体の形態変化を詳細に検討し、両者の関連性を明らかにすることを目的としている。 第1章では、哺乳類卵母細胞の発育、成熟過程で起こるクロマチン/染色体の形態変化に関するこれまでの研究を紹介するとともに、体細胞核のヒストン蛋白質がリン酸化、アセチル化およびメチル化修飾を受けること、また、それらの修飾と染色体の形態や機能との関連性に関する最近の研究を紹介し、本論文における研究の目的を述べている。 第2章では、ブタ卵母細胞の成熟の間に起こる染色体の凝縮過程で、ヒストン H3 のセリン残基 (S10) のリン酸化が起こることを明らかにしている。体細胞ではヒストン H3 (S10) は Cdc2 キナーゼによってリン酸化されると考えられているが、ブタ卵母細胞の成熟過程では Cdc2 キナーゼや MAP キナーゼの活性化に先立って染色体の凝縮が起こり、また S10 のリン酸化が起こった。卵母細胞をホスファターゼ 1/2A 阻害剤のオカダ酸あるいはカリキュリン A で処理すると、急速な染色体の凝縮が起こり、ヒストン H3 リン酸化活性の上昇を伴うヒストン H3 (S10) のリン酸化が起こった。この変化の過程では Cdc2 キナーゼと MAP キナーゼの活性化が起こらないことを認めており、卵母細胞の成熟階で起こる染色体の凝縮にはヒストン H3 キナーゼ活性を介したヒストン H3 のリン酸化が関与することを示唆している。 第3章では、第2章の研究を卵母細胞の発育、活性化の過程へと発展させ、さらにヒストン H3 のセリン残基のリン酸化 (S10, S28)に加えて、リジン残基のアセチル化 (K9, K14, K18)とメチル化 (K9)について、卵母細胞の発育・成熟・活性化の全過程を通して総合的に調べることによって、ヒストン H3 の修飾とクロマチン/染色体の形態との関連性を明らかにしようとしている。卵母細胞の発育過程では、ヒストン蛋白質は強くアセチル化されていた。二次卵胞中の発育途上の卵母細胞のヒストン H3 (K9)はメチル化されていないが、卵母細胞の発育が進むとヒストン H3 (K9)がメチル化され始めた。発育完了後に卵母細胞が成熟を開始すると、ヒストン H3 キナーゼ活性の上昇に伴って S28 のリン酸化、次いで S10 のリン酸化が起こり、これと同時にリジン残基 (K9, K14, K18)が脱アセチル化された。成熟した卵母細胞を電気刺激によって活性化すると、S10 次いで S28 は脱リン酸化され、一方、K9, K14, K18 は再びアセチル化された。また、卵母細胞の発育過程で生じた K9 のメチル化は、卵母細胞の成熟、活性化の過程を通して維持され続けること明らかにしている。 第4章では、成熟した第二減数分裂中期のブタ卵母細胞にブタ体細胞核を顕微注入(核移植)し、			

氏名	Bui, Hong Thuy
----	----------------

その後卵母細胞を電気刺激によって活性化し、卵母細胞内で起こる体細胞核の変化とヒストン蛋白質の修飾変化を卵母細胞の核における変化と同時に比較検討している。体細胞核を顕微注入した後も卵母細胞は第二減数分裂中期のままであったが、間期の体細胞の核膜は崩壊し、染色体は凝縮した。注入直後の体細胞核のヒストン H3 の S10 と S28 は脱リン酸化した状態で、K9, K14, K18 はアセチル化していたが、顕微注入2時間後にはS10とS28はともにリン酸化され、K9, K14, K18は脱アセチル化され、卵母細胞の核と同様なヒストン蛋白質の修飾状態となった。体細胞核を注入された卵母細胞を電気刺激によって活性化したところ、体細胞核は卵母細胞の核の変化を追うように分裂後期・終期様の形態へと変化した。この間、体細胞核のヒストン蛋白質は、卵母細胞と同様な脱リン酸化と再アセチル化を起こした。これに対し、体細胞核の K9 のメチル化状態は、卵母細胞への顕微注入後、その後の活性化後も変化しなかった。これらの結果は、卵母細胞に顕微注入された体細胞核のヒストン蛋白質は、卵母細胞と同様なリン酸化・脱リン酸化、脱アセチル化・アセチル化を起こし、同時に卵母細胞に類似した染色体の形態へと変化することを示している。

第5章では、これまで卵母細胞の減数分裂の再開を抑制することが知られている3種の阻害剤によって引き起こされるクロマチン/染色体の形態の変化におけるヒストン蛋白質のリン酸化およびアセチル化の関与を検討している。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤のトリコスタチン A と蛋白質合成阻害剤のシクロヘキシミド処理では、卵母細胞の減数分裂の再開が抑制され、ヒストン H3 (K14) の脱アセチル化と S10 のリン酸化が起こらないこと、またチロシンホスファターゼ阻害剤のパナジン酸処理ではこれらの作用に加えて、ヘテロクロマチンの脱凝縮が誘起されることを認めている。

以上のように、本論文はブタ卵母細胞の発育、成熟、活性化の過程でヒストン H3 のアセチル化およびリン酸化の状態が変化し、これがクロマチンや染色体の形態変化と密接に関連していること、卵母細胞に顕微注入された体細胞核の染色体は卵母細胞の核におけると同様なヒストン蛋白質の修飾を受け、染色体の形態を変化させることを明らかにしている。さらに、卵母細胞の発育の過程でヒストン H3 のメチル化が起こり、これがその後の成熟、活性化の過程を通して維持されることから、このメチル化がゲノムインプリンティングに関連していることを示唆している。卵母細胞の染色体凝縮・脱凝縮にヒストン蛋白質のリン酸化・脱リン酸化が関与することを示した初めての報告であり、また、体細胞核移植クローン胚の作出に関しても有用な基礎的な知見を提供している。

本研究は、哺乳類卵母細胞の発育・成熟・活性化過程におけるクロマチンや染色体の形態の変化とヒストン蛋白質の修飾変化との関連性を総合的に研究したものであり、哺乳類の卵形成過程におけるヒストン蛋白質の変化について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、学位申請者の Bui, Hong Thuy は、博士（学術）の学位を得る資格があると認める。