

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592109

研究課題名（和文）

哺乳類初期発生におけるリンカーヒストンとクロマチンのエピジェネティクス機構の解明

研究課題名（英文） The function of linker histones and the epigenetics of chromatin regulation in mammalian early development.

研究代表者

田中 守 (TANAKA MAMORU)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20207145

研究成果の概要（和文）:

卵子特異的リンカーヒストン H1foo の欠損はノックアウトマウスの解析から卵子形成過程および生殖能力に影響を与えなかった。これには H1foo の機能を代償するための何らかの機構が存在すると考えられた。

研究成果の概要（英文）:

H1foo KO mice revealed that H1foo has no effect of oogenesis and fertility. This may result from the existence of compensatory mechanism for H1foo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：リンカーヒストン、クロマチン、卵子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 卵子特異的リンカーヒストン H1foo は、研究者が世界に先駆けて発見したマウス卵子に存在する唯一のリンカーヒストンである。H1foo の発現は GV 期卵子より開始し、受精後徐々にその発現は低下し、4 細胞期まで確認されている。受精後には卵子内に侵入した精子由来のクロマチンに速やかに集積する。リンカーヒストンは DNA の高次構造の形成に関与し、エピジェネティックに遺伝子発現を調節する働きがある。卵子特異的リンカ

ーヒストンは卵子形成および初期胚発生の過程におけるエピジェネシスにおいて重要な役割を果たす可能性が考えられた。

(2) 体細胞核移植において卵子内に移植された体細胞由来のクロマチンに速やかに H1foo が集積することを確認した。体細胞に強制発現させた H1foo - GFP 融合蛋白の挙動を FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) 法により体細胞型のリンカーヒストンと比較したところ、体細胞型リンカーヒストンに比べ H1foo では退色させた蛍

光の回復が速やかに進むことがわかった。この結果より H1foo は卵子においてより柔軟なクロマチン構造を維持することに關与していることが判明し、このことにより卵子特異的な遺伝子発現を制御していると推測した。

(3) H1foo に対するアンチセンスオリゴを GV 期卵子内にマイクロインジェクションにより注入し、H1foo の発現低下が卵子形成および初期発生に与える影響を調べた。その結果、H1foo のノックダウンにより卵成熟が障害され、M I 期で停止することが判明した。

## 2. 研究の目的

これまでの成果より H1foo は卵子の形成、卵子のエピジェネシスに重要な役割を果たすことが推測される。したがって卵子形成、初期発生における H1foo の必要性を明らかにすることを目的とした研究を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 卵子特異的リンカーヒストン H1foo の機能を探るためにノックアウトマウスを作製する。

(2) ノックアウトマウスにおける卵子形成過程を解析する。

ノックアウトマウスより GV 期卵子を採取し、*in vitro* での卵子成熟を形態的に調査する。

ノックアウトマウス、新生仔期より卵巣を摘出し、組織切片を作成し HE 染色を行い、卵子形成を組織学的に調査する。

(3) ノックアウトマウスにおける妊孕能を解析する。

・ノックアウトマウスからの産仔数を調査する。特に長期飼育マウスにおける産仔数を調査する。

(4) ノックアウトマウス卵子における単為発生能を解析する。

・ノックアウトマウスより MII 期の卵子を採取し、*in vitro* での単為発生能を調査する。

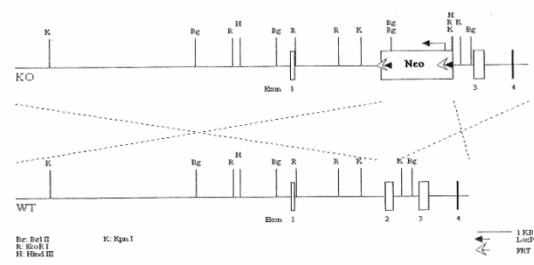
・長期飼育ノックアウトマウスより卵巣を摘出し奇形腫の形成がないか調査する。

(5) ノックアウトマウスと正常型の MII 卵を採取し、遺伝子マイクロアレイをかけることで遺伝子発現の違いを網羅的に解析した。

## 4. 研究成果

(1) 下図の様な H1foo 遺伝子の exon2 を欠

Conventional targeting construct of mouse HOOF gene



損する相同組み換えをデザインした、ターゲティングベクターを作成した。本ベクターを ES 細胞に遺伝子導入し相同組み換えを起こしたクローンを得た。H1foo をノックアウトした ES 細胞を用いてキメラマウスを作製し、生殖系列への導入を確認した。キメラマウスから 4 系統のヘテロ型の H1foo ノックアウトマウスを作製した。

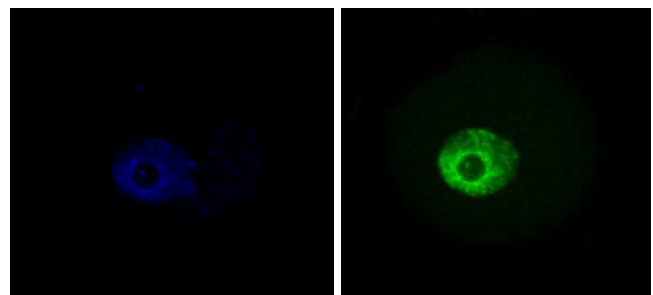
ヘテロ型ノックアウトマウスを BDF1 マウスとバッククロスを行った。

ノックアウトマウスの genotyping によりヘテロおよびホモのノックアウトマウスを確認した。

ノックアウトマウスから採取した卵子に対して免疫染色を行い、蛋白レベルでの欠損も確認した。

(野生型)  
(核染色)

(H1foo)



(2)

ノックアウトマウスより GV 期卵を採取し、*in vitro* での卵子成熟を確認した。卵子成熟に関しては GVBD の有無および第一極体の放出の有無により評価を行った。GVBD 率は野生型、ヘテロ型ノックアウトマウス、ホモ型ノックアウトマウスですべて 100%であった。また第一極体放出率は野生型、ヘテロ型ノックアウトマウス、ホモ型ノックアウトマウスでそれぞれ 95%、96%、92%であった。卵子成熟過程で H1foo の欠損は影響を与えなかった。

新生仔期マウスより卵巣を摘出し卵子形成過程を組織学的に検討した。肉眼的に大きさ、重量において野生型とホモ型ノックアウト

トマウスの間には差は見られなかった。生後5日目の卵巣を摘出し、ホルマリン固定したのちH E染色を行った。

(3) H1foo の欠損が妊孕能に与える影響について検討を行った。特に(2)の結果からホモ型ノックアウトマウスにおいて原始卵胞数が少ない傾向が見られたことからホモ型マウスは長期飼育により早期に妊孕能が障害されるのではないかと推測し、長期飼育マウスにおいて産仔数に著明な減少が見られないか評価を行った。

上記のようにばらつきがあるもののホモ型ノックアウトマウスは長期飼育の後も産仔数が減少することはなかった。H1foo の欠損は妊孕能に影響をあたえなかった。しかし、数匹において繰り返し出産直後に新生仔を食殺してしまうマウスが確認された。その理由については不明であるが、出産される新生仔になんらかの異常が生じている可能性も考えられる。繰り返し食殺をおこなう系統では帝王切開による分娩として胎仔の状態を確認する予定である。H1foo の欠損が次世代の染色体異常などの異常仔の発生をきたしているかもしれない。

(4) H1foo は卵細胞内でDNAに結合し、卵細胞特有のエピジェネシスに関与していると考えられている。卵細胞特有の現象の一つに減数分裂の停止、再開があげられる。この過程に H1foo が関与しているとすればH1foo の欠損により減数分裂の制御が障害されると考えられる。その結果、卵細胞が単為発生により分化増殖するのではないかと推測し、ホモ型ノックアウトマウスで単為発生が増加するか調べた。

野生型およびホモ型ノックアウトマウスからMII期卵を採取し、顆粒膜細胞を除去後24時間でのin vitroでの単為発生率を比較した。野生型とホモ型ノックアウトマウスで単為発生卵は認められなかった。

長期飼育マウスより卵巣を摘出し奇形腫の形成が見られないか調べたが、奇形腫を形成はなかった。その他、組織学的にもwild typeとの違いは確認されなかった。

H1foo の欠損は単為発生に影響を与えなかった。

(5) ノックアウトホモマウスとワイルドタイプマウスの卵子における遺伝子発現の差異を網羅的に検討するため、それぞれのマウスよりMII卵子を採取し、2系統で遺伝子マイクロアレイにかけて、遺伝子群の発現解析を行った。結果、CDK4等のセルサイクルレギュレーターや、mRNA プロセッシングに関連す

る遺伝子群の卵子における発現が大きく変化していることが明らかとなった。

(成果のまとめと考察)

ノックアウトマウスの解析からH1fooの欠損が卵子形成過程や妊孕能にあたえる影響は確認されなかった。しかしながら卵子に多量に存在し、強いDNA結合能をもつ本分子の役割には重要なものがあると考えている。ノックアウトマウスではなんらかの代償機構が働いていると考えられる。近年ではカエルの卵子特異的リンカーヒストンのノックダウンで核移植後のリプログラミングが障害されたことやイモリでは眼の再生過程で本分子が発現し、そのノックダウンにより眼の再生過程が障害されたなどの報告が続いている。こういった報告から卵子特異的リンカーヒストンは未分化な細胞のエピジェネシスに関与していると考えられる。マウスなど哺乳類ではある意味再生能力が衰え、その役割が不明瞭になっているのかもしれない。また、マイクロアレイの解析によりCDK4等のセルサイクルレギュレーターや、mRNA プロセッシングに関連する遺伝子群の卵子における発現が大きく変化していることが明らかとなった。今後はマイクロアレイの結果を基に遺伝子変化が大きかった遺伝子についての発現変化を検討していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Expression of human oocyte-specific linker histone protein and its incorporation into sperm chromatin during fertilization.

Mizusawa Y, Kuji N, Tanaka Y, Tanaka M, Ikeda E, Komatsu S, Kato S, Yoshimura Y. Fertil Steril. 2010 Mar 1;93(4):1134-41.

(査読有)

[学会発表](計1件)

ノックアウトマウスを用いた卵子特異的リンカーヒストンH1F00の卵子形成における機能解析

古谷正敬、田中守、浅井哲、松本直、峰岸一宏、宮越敬、青木大輔、村泰典

第64回日本産科婦人科学会学術講演会  
2012年4月13～15日(神戸)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

田中 守(TANAKA MAMORU)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号:20207145

### (2)研究分担者

宮越 敬(MIYAKOSHI KEI)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号:70265883

### (3)連携研究者

なし