

## 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 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780250

研究課題名（和文）体細胞クローンにおけるゲノムリプログラミングへのヒストン変異体置換の関与

研究課題名（英文） Replacement of core histones in nuclear transfer

研究代表者

秋山 智彦（AKIYAMA TOMOHIKO）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究者番号：20570691

研究成果の概要（和文）：

本研究では、核移植後にドナー核に存在するコアヒストン H3 および H2A 蛋白質およびその変異体が卵細胞質中にあるものと交換される様態を調べ、クロマチンがどのように再構築されるのかを解析した。その結果、核移植後にドナー核内の H3 変異体は、卵細胞由来のものと置換されることが明らかとなった。さらに、H2A 変異体に関しても核移植後の交換が同様に起こり、その中でも H2A.X が積極的に取り込まれていることが明らかとなった。これらの結果より、卵細胞に核移植されたドナー核のヒストンは卵細胞質のヒストンと置換され、ゲノム上の H2A および H3 変異体の分布や組み合わせが変化し、クロマチンの再構築が行われていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The genome of differentiated somatic nuclei is remodeled to a totipotent state when they are transplanted into enucleated oocytes. To clarify the mechanism of this genome remodeling, we analyzed changes in the composition of core histone variants in nuclear-transferred embryos, since recent evidence has revealed that chromatin structure can be remodeled as a result of variant histone replacement. We found that the donor cell-derived histone H3 variants H3.1, H3.2, and H3.3, as well as H2A and H2A.Z, were rapidly eliminated from the chromatin of nuclei transplanted into enucleated oocytes. Accompanying this removal, oocyte-stored histone H3 variants and H2A.X were incorporated into the transplanted nuclei, while the incorporation of H2A and H2A.Z was minimal or not detected. The incorporation of these variant histones was DNA replication-independent. These results suggest that most core histone H2A and H3 components are dynamically exchanged between donor nuclei and recipient cytoplasm, which further suggests that replacement of donor cell histones with oocyte-stored histones may play a key role in genome remodeling in nuclear-transferred embryos.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：発生・分化

## 1. 研究開始当初の背景

体細胞核移植クローン胚作成において、移植された体細胞ゲノムは全能性のある状態に再プログラム化(リプログラミング)されるが、そのメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。また、再プログラム化の際に、ゲノムの高次構造(クロマチン構造)が受精卵型のものに変化することが必要であると考えられているが、その変化に関する知見もほとんど得られていない。

クロマチンの制御には、DNAと密接に結合するヒストン変異体が重要な役割を果たす。哺乳類細胞では、クロマチンの最小単位であるヌクレオソームにヒストン H2A および H3 の変異体を様々な組み合わせで取り込むことによりクロマチン構造を変化させ、遺伝子発現をはじめとする様々な生理機能の調節を行う(表 1)。すなわち、ヌクレオソームを構成するヒストンの種類や組み合わせは、クロマチン構造の多様性を生み出し、哺乳類細胞の個性を決定する大きな要因の一つといえる。したがって、細胞の性質が大きく変化するゲノムリプログラミングの際には、コアヒストンとその変異体の置換がダイナミックに起こると考えられる。

表1. ヒストン変異体の主な機能

	H2A.Z	転写の活性化
H2A	H2A.X	DNA修復
	macroH2A	X染色体の不活化
-----		
H3	H3.1	転写の抑制
	H3.2	転写の抑制
	H3.3	転写の活性化
	CENP-A	セントロメア構成

## 2. 研究の目的

本研究では、核移植後にドナー核に存在するコアヒストンおよびその変異体が卵細胞質中にあるものと交換される様態を調べ、クロマチンがどのように再構築されるのかを解析した。

## 3. 研究の方法

ドナー細胞として胚性幹細胞(ES)細胞を用い、マウスの未受精卵に核移植を行った。核移植後のヒストン置換を調べるには、ドナー核にもともと存在しているヒストンと卵細胞質中にあるヒストンを見分ける必要があるため、FLAG タグを用いてそれぞれのヒストンを識別して以下の実験を行った。

(1) ヒストン変異体を FLAG タグで標識した

ES細胞を卵細胞質中に移植して、FLAG抗体を用いた免疫染色法により、クローン胚中におけるドナー核のヒストン変異体の動態を解析した(図 1)。

(2) 卵細胞質中にあるヒストン変異体を FLAG タグで標識しておき、移植された ES 細胞核に新たに組み込まれるヒストン変異体の動態を免疫染色法により解析した(図 2)。

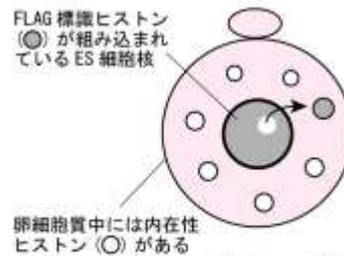


図1. 実験(1)のクローン胚

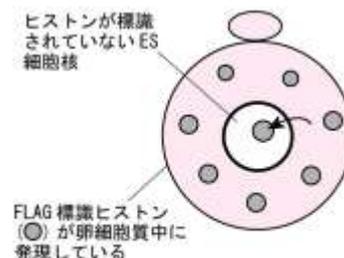
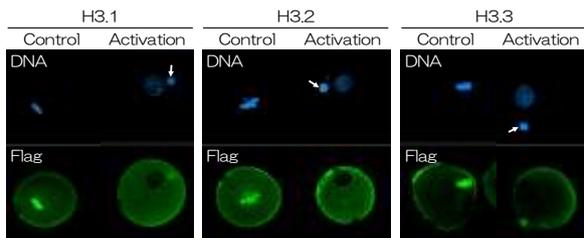


図2. 実験(2)のクローン胚

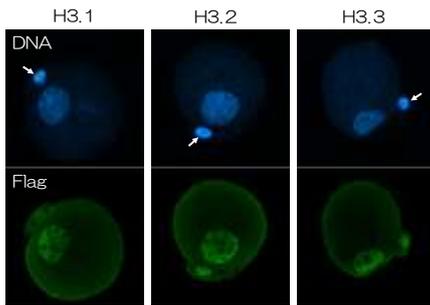
## 4. 研究成果

(1) H3 変異体

H3.1、H3.2、H3.3について調べた結果、ドナー核のヒストンはどれも核移植後、凝集した染色体の状態では維持されていた。しかしながら、活性化刺激により核膜が形成されると、すべての H3 変異体はドナー核から消去されていることがわかった(図 3)。そして代わりに、卵細胞質にある H3 変異体がドナー核に取り込まれていることがわかった(図 4)。このことから、核移植後にドナー核内の H3 変異体は、卵細胞由来のものと置換されることが明らかとなり、ゲノム上の H3 変異体の分布が変化していると考えられる。



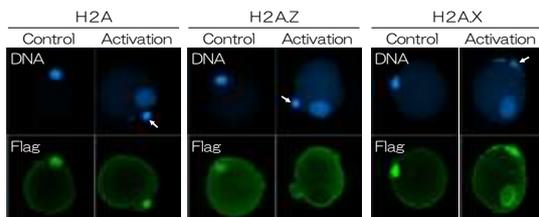
**図 3. ドナー核のヒストン H3 変異体の動態**  
Flag タグヒストン H3.1, H3.2, H3.3 を発現した ES 細胞を除核した卵に移植して  $Sr^{2+}$ により活性化した。活性化前(Control)、活性化後(Activation)。矢印は極体。



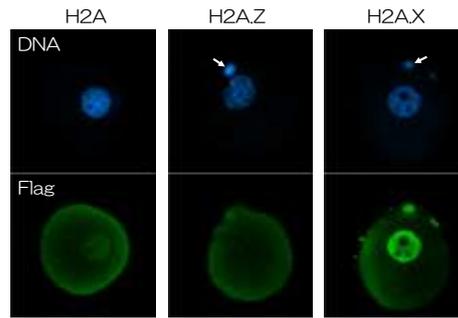
**図 4. 卵細胞質のヒストン H3 変異体の動態**  
Flag タグヒストン H3 mRNA を顕微注入した卵に ES 細胞を移植して  $Sr^{2+}$ により活性化した。矢印は極体。

## (2) H2A 変異体

H2A, H2A.Z, H2A.X について調べた結果 (図 5 及び 6)、H3 変異体と同様にドナー核のヒストンは核移植後の凝集した染色体に維持されていた。活性化後に核膜ができると H2A と H2A.Z はドナー核から消去されていた。さらに、この 2 つヒストンについては卵細胞質からの取り込みもほとんどないことがわかった。一方、H2A.X は活性化後もドナー核に維持されており、しかも、積極的に卵細胞質由来の H2A.X が取り込まれていることが明らかとなった。したがって、移植されたドナー核では H2A.X が占めるクロマチンの割合が大きくなっていることが示された。H2A.X は初期胚に多く存在するヒストンとして知られており、ドナー核が H2A.X を取り込むことにより全能性に関わるクロマチン構造を形成できるのかもしれない。



**図 5. ドナー核のヒストン H2A 変異体の動態**  
Flag タグヒストン H2A, H2A.Z, H2A.X を発現した ES 細胞を除核した卵に移植して  $Sr^{2+}$ により活性化した。活性化前(Control)、活性化後(Activation)。矢印は極体。

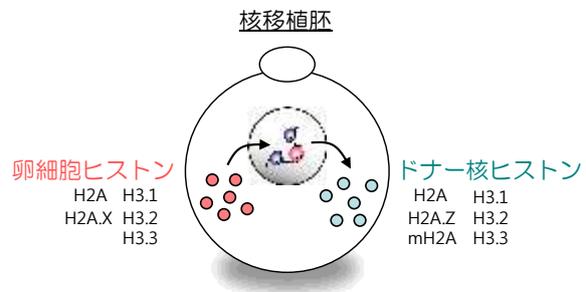


**図 6. 卵細胞質のヒストン H2A 変異体の動態**  
Flag タグヒストン H2A mRNA を顕微注入した卵に ES 細胞を移植して  $Sr^{2+}$ により活性化した。矢印は極体。

## (3) ヒストン置換機構

上記のヒストン置換が起こる時期は DNA 複製期と重なるため DNA 合成阻害剤を用いて、その関連を調べた。その結果、DNA 複製を阻害してもヒストンがドナー核へ取り込まれることが明らかとなった。したがって、核移植後に起こるヒストン置換は DNA 複製非依存的であることが示された。

以上の結果より、卵細胞に核移植されたドナー核のヒストンは卵細胞質のヒストンと DNA 複製非依存的に置換され、ゲノム上の H2A および H3 変異体の分布や組み合わせが変化し、クロマチンの再構築が行われていることが示唆された (図 7)。



**図 7. 核移植胚におけるヒストン置換**  
核移植後にドナー核のヒストンは卵細胞質のヒストンと置換される。

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

秋山智彦・那順布和・青木不学

核移植胚におけるコアヒストン置換によるクロマチンの再構築、第 52 回日本哺乳動物卵子学会、栃木県大田原市、2011 年 5 月 21-22 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋山 智彦 (AKIYAMA TOMOHIKO)  
東京大学・大学院新領域創成研究科・特任  
研究員  
研究者番号：20570691

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：