

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462580

研究課題名(和文) 卵子特異的リンカーヒストンによるクロマチンリモデリングと遺伝子初期化誘導

研究課題名(英文) Chromatin remodeling and reprogramming with oocyte specific linker histone,

研究代表者

田中 守 (Tanaka, Mamoru)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：20207145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、クロマチン構造を変化させる初期化因子の一つと考えられる卵子特異的リンカーヒストンH1fooに注目して、その機能を明らかにすることにより、哺乳類卵子におけるクロマチンのエピゲノム構造の解明をはかった。卵子幹細胞と思われる細胞系には卵子特異的リンカーヒストンの発現を検討したもののその発現は認められなかった。さらに卵子への分化におけるヌクレオソーム構造の変化についての役割を検討した。卵子特異的リンカーヒストンは、卵子への分化に重要な役割を有している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oocyte-specific linker histone H1foo is expressed in oocyte and early stage embryos. H1foo is essential for in vitro meiotic maturation of oocyte. The greater mobility of H1foo, compared with H1, may contribute to this rapid replacement and the instability of chromatin structure. These findings suggest that the rapid replacement of H1 with H1foo may play an important role in nuclear remodeling.

研究分野：産婦人科

キーワード：リンカーヒストン 卵子

1. 研究開始当初の背景

我々はマウスを用い卵巣特異的cDNAライブラリーを作成し、哺乳類で未発見であった卵子特異的リンカーヒストンH1ooを発見した(Tanaka et.al. Development, 2001)。さらにそのヒトホモログのクローニングにも成功し(Tanaka et.al. BBRC, 2003)、現在、哺乳類における卵子特異的リンカーヒストンの研究では、世界をリードしている。さらに研究代表者らは、マウスのクローン作成における遺伝子reprogramming機構を検討するため、体細胞核移植時の卵子特異的リンカーヒストンの動態についても検討を行い、H1fooが体細胞核に速やかに取り込まれることを明らかにした(Teranishi et.al. Dev Biol 2004)。また、マウスにおけるH1fooの発現が卵子の成長と一致していることを示した(Tanaka et.al. Biol Reprod 2005)。さらに研究代表者のグループはmorpholino antisense H1foo oligoのマイクロインジェクションによる機能阻害実験では、H1foo蛋白を消失させると卵子の成熟効率が低下し、Metaphase Iで停止することが明らかになった(Furuya et.al. J Reprod Dev 2007)。近年の再生医学の進歩によって胚性幹細胞(ES細胞)から精子および卵子を分化させることが可能となった。この技術の応用が進めば将来生殖細胞研究が飛躍的に進歩することが予想される。また、ES細胞を用いた研究においてはES細胞に遺伝子導入することによって、重篤な遺伝子疾患への遺伝子治療の可能性が期待されている。この際問題となっているのが、ヒトES細胞への遺伝子導入効率の低さである。先に述べたように体細胞の有糸分裂では相同組み換えがほとんどおこらないが、本研究によってクロマチン構造の柔軟性が相同組み換えに関与していることが明らかになれば、ヒトES細胞への遺伝子導入および相同組み換えの効率を改善することが可能となるかもしれない。200

7年に京都大学の山中らの研究グループにより繊維芽細胞に遺伝子改変および導入を行うことでinduced pluripotent stem (iPS) cellが作成された(Nature 2007)。しかしながら、iPS細胞では、多分化能を有するものの腫瘍形成の可能性が指摘されており、理想的な万能細胞作成への道は未だ遠いものと考えられている。万能細胞の作成のためには、体細胞核移植の成功例を見る限り、同一の染色体DNA構造を変化させるエピジェネティックな制御機構が筆数であると考えられている。そのエピジェネティックな制御機構で注目されているのがDNAのメチル化とDNA結合蛋白であるヒストン蛋白である。リンカーヒストンはリンカーDNAに結合し、染色体の形態、遺伝子の転写を広く制御していることが最近になって報告され始め、リンカーヒストンによる遺伝子転写制御機構が注目を集めている。さらに2008年東京大学の塩田らの研究グループによりH1fooの組織および発達段階における遺伝子発現が、メチル化による厳格な制御を受けていることが明らかとなり、初期発生において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

2. 研究の目的

核蛋白の大部分を占めるヒストン蛋白ファミリーは、8量体を形成して146bpのDNAを周りに巻き付けているコアヒストンと、コアヒストン間のDNAに結合しているリンカーヒストンに大別される。興味深いことに、生殖細胞には性腺特異的なリンカーヒストンが存在している。マウスにおいては精巣特異的なH1tと卵子特異的H1fooが知られている。殊に、H1fooは我々が2000年に哺乳類において始めて発見した卵子特異的リンカーヒストンである(1)。これら生殖細胞に特異的なリンカーヒストンが存在していることは、それらが生殖細胞固有の機能に関与していることが予想される。本研究では、

マウス卵子特異的なリンカーヒストンである H1foo に着目し、H1foo 強発現細胞およびトランスジェニックマウスの表現形解析を行うことで、そのエピジェネティックな制御機構を明らかにし、卵子成熟過程及び体細胞クローニング作成の際の体細胞核の初期化機構の一端を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

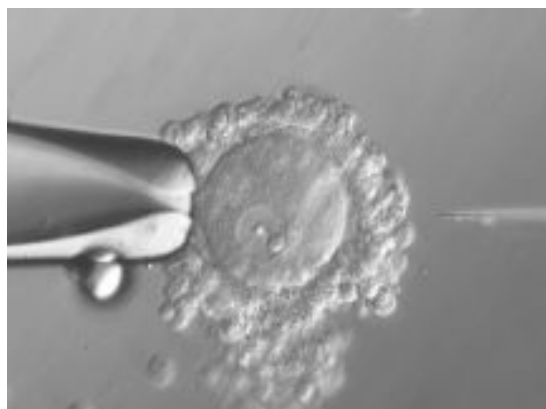
H1foo は、生理的状态では 2 細胞期以降に極体を除き完全に発現が消失する。そこで、H1foo の機能解明を計るため、本来は消失するはずである H1foo を初期胚発生の各時期において強制発現させることで、その後の発生に与える影響を検討する。また、培養細胞系において、恒常的に強制発現された H1foo は、細胞毒性を有し、stable transfectant の作成が困難であるといわれている。そこで、種々の培養条件での H1foo の細胞毒性についての検討を行うため薬剤誘導性の H1foo-GFP の強制発現を行った細胞系を作成し、その作用について検討する。

初期胚発生段階における H1foo 強制発現の影響

H1foo は、生理的状态では 2 細胞期以降に極体を除き完全に発現が消失する。その調節機構は、ポリ A テールの短縮によって起こるとされ、厳格にコントロールされているものと考えられている。

そこで、H1foo の機能解明を計るため、本来は消失するはずである H1foo を初期胚発生の各時期において強制発現させることで、その後の発生に与える影響を検討する。具体的には、poly A を付加させた EGFP-H1foo ベクターを作成し、未受精卵、受精卵にマイクロインジェクションを行い、初期発生段階での H1foo 発現を観察する。特に初年度におい

ては、使用するベクターや注入量、注入のタイミングによって一定の発生段階において H1foo の発現時期及び発現量を調節できる系の完成を目標とする。さらに体細胞型のリンカーヒストンの KO マウスを入手し、体細胞型リンカーヒストンの一部の機能が欠損した状態での未受精卵、受精卵を作成し、体細胞



型リンカーヒストンの一部機能欠損状態での卵子特異的リンカーヒストン H1foo の強制発現効果についてその初期発生に与える影響について検討を行う。

培養細胞系における H1foo 発現の影響

また、培養細胞系において、恒常的に強制発現された H1foo は、細胞毒性を有し、stable transfectant の作成が困難であるといわれている (スタンフォード大学 Hsueh 教授との Personal communication)。そこで、種々の培養条件での H1foo の細胞毒性についての検討を行うため薬剤誘導性の H1foo-GFP の強制発現を行った細胞系を作成する。具体的には、線維芽細胞、絨毛細胞等の培養細胞系において誘導性カセットを有した H1foo 強発現ベクターを導入し、stable transfectant を作成する。安定した細胞系が得られた段階で、例えば無血清培地や低酸素・高酸素下等のストレスがかかった段階での H1foo 蛋白発現の効果をアポトーシス発生や細胞数の増減を検討することで測定する。さらに細胞生存に対する効果が明らかになった段階でそ

の作用機序について、種々の細胞周期マーカーや細胞周期関連遺伝子との関係について検討を行う。準備段階の別系統の実験では、H1foo が PCNA や GADD 等の細胞周期関連蛋白と関連することが分かっており、その具体的な蛋白-蛋白相互関係について検討を行う事となる。

4. 研究成果

卵子特異的のリンカーヒストンの機能解析を進め、初年度は、生殖細胞への遺伝子導入を行う際の細胞株の育成を行った。当初の予定であった、卵子への H1foo 遺伝子の導入は、導入効率や遺伝子のタンパク質への翻訳のタイムラグ等の問題から、効率が低かったことから、寄り未熟な卵子に導入する必要性が生じた。そこで卵子幹細胞を特異的な表面抗原をもちいて単離して H1foo 遺伝子を導入することとした。卵子幹細胞は表面抗原プロテオームスクリーニングを行い、卵巣に存在する細胞種の中から卵子幹細胞特異的な表面抗原マーカーを抽出し細胞の同定を行った。

次年度は作成した細胞腫に H1foo 遺伝子の導入を図った。卵子幹細胞系において CAG 夫プロモーターをもちいた遺伝子発現系では、期待された蛋白の発現が得られなかった。同時に H1foo 蛋白のヌクレオソーム構造への影響を検討するため、体細胞由来 iPS 細胞の作成を開始した。

CiRA から提供されているフィーダーフリーの iPS 細胞作成のプロトコールに従い、臍帯血由来単球細胞を準備した。

今年度の成果としては、条件設定に苦慮したが、今後、iPS 細胞が樹立された際には、キメラマウスの生殖細胞への誘導や、卵子への分化など視野に入れた検討を重ねていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

田中 守、Chromatin remodeling during fertilization. International Congress on Embryo Implantation and Pregnancy. 2015 年 3 月 9 日、ニューデリー(インド)

〔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〕

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・教授
研究者番号:20207145

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし