

|                  |                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | Rapid replacement of somatic linker histones with the oocyte-specific linker histone H1foo in nuclear transfer.                                                                                                   |
| Sub Title        | マウス核移植において体細胞型リンカーヒストンは卵子特異的リンカーヒストンH1fooに速やかに置換される                                                                                                                                                               |
| Author           | 寺西, 貴英                                                                                                                                                                                                            |
| Publisher        | 慶應医学会                                                                                                                                                                                                             |
| Publication year | 2004                                                                                                                                                                                                              |
| Jtitle           | 慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.2 (2004. 6) ,p.25-                                                                                                                                         |
| JaLC DOI         |                                                                                                                                                                                                                   |
| Abstract         |                                                                                                                                                                                                                   |
| Notes            | 号外                                                                                                                                                                                                                |
| Genre            | Journal Article                                                                                                                                                                                                   |
| URL              | <a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040602-0025">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040602-0025</a> |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# Rapid replacement of somatic linker histones with the oocyte-specific linker histone H1foo in nuclear transfer.

(マウス核移植において体細胞型リンカーヒストンは  
卵子特異的リンカーヒストンH1fooに速やかに置換される)

寺 西 貴 英

## 内容の要旨

卵子特異的リンカーヒストンは、両生類を用いた研究から、初期発生および核移植に重要な役割を果たしていることが示唆されている。我々は、カエル卵子特異的リンカーヒストンB4と高い相同性を持つマウス卵子特異的リンカーヒストンを発見し、H1fooと命名した。本実験においては、H1fooのリプログラミングへの関与を明らかにするために、マウス体細胞核移植過程においてドナー細胞のリンカーヒストンが体細胞型のものからH1fooへと置換されるかどうかを検討した。さらに、FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) 法を用いてH1fooと体細胞型リンカーヒストンであるH1cとのクロマチン結合力の差を*in vivo*で比較することで、体細胞型から卵子型へのリンカーヒストンの置換がリプログラミングへ及ぼす影響について考察した。

核移植されたドナー体細胞核へのH1fooの取り込みを検討するため、抗H1foo抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、H1fooは核移植後10分以内という短時間で核に取り込まれた後、正常受精卵と相同の発現パターンを示した。一方、体細胞型リンカーヒストンであるH1cにGFPを融合し発現させた細胞をドナー細胞として核移植を行った結果、ドナー細胞核のGFPは核移植後30分では大部分が消失した。これらの結果から、ドナー核のリンカーヒストンは体細胞型から卵子型へと速やかに置換されることが明らかとなった。H1fooとH1cとの差異を分子レベルで検討するため、再構成クロマチンをマイクロコッカールヌクレアーゼ処理し、ヌクレオソーム安定化作用を*in vitro*で比較した。その結果、H1foo、H1c共にヌクレオソーム構造を安定化させてはいるものの、両者に明確な差は無かった。しかし、H1fooまたはH1cとGFPとの融合蛋白を安定発現した細胞を用いてFRAPを行った結果、蛍光の50%回復時間はH1cに比較してH1fooが有意に短く、可動成分においてもH1fooのほうが大きかった。従って、H1fooはH1cに比べて短時間でクロマチンに結合・乖離をくり返している上、強固に結合している成分が少ないと考えられた。

ドナー核の体細胞型リンカーヒストンが卵子型H1fooに速やかに置換され、その後の初期発生におけるH1fooの発現パターンが正常受精卵と同様であることから、ドナー核の遺伝子リプログラミングにおいてH1fooが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。さらに、核移植後のドナー核では卵子型への置換によってクロマチン構造が柔軟になることで、初期胚の発生に必要な遺伝子発現を容易にしている可能性が示された。

## 論文審査の要旨

近年の体細胞核移植研究において、移植したドナー核の遺伝子発現パターンが体細胞のそれから初期胚のパターンへと変化することはリプログラミング (初期化) とよばれている。このような卵子に特徴的な機能には卵子特異的に発現している蛋白が深く関与していることが予想されている。本研究ではマウス体細胞核移植において、卵子特異的に発現するリンカーヒストンH1fooがドナー核に速やかに取り込まれると同時に、ドナー核の体細胞型リンカーヒストンH1cが取り除かれることを示すことで、リンカーヒストンの置換がおこなわれていることを明らかにした。さらに、FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) 法を用いてH1fooとH1cのmobilityを検討した結果、H1fooはH1cに比較して有意に高いmobilityと大きなmobile fractionを有しており、H1fooの高いmobilityが核移植におけるリンカーヒストンの速やかな置換に関与すると共に、H1fooの大きなmobile fractionによりドナー核のクロマチン構造が柔軟になっているとの結論を得た。これらの結果から、H1fooがリプログラミングに関与していることが示唆された。

審査では、核移植後速やかにドナー核にH1fooを認めることについて、どのようなメカニズムが考えられるか質問があった。これに対して、H1fooは核のみならず卵細胞質にすでに過剰に発現していることで、ドナー核に取り込まれる準備がなされていると回答されたが、その科学的根拠が必要であるとの助言があった。また、H1fooの高いmobilityだけでは置換機構を十分に説明できないのではないかと指摘があった。これに対して、この現象を制御する機構は両生類においてよく研究されており、同様の機構がマウスにおいても存在するのかが今後さらなる検討が必要であるとの回答があった。さらに、蛋白の修飾により核への移行が影響されるのではないかと指摘があった。これに対し、H1fooがcdc2によってリン酸化を受けることを提示し、今後H1fooのリン酸化によりmobilityがどのように変化するかを検討予定であるとの回答がなされた。退色後の蛍光が完全に回復しないことの原因を求められた。これに対して、immobile fractionの存在により蛍光が一定の値以上は回復せず、本研究の場合 immobile fractionが大きいことがDNAとの強固な結合を表しているとの回答があった。

以上、本研究にはなお検討すべき点が残るものの、体細胞核移植時の核のリプログラミング機構の解明に向けて、さらなる研究の発展が期待される興味深い現象を明らかにした点で有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 吉村 泰典  
小児科学 高橋 孝雄 医化学 末松 誠  
産婦人科学 野澤 志朗  
学力確認担当者：  
審査委員長：高橋 孝雄

試問日：平成16年2月18日