慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Structure and expression of the human oocyte-specific histone H1 gene elucidated by direct RT-nested PCR of a single oocyte.
Sub Title	単一卵子の直接RT-nested PCR法によって解析されたヒト卵子特異的ヒストンH1遺伝子の構造と発現
Author	田中, 雄大
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.4 (2004. 12) ,p.28-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20041202-0028

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.

Structure and expression of the human oocyte-specific histone H1 gene elucidated by direct RT-nested PCR of a single oocyte.

（単一卵子の直接RT-nested PCR法によって解析された
ヒト卵子特異的ヒストンH1遺伝子の構造と発現）

田　中　　雄　大

内容の要旨

ヒストンは真核細胞の主要な核蛋白であり、コアヒストン（H2A、H2B、H3およびH4）と、リンカーヒストン（H1）の２種類がある。哺乳動物のヒストンでは、H4を除いて複数のサブタイプが存在する。中でもサブタイプが最も多いのがH1ファミリーであり、５種類の体細胞型H1、分化段階特異的H1、精巣特異的H1、そして卵子特異的H1が報告されている。卵子特異的H1は、その発現時期が非受精卵から受精後早期までに限局していることなどから、単にDNAのパッケージングだけではなく、卵子型から胚型への遺伝子発現パターンのリプログラミングにも関わっていると考えられている。卵子特異的H1は、これまでウニ（csH1）、アフリカツメガエル（B4）、ゼブラフィッシュ（H1M）、マウス（H1foo）の４種で同定されていたが、ヒトではその存在が確認されていなかった。本研究では単一卵子からヒト卵子特異的H1遺伝子の同定を行なった。

当大学医学部倫理委員会承認の上、顕微授精を施行した卵子のうち、受精が成立しなかった非受精卵を患者カップルの文書による同意の上使用した。マウス卵子特異的H1と相同性が高い、DNA配列およびmRNA配列をヒトゲノムデータベースから検索し、この配列をもとに、異なる４箇所のプライマー対を作成した。サルコシル溶液を用いて、非受精卵の細胞膜を破壊し、直接RT-nested PCRを行なった。得られたPCR産物の配列を決定し、contigを作成した結果、1041塩基対のオープンリーディングフレームを含む1067塩基対のcDNAが得られた。検討の結果、この遺伝子は、1）mRNAがヒト卵子のみに発現しており、他の臓器には発現していなかった、2）推定されるアミノ酸配列との相同性は、H1fooが最も高く、ついでB4であった、3）推定されるアミノ酸配列は、H1に特徴的なcentral globular domainをもち、他種の卵子特異的H1との相同性はこの領域が最も高かった。以上のことから、我々はこの遺伝子が卵子特異的H1ファミリーに属すると考え、これをosH1（oocyte-specific H1）と命名した。データベースの解析により、osH1遺伝子は、1）イントロンを有している、2）mRNAがpolyA tailを有している、3）他のH1遺伝子に特徴的に見られるcis-element（H1 box、GC rich-element）が存在していない、4）種間のアミノ酸配列の保存性が、他のH1サブタイプに比べて著しく低い、といった、体細胞型H1とはかなり異なる構造をもっていることが明らかになった。ヒトの体外受精において、精子プロタミンと卵子ヒストンの置換不全が受精障害の一因であるといわれ、今後、本研究で同定したosH1遺伝子の詳細な機能解析は受精のメカニズムの解明につながるものと考えられる。

論文審査の要旨

本研究では、体外受精から得られたヒトの単一非受精卵より、直接RT-nested PCRを行い、1041塩基対のオープンリーディングフレームを新たに同定した。この遺伝子は、多種の卵子特異的ヒストンH1と最も相同性が高く、更にcentral globular domainといわれるH1共通の構造を有していることなどから、ヒト卵子特異的H1と考えられ、これをosH1（oocyte-specific H1）と命名した。データベースの解析により、osH1遺伝子は、体細胞型H1とはかなり異なる構造をもっていることが明らかになった。

審査では、まず使用したヒト非受精卵についての質問があった。これについて、顕微受精施行後、48時間以内に前核形成に至らなかった破棄予定卵を非受精卵と定義し、患者カップルの文書による同意を得た上で、実験に使用したと返答された。体細胞型H1と卵子特異的H1の機能的な差異について質問があった。これについて、他種の卵子特異的H1における知見を例に出しながら、一般的にH1の機能はDNAの高度のパッケージングであるが、卵子特異的H1には、それに加えて卵子型から胚型への遺伝子発現パターンのリプログラミングにも関わっていると考えられている、しかしながら詳細な機能解析は今後の検討課題であるとの説明があった。また、データベース解析から、osH1遺伝子の遺伝子座が第３染色体短腕にあるという結果について、ヒトの３番染色体のゲノム配列のデータベースはつい最近まで不十分なところがあり、遺伝子座の決定については、複数のデータベースを併用するなど、慎重をきたす必要があるという指摘があった。更に、osH1のmRNAのスプライシング部位が、NCBI（National Center for Biotechnology Information）が予測していたものと異なることを明らかにしたことについて、推測に使用されたアルゴリズム（GenomeScan）のプログラミング構造についても考察すべきではないかという指摘があった。卵子特異的H1とリンカーDNAの結合が緩徐であることが種間の多様性を許容したのではないかという考察に対して、卵子特異的H1が非常に速やかに精子プロタミンを置換するという事実と矛盾するのではないかという指摘があった。これについて、プロタミンと卵子特異的H1との置換は、それぞれのタンパクの結合能の強さに依存しているのではなく、「プロタミン脱凝集因子」など、様々なファクターが関わっている可能性があることが述べられた。最後に今後の展望についての質問があった。これについて、現在、抗osH1ポリクローナル抗体を作成し、osH1タンパク質の実際の発現を検討中であるとの回答があった。また、破棄予定となった異常卵におけるosH1タンパク質の発現の有無を調べることによって、ヒト不妊の原因の解明につながる可能性を検討中であるとの回答があった。

以上、本研究はいくつかの検討課題は残しているものの、ヒトの卵子特異的ヒストンH1遺伝子の転写産物を同定し、ヒトの受精・発生のメカニズムの一層の解明につながる可能性があるという点で有意義な研究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
　　分子生物学　清水　信義　　小児科学　高橋　孝雄
発生・分化生物学　須田　年生
学力確認担当者：北島　政樹、清水　信義
　　審査委員長：清水　信義

試問日：平成16年 7月 8日