論文の内容の要旨

応用動物科学専攻
平成12年度博士課程進学
氏名　岩森巨樹
指導教官　東條英昭

論文題目

マウス初期胚における細胞周期制御機構に関する研究
-G1期短縮の分子機構-

初期胚は、発生工学、生殖工学において必須の材料であり、この分野の今後の発展を図る上で、初期胚固有の発生制御機構を十分に理解することは重要である。初期胚では胚盤胞に至るまで細胞の分化は起こらず、分裂増殖のみが繰り返されるため、その発生制御機構は細胞周期制御機構と言い換えることができる。卵割期の初期胚における細胞周期に顕著に現れる特徴としてG1期の短縮という現象が報告されている。

初期発生制御に関してはアフリカツメガエルが最もよく研究されており、胞胚期以前の初期胚ではG1期短縮が見られ、これは卵内に蓄えられた母性因子によって転写に依存しない制御がなされているためであることが知られている。一方、マウスの初期胚では転写に依存しない母性因子依存型の制御から転写を必要とする胚性因子依存型の発生への切り替わりが2細胞期に起こり、zygotic gene activation（ZGA）として知られている。しかし、ZGA後の4細胞期以降においてもG1期の短縮が見られ、この時期のG1期短縮を引き起こす分子的なメカニズムは未だ明らかにされていない。

本研究ではマウスの初期胚発生過程における4細胞期以降、すなわち転写依存型の発生におけるG1期短縮のメカニズムを解明することを目的とした。

研究を始めるにあたり、このG1期短縮が分裂期（M期）終了後、DNA合成期（S期）への誘導シグナルが早期に活性化されたために引き起こされるのではないか、との仮説を立て、研究を遂行した。

第1章　初期発生過程におけるMAPキナーゼカスケードについて

MAP キナーゼ（MAPK）カスケードは細胞内シグナル伝達系として最も代表的なものであり、Raf-1、MEK、ERK の3段階のキナーゼにより構成されている。これらのキナーゼはそれぞれ下流因子をリン酸化することで活性化させ、細胞周期の開始を誘導する。もし、このカスケードが M 期終了時あるいは恒常的に活性化している状態であれば、S 期への進行は早期に引き起こされることが推察される。そこで、初期発生過程における各因子の発現とリン酸化の状態をウエスタンブロットで調べた。その結果、全ての因子が初期発生の間常に発現していることが確認され、Raf-1、MEK については2細胞期以前の M 期にリン酸化が見られたが、4細胞期以降の初期胚ではリン酸化はほとんど見られなかった。また、ERK は受精後の初期胚では全くリン酸化が見られず、初期発生では MAPK カスケードが活性化している可能性は低いことが示唆された。次に、MAPK カスケードの活性化の指標となるサイクリン D1 の発現を調べたところ、初期胚では発現は検出されず、このカスケードが活性化しないことが支持された。さらに MEK 阻害剤である PD98059 処理を行い、MAPK 活性化を抑制しても胚の発生率は対照と同様であった。これらの結果から、初期発生過程では MAPK カスケードの活性化が起こらない可能性が強く示唆された。すなわち、MAPK カスケードおよびサイクリン D1 に関しては S 期早期活性化ひいては G1 期短縮の要因ではないことが示唆された。

第2章　初期発生過程におけるRBについて

前章の結果より、G1 期短縮の要因はサイクリン D より下流の S 期誘導機構にあると考えられる。サイクリン D は RB の機能を抑制することが知られている。RB は S 期進行に不可欠な転写因子 E2F と結合して E2F 活性を抑制し、細胞の S 期進行を抑える機能を持っている。そこで、初期発生過程における RB、E2F1 および E2F の主要な標的遺伝子としてサイクリン E の発現を調べた。RT-PCR 法による mRNA の解析では RB は未受精卵で発現しており、その後、受精 24 時間後の 2 細胞期では著しく減少し、36 時間後の2細胞期後期から胚盤胞期までほとんど発現が見られず、胚盤胞期中後期頃から再び増加してくるという動態を示した。さらに、ウエスタンブロットや免疫染色といったタンパク質レベルでの解析からも同様の結果が得られた。また、E2F1 については初期発生の間常に発現が確認され、サイクリン E は2細胞期から発現し始め、桑実胚をピークとして発現が上昇し、その後、徐々に発現が減少するという RB とは完全に逆の相関を示した。以上の結果から ZGA 後、胚盤胞期中期まで RB の発現は極端に減少するということ

が示された。このため E2F が常に活性化された状態が生じ、下流標的遺伝子であるサイクリン E などの S 期進行を担う因子の恒常的な発現により S 期早期活性化が引き起こされ、G1 期が短縮する可能性が示唆された。

第３章　RB 強制発現による初期発生への影響

前章で示された RB 発現の減少が S 期早期活性化の原因であるかどうか検証するため、初期胚に RB の過剰発現を試みた。まず RB 発現胚を選別する方法を検討した。受精 6 時間後の前核に緑色蛍光タンパク質（EGFP）と RB の発現プラスミドを共顕微注入し、EGFP の蛍光を指標として胚を選別して、RB の発現を調べた結果、EGFP 発現胚にのみ RB の発現が検出され、EGFP が RB 発現の指標となることが確認された。そこで、この実験系を用いて RB 発現胚の発生率を求めた。その結果、対照となる EGFP のみを発現させた胚と比べ、４細胞期までは正常に発生したが、その後、桑実胚以降への発生が著しく抑制された。RB は細胞の核内で転写因子を抑制することで機能するため、RB の発現した割球のみで影響が出るはずである。そこで、この結果が確実に RB 発現の影響であることを示す目的で、受精 24 時間後の２細胞期の片側の割球にのみ EGFP と RB を発現させ、通常では桑実胚である受精 72 時間後に胚の様子を観察した。その結果、EGFP の蛍光を示す、RB を発現させた割球が二つのみ、すなわち４細胞期の状態で停止しており、蛍光を示さない側には多数の割球が確認された。以上のことから、RB 発現によって胚の発生が４細胞期で停止することが明確に示された。次に、この４細胞期での発生停止胚が細胞周期のどの位相にあるのか調べるために、RB 発現胚で受精 36 時間後から 48 時間後まで、すなわち４細胞期の S 期に相当する間 BrdU を取り込ませた。その結果、RB を発現させた割球では BrdU の取り込みは見られず、RB 発現により S 期への進行が抑制されていることが示された。以上の結果から、初期胚に RB を発現させるとちょうど内在性 RB の発現が無くなる４細胞期の S 期の前、すなわち G1 期で細胞周期が停止することが示された。このことは RB の発現消失が S 期の早期活性化、さらには G1 期短縮を引き起こしていることを示唆している。

第４章　サイクリン D1 強制発現による RB 発現胚の発生への影響

前章で示された RB の発現による４細胞期の G1 期での停止が体細胞で見られる RB の生理的な機能による G1 期停止と同様であるかどうか検討した。第１章の結果からサイクリン D1 は初期胚ではほとんど発現していないが、体細胞では RB はサイクリン D/ cdk によってリン酸化されることで不活化され細胞が S 期に進行する。そこで、EGFP 、RB に加えて、サイクリン D1 の発現プラスミドを受精 6 時間後の前核に共注入し、RB/ サイクリン D1 共発現胚の発生率を求めた。その結果、RB 発現胚では４細胞期で発生が停止したのに対し、RB/ サイクリン D1 共発現胚は４細胞期以降の桑実胚、胚盤胞にまで、対照胚と同程度に発生した。また、ここ

でも２細胞期の片方の割球に RB/ サイクリン D1 を共発現させたところ、約半数の EGFP 蛍光を示す割球が RB とサイクリン D1 を発現していたが、発生停止は起こさず、外見上桑実胚の形態を示した。次に、RB による細胞周期停止が、下流にあたる E2F 標的遺伝子の発現を抑制するためであることを標的遺伝子の mRNA 発現を RT-PCR 法により調べた。その結果、MCM5、MCM7、DHFR については RB 発現胚で対照胚に比べ、有意にその発現が減少し、RB/ サイクリン D1 共発現胚でその発現が RB 発現胚に比べて有意に回復した。その他の MCM6、cdc6、サイクリン A2、サイクリン E については RB 発現胚ではその発現が減少し、RB/ サイクリン D1 共発現胚では回復する傾向が見られた。以上、４細胞期の G1 期で周期を停止していた RB 発現胚は直接の上流因子であるサイクリン D1 の発現により発生停止が解除されたこと、RB の作用は E2F 標的遺伝子群の発現を抑制していたことから、体細胞で見られる生理的な G1 期停止と同様の機構で停止していることが示唆された。

以上の結果から ZGA 以降のマウス初期胚発生で見られる G1 期の短縮は RB の発現が減少することにより、S 期進行シグナルが恒常的に活性化され、S 期が早期に引き起こされることによるという分子機構が強く示唆された。本研究は哺乳動物の初期胚特異的な発生制御の一端を示した初めてのものである。これらの結果は家畜などの大動物にも応用できると考えられ、これらの分野を利用した産業的な面においても貢献を果たすものと思われる。