

論文内容の要旨

論文題目：Mechanism for reprogramming of gene expression in the oocytes reconstructed by nuclear transfer

(マウス体細胞核移植実験系を用いた遺伝子発現リプログラミング機構の解析)

氏名 金 鎮文

序論

生命は、受精という分化した生殖細胞同士の接合により全能性をもつ受精卵が生じることから始まる。受精卵では生殖細胞特異的な遺伝子発現は停止し、個体発生のための新しい遺伝子発現が開始する。このような全能性の回復は遺伝子発現様式の「リプログラミング」を介して起こるとされているが、その分子機構は現在のところまったく分かっていない。体細胞クローン動物は、除核した未受精卵細胞質中に体細胞核を移植した後、再構築された胚を一定期間の体外培養を経てから子宮内に戻すことによって作成することができる。1997年のクローン羊ドリー誕生の報告以降、数々の研究チームによって体細胞クローン動物作出が報告されてきたことから、適切な細胞質環境下に置くと体細胞の遺伝子発現情報が削除され、受精卵同様の遺伝子発現リプログラミングが起こり全能性を回復することが明らかになった。一方、哺乳類ではゲノム刷り込み現象という片親性遺伝子発現現象が存在するので、リプログラミングの過程でゲノムの親由来を区別する情報は維持されなければならない。したがって、遺伝子発現情報を削除しながらゲノムの親由来に関する情報を維持する機構の存在が示唆される。

受精や体細胞クローンの過程で見られるこのような遺伝子発現のリプログラミングは、DNAの塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現調節、すなわち epigenetic な調節機構によって引き起こされる。中でもヒストン N 末端領域のアセチル化やメチル化修飾の組み合わせが遺

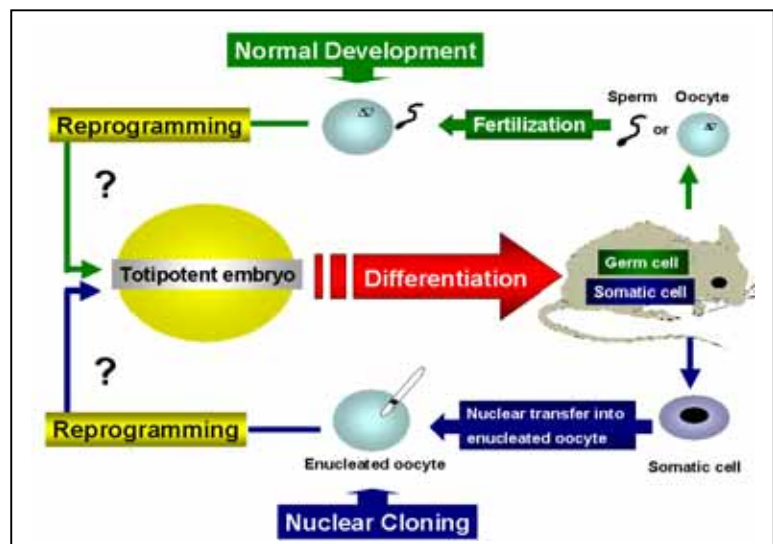


図 1. 受精と体細胞クローニングにおける遺伝子発現のリプログラミング

伝子発現に影響を与えているという「ヒストンコード仮説」に代表されるように、DNA を取り巻くクロマチンの翻訳後修飾が重要な役割を担っていると考えられている。

これまでのリプログラミングに関する研究は、主に発生した個体に生じた異常の解析に頼っており、実際にリプログラミングされる時ゲノムにどのような変化が伴うかについての研究は行われていない。そこで私は、遺伝子発現リプログラミング機構の解明を目的とし、核移植実験系を用いて遺伝子発現リプログラミングの際にクロマチンに起こる epigenetic な変化を解析することにした。

結果と考察

1. リプログラミングに置ける未受精卵細胞質の役割。

現在までの体細胞クローン動物作成の報告から、第二減数分裂中期で cell cycle が停止している未受精卵細胞質環境に暴露させることがリプログラミングに重要であることが示唆されてきた。そこで、リプログラミングに置ける未受精卵細胞質環境の重要性を解析するために、クロマチンリモデリングの指標と考えられている、転写活性、基本転写因子 TATA box binding protein (TBP) の局在、そして DNase I 感受性の変化を、未受精卵細胞質に核移植した場合と人為的な活性化で cell cycle を進行させた卵細胞質へ核移植した場合とで比較した。

まず、未受精卵を除核後に核移植を施してから活性化刺激をあたえる方法を TA プロトコール、除核卵に活性化刺激をあたえてから体細胞核を移植する方法を AT プロトコールと称し両方のプロトコールによって作られた核移植胚の *in vitro* での発生結果を比較してみたところ、AT プロトコールによる核移植胚において顕著な発生遅延が確認された (Table 1)。1 細胞期での転写活性と TBP の局在、DNase I に対する感受性の変化は、未受精卵細胞質を用いた TA 胚でのみ受精卵と同じ挙動を示した。

以上の実験結果から、リプログラミングによる全能性の回復には未受精卵細胞質環境が必須であることがわかった。

2. Cell memory の消去による遺伝子発現情報の初期化。

分化した体細胞核が未受精卵細胞質中でリプログラミングされるためには、まず体細胞特異的な遺伝子発現様式が初期化されなければならないが、初期化の際に分子レベルでゲノムに起こる変化に関する知見はこれまでにまったく得られていない。体細胞分裂期において分化した細胞特有の遺伝子発現様式は、親細胞で発現していた遺伝子の制御領域に様々なマーカーが付けられることによって娘細胞に受け継がれるといわれており、cell memory と呼ばれている。そこで「初期化には cell memory の消去が必要」との仮説を立てて、cell memory マーカーの候補である基本転写因子 TBP の挙動とヒストン H3 lysine 14 (H3K14) および H4 lysine 12 (H4K12) のアセチル化が、未受精卵細胞質中で体細胞の初期化が起こる際どのように変化するのか解析することにした。

ヒストン H3K14 と H4K12 のアセチル化 (Ac-H3K14, Ac-H4K12) は、体細胞分裂期でもアセチル化されている状態であることから cell memory を維持するマーカーとして機能しているとされている。まず、これらの lysine 残基のアセチル化が体細胞分裂期では維持されるが、減数分裂期特異的に脱アセチル化されている事を NIH3T3 細胞とマウス減数分裂期および初期発生胚を用いた免疫染色によって確認した。次に未受精卵細胞質中に NIH3T3 細胞の核を移植すると H4K12 と H3K14 が脱アセチル化される事を確認した (図 2A)。この脱アセチル

化は、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の阻害剤 Trichostatin A 処理によって阻害されることから HDAC の作用である事を確認できた。

更に、EGFP-tagged TBP の発現 vector を NIH3T3 細胞に transfection した後、未受精卵細胞質への核移植実験を行った。体細胞分裂期にはほとんどの転写因子が DNA から離れていくが、TBP は DNA に結合したままであることが報告されている。実験の結果、間期及び分裂期の NIH3T3 核に検出される EGFP シグナルが核移植後に消える事を確認できた(図 2B)。

これらの結果から、H3K14, H4K12 のアセチル化と TBP によって維持される cell memory の消去が初期化機構に関与していることが示唆された。

3. ゲノムの親由来情報維持マーカーとしての非対称的ヒストン H3 lysine 9 のメチル化。

哺乳類では一部の遺伝子の刷り込み(ゲノミック・インプリンティング)によって父親由来のゲノムと母親由来のゲノム間に機能的な差が存在することが知られている。このためゲノムが父親由来か母親由来かを記憶する情報は cell memory が消去される初期化の過程でも維持されなければならない。以前からゲノミック・インプリンティングの維持には制御領域の DNA メチル化が重要であることが知られているが、最近の報告によって DNA のメチル化はヒストン H3 lysine 9 (H3K9)のメチル化の下流で働くことが分かった。そこで、受精後にゲノムの由来を区別するメカニズムから鑑みる事で、初期化の過程でゲノムの由来に関する情報が維持される機構を明らかにできると考え、初期発生胚と核移植胚における H3K9 のメチル化を解析した。

マウス一細胞期胚におけるメチル化 H3K9 を特異的に認識する抗体を用いた免疫染色の結果、母親由来の雌性前核では強いメチル化シグナルが観察されるが、父親由来の雄性前核からは非常に弱いシグナルしか検出されなかった。この父系、母系ゲノム間の非対称的なメチル化は 2 細胞期まで維持されており、1 細胞期から 2 細胞期にかけて DNA 複製依存的な減少が観察された。このことから、非対称性は受精後の新規 H3K9 メチル化活性の欠如によるものであると考えられた。4 細胞期になると H3K9 の新規メチル化によりこの非対称性はなくなった。メチル化されていない雄性前核を、除核した卵胞期卵 (GV) や未受精卵(MII)に移植すると新規メチル化が見られた事から、受精前にはヒストン H3K9 メチル化活性が存在することが確認された。したがって、母親由来のゲノムだけが受精前から未受精卵細胞質に存在するため H3K9 のメチル化が起こると考えられ、受精直後の父系・母系ゲノム由来は受精を境にしたヒストン H3K9 メチル化活性の on-off による H3K9 の非対称的なメチル化によって区別されている事が示唆された。更に、amanitin や cycloheximide を用いて転写やタンパク質合成を阻害すると父親由来のゲノムでも新規 H3K9 メチル化がおこる事から、積極的な非対称的 H3K9 メチル化維持機構の存在が示唆された。以上の実験結果を基に導きだされた非対称的 H3K9 メチル化機構を図 3 に示した。

結論

本研究では、遺伝子発現リプログラミングの際に消える情報(遺伝子発現情報)と維持される情報(ゲノムの親由来情報)について、その両方を解明することがリプログラミング機構の総体的な理解に必要であるとの考えから、クロマチンの epigenetic な挙動に注目して実験を行い、以下の知見を得ることができた。

1. 未受精卵細胞質環境に暴露させないと、分化した細胞が受精卵様のクロマチンリモデリング様式を示さない。したがって、リプログラミングによる全能性の回復には未受精卵細胞質環境が必須である。
2. H3K14, H4K12 のアセチル化と TBP によって維持される cell memory の消去が、分化した細胞における遺伝子発現情報の初期化機構に関与している。
3. 受精直後の父系・母系ゲノムの由来は、受精を境にしたヒストン H3K9 メチル化活性の on-off 調節による非対称的な H3K9 メチル化によって区別されている。

刷り込み遺伝子などの発現様式やテロメア長、血清生化学、病理解剖などの解析によって体細胞クローン動物そのものの異常に関する知見は蓄積されてきたが、その原因に関しては、リプログラミングそのものの理解が明確になされていないため、確立された解釈が存在しなかった。本研究によって得られた知見は体細胞クローン技術の改良、更には近年盛んに研究されている治療目的のクローニングを通じた再生医療への貢献が期待できる。

Protocol of Nuclear Transfer	Development at day 4*
	Morulae-Blastocysts/1cell (%)
TA (Transferred before Activation)	60/107 (56.1)
AT (Activated before Transfer)	1/100 (1.0)
Control Embryo**	56/58 (96.6)

* 核移植を行った日を day1 とした。
** Diploid 単為発生胚をコントロール胚に用いた。

Table 1. 核移植プロトコルの違いによる核移植胚発生率への影響

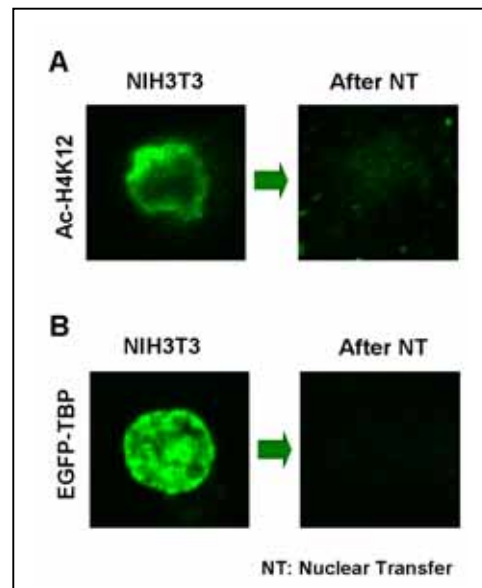


図 2. 核移植(NT)後に見られる cell memory マーカーの消去

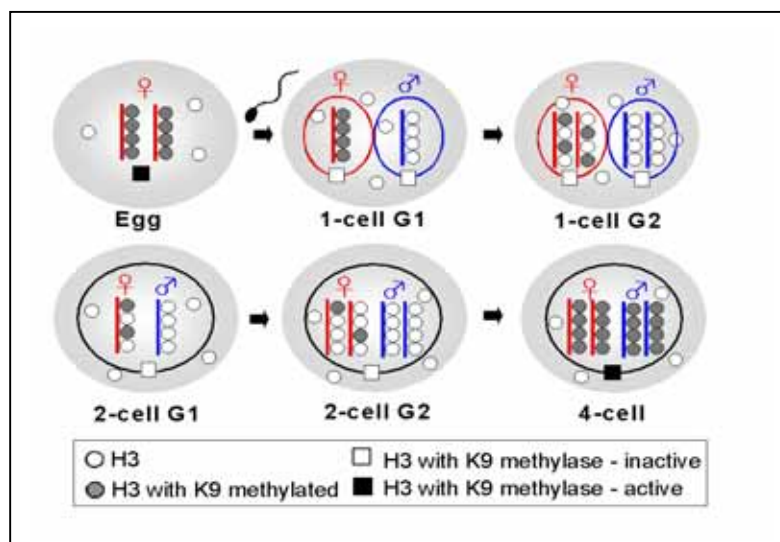


図 3. 非対称的ヒストン H3 lysine 9 メチル化機構の模式図