

論文内容の要旨

論文題目：Mechanisms for embryonic gene activation in the 1-cell mouse embryos

(マウス 1 細胞期胚における胚性遺伝子の発現制御機構)

氏名：原 賢太郎

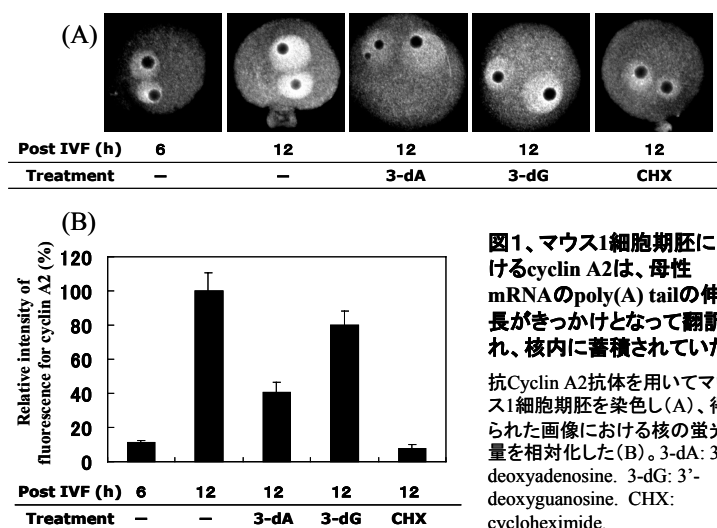
1. 序論

減数分裂の過程で成熟した卵子は、第 2 減数分裂中期で分裂を停止し、その後受精を経て減数分裂を完了し全能性を持つ 1 細胞期胚になる。この間、遺伝子発現は減数分裂の過程で停止し、受精後もしばらくの間停止状態が保たれる。そして、マウスにおいては 1 細胞期胚の S 期になって初めて転写が開始される事が知られている。受精前後における転写停止期間は、分化した細胞である卵子における親世代の遺伝子発現プログラムから、全能性を持つ受精卵としての子世代の新しいプログラムへと、遺伝子発現のリプログラミングが行われる期間であるという点で注目されている。このリプログラミング機構の存在は、実際に受精前後における遺伝子発現プロファイルが異なるという報告から裏付けられており、親世代である卵子の遺伝子発現プログラムがエピジェネティックな修飾の変化により初期化されるという仮説に基づき、これまでに多くの初期化機構に関する研究がなされている。しかし、1 細胞期胚における新しい遺伝子発現プログラムが、どのようにして開始されるのかについては、これまで明らかにされていない。しかし近年、未受精卵から受け継いだ母性 mRNA の poly(A) tail の伸長と、受精後の蛋白質合成がマウス 1 細胞期胚の転写開始に必須である事が明らかにされた。その結果に従えば、受精後に母性 mRNA が poly(A) tail の伸長を受けると、それがきっかけとなって蛋白質が翻訳され、それら母性 mRNA 由来の蛋白質に含まれる転写制御因子が、1 細胞期胚における転写を開始させるとの仮説モデルが考えられる。そこで本研究では、この仮説に基づき、1 細胞期胚において転写開始を調節する転写制御因子を同定し、転写開始のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

2. 結果と考察

2-1. cyclin A2 の翻訳及び cyclin A2/cdk2 の転写開始への関与について

本研究では、転写開始因子の候補として cyclin A2 に着目した。一般に体細胞における cyclin A2



は、cdk2 と結合し cdk2 活性を制御することが知られている。G1/S 期においては、D-type 及び E-type cyclin らと共に cdk 活性を制御し、retinoblastoma protein (pRb)を直接リン酸化する。このリン酸化によって pRb の構造変化が誘導され、pRb 結合蛋白質との結合レベルが変化することによって、転写が制御される事が明らかとなっている。マウス 1 細胞期胚において、cyclin A2 をコードする母性 mRNA は、受精後に poly(A) tail の伸長を受けることによって翻訳されるとの報告がある。本研究において、実際に 1 細胞期胚を 3'-deoxyadenosine 存在下で培養し母性 mRNA の poly(A) tail の伸長を阻害した場合、また cycloheximide(CHX)によって蛋白質合成を阻害した場合共に、cyclin A2 の核内蓄積が抑制されることを免疫染色法によって明らかにした (図 1)。これらの結果から、1 細胞期胚における cyclin A2 の発現様式は「受精後の poly(A) tail の伸長が

きっかけとなって新しく翻訳される」という条件を満たすことが改めて確認され、転写開始因子の候補となりうると考えた。一方 cdk2 については、ノックアウトマウスの実験から体細胞分裂に必須ではないとの報告がなされたが、この実験系では母性由来 cdk2 の機能については明らかにできない。そこで cyclin A2/cdk2 が、1 細胞期胚における転写開始に関与している

かどうかを調べるために、1 細胞期胚を cdk2 inhibitor である roscovitine(Ros)存在下で培養したところ、転写活性が抑制された (図 2-A)。別の cdk2 inhibitor である butyrolactone I(BL1)を用いても同様の結果が得られた。さらに、活性を保持した外来の cyclin A2/cdk2 蛋白質を直接 1 細胞期胚に注入した場合には、転写活性が相対的に増加した (図 2-B)。また cyclin A2 を標的とした siRNA を未受精卵に注入し、cyclin A2 蛋白質の合成を阻害した 1 細胞期胚においては、その転写活性が抑制された (図 2-C)。これらの結果から、cyclin A2/cdk2 は何らかの経路を経てグローバルな転写の活性化を制御していることが示唆された。

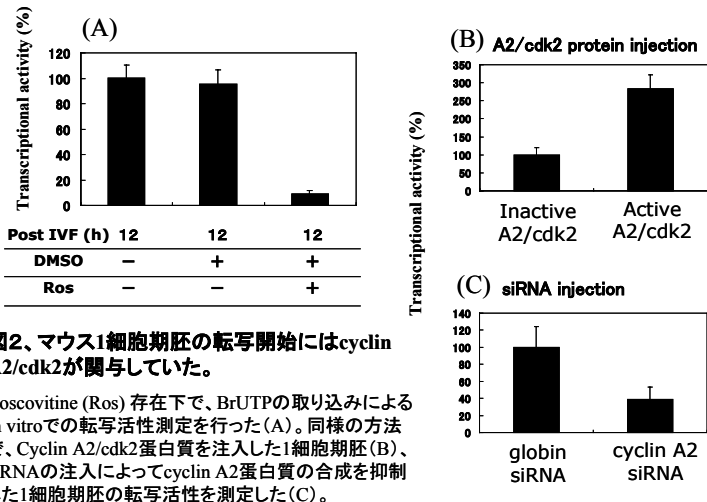


図2、マウス1細胞期胚の転写開始にはcyclin A2/cdk2が関与していた。

Roscovitine (Ros) 存在下で、BrUTPの取り込みによる in vitroでの転写活性測定を行った(A)。同様の方法で、Cyclin A2/cdk2蛋白質を注入した1細胞期胚(B)、siRNAの注入によってcyclin A2蛋白質の合成を抑制した1細胞期胚の転写活性を測定した(C)。

2-2. マウス 1 細胞期胚特異的な pRb リン酸化の推移と転写開始との関係について

Cyclin A2/cdk2 活性と 1 細胞期胚における転写開始とを結びつける蛋白質として、pRb に着目した。マウスの pRb には、10 箇所以上のリン酸化サイトが存在するが、全てのリン酸化サイトは、cyclin/cdk ファミリーによって直接リン酸化されることが知られている。また pRb 結合蛋白質として、これまで数多くの蛋白質が報告されている。例えば、体細胞の G1/S 期において pRb がリン酸化されると、転写因子 E2F が解離し E2F 依存的な遺伝子発現が始まる。これと同時に、

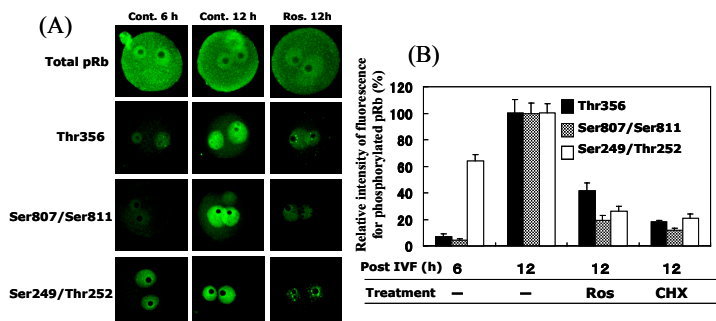


図3、マウス1細胞期胚においてpRbのリン酸化レベルはroscovitine及びcycloheximideによって抑制された。

pRb上のリン酸化部位を、部位特異的に認識する抗リン酸化pRb抗体を用いてマウス1細胞期胚を染色し(A)、核の蛍光量を相対化した(B)。Ros: roscovitine. CHX: cycloheximide.

もしくは前後して pRb は、LXCXE モチーフを持つ蛋白質を構成因子に含むヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 複合体を解離し、より活発な遺伝子発現を誘導するというモデルを示唆する報告がある。しかし E2F や HDAC を解離するために必要なリン酸化サイトはどこなのか、またそのサイトはどの cyclin/cdk によってリン酸化され、E2F や HDAC はいつ pRb から解離するのかについてなど不明な点が多い。また細胞の種類によって、さらに分化の程度によっても pRb 複合体の構成因子群が異なる事が予測され、pRb のリン酸化に伴う結合蛋白質の解離と遺伝子発現については、pRb 結合蛋白質らの相互作用によって精密に制御されていると考えられる。従って、マウス 1 細胞期胚における pRb のリン酸化推移を、リン酸化部位特異的に観察することにより、1 細胞期胚特異的な pRb のリン酸化パターンを明らかにすると共に、pRb 経路が転写開始に関与しているかどうかを明らかにしたいと考えた。A/E-type cyclin/cdk2 によってリン酸化されやすいとされる Thr356、Ser249/Thr252、Ser807/Ser811 は、マウス 1 細胞期胚において、いずれも転写開始前の媒精後 6 時間から、転写開始後の媒精後 12 時間にかけてそのリン酸化レベルが増加していた。さらに、増加したリン酸化レベルは、Ros 及び CHX によって抑制された (図 3-A, B)。特に Thr356 については、外来 cyclin A2/cdk2 蛋白質の注入によってそのリン酸化レベルが増加した (図 4-A)。さらに、siRNA を用いて cyclin A2 蛋白質の合成を阻害した 1 細胞期胚においては、Thr356 のリン酸化レベルが抑制された (図 4-B)。以上の結果から、pRb の Thr356 は cyclin A2/cdk2 蛋白質によってリン酸化されていることが明らかとなり、cyclin A2/cdk2 による pRb のリン酸化によって 1 細胞期胚の転写開始が制御されていることが示唆された。そこで、pRb のリン酸化がどのようなメカニズムで 1 細胞期胚の転写を引き起こすかを明らかにしたいと考えた。

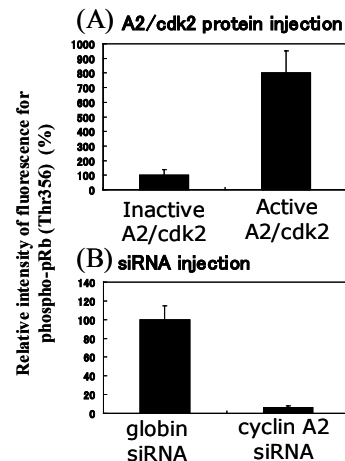


図4、マウス1細胞期胚において、Thr356-pRbはcyclin A2/cdk2によってリン酸化されていた。

抗Thr356リン酸化pRb抗体を用いて、cyclin A2/cdk2蛋白質の注入した1細胞期胚(A)、siRNAを用いてcyclin A2蛋白質の合成を抑制した1細胞期胚を染色し(B)、核の蛍光量を相対化した。

2-3. コアヒストンのアセチル化による転写開始許容状態の形成について

ヒストンのアセチル化は、ヒストンアセチル化酵素 (HAT) 活性と HDAC 活性のバランスによって制御されている。一般にヒストン H3 と H4 のアセチル化は、転写の活性化とよく相関することが知られている。マウス 1 細胞期胚において cdk2 による pRb のリン酸化推移が大きく変動していた事から、LXCXE モチーフを持つ蛋白質の解離が促されていることが予測された。即ち、1 細胞期胚における転写開始には、HDAC によって転写抑制状態にある

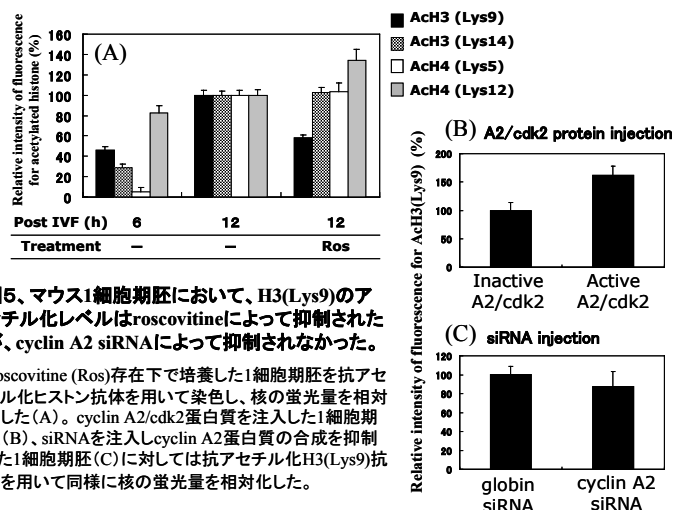


図5、マウス1細胞期胚において、H3(Lys9)のアセチル化レベルはroscovitineによって抑制されたが、cyclin A2 siRNAによって抑制されなかった。

Roscovitine (Ros)存在下で培養した1細胞期胚を抗アセチル化ヒストン抗体を用いて染色し、核の蛍光量を相対化した(A)。cyclin A2/cdk2蛋白質を注入した1細胞期胚(B)、siRNAを注入しcyclin A2蛋白質の合成を抑制した1細胞期胚(C)に対しては抗アセチル化H3(Lys9)抗体を用いて同様に核の蛍光量を相対化した。

ことが予測された。即ち、1 細胞期胚における転写開始には、HDAC によって転写抑制状態にある

機構の解除が関与している可能性が考えられた。実際に 1 細胞期胚を HDAC の阻害剤である trichostatin A で処理すると、H3(Lys9)のアセチル化レベルが増加したことから、1 細胞期胚には HDAC 活性が存在することが明らかとなった。H3(Lys9)、H3(Lys14)、H4(Lys5)、そして H4(Lys12)のアセチル化レベルは、いずれも転写開始前の媒精後 6 時間から、転写開始後の媒精後 12 時間にかけて増加していた。しかし、Ros 処理をした 1 細胞期胚では、H3(Lys9)のアセチル化レベルにおいてのみ、その減少が確認された (図 5-A)。この結果は cdk2 による pRb のリン酸化が HDAC の解離を引き起こし、それが H3(Lys9)のアセチル化レベルを増加させたことを示唆している。この cdk2 の働きにおいて cyclin A2/cdk2 が関与していることを裏付けるために、1 細胞期胚に外来 cyclin A2/cdk2 蛋白質を注入してみたところ、H3(Lys9)のアセチル化レベルがやや増加した (図 5-B)。しかしながら、siRNA を用いて cyclin A2 の翻訳を阻害した 1 細胞期胚においては H3(Lys9)のアセチル化レベルが抑制されなかった (図 5-C)。これらの結果から、1 細胞期胚の転写開始に備えて、cdk2 により H3(Lys9)のアセチル化が誘導され、転写開始許容状態が形成される事は示唆されるが、その過程には cyclin A2 以外の cyclin ファミリーが関与しているものと考えられる。

3. 結論

新しい生命が誕生して最初の遺伝子発現は、マウスでは 1 細胞期胚で起こるが、ブタでは 4 細胞期胚、ウシでは 8 から 16 細胞期胚で起こる事が知られている。なぜ受精直後に転写が開始されず、一定時間もしくは一定回数分裂を繰り返した後に転写が開始されるのかという問いに対しては、これまでのところ「転写開始後の発現に重要な遺伝子の発現を厳密に行うための転写制御状態が完成するまでに時間を要するため」といった概念的な答えのみしか用意されていなかった。本研究においては、マウス 1 細胞期胚を用いた実験からこの概念を支持する 3 つの実験結果を得た。(1) 母性由来 cyclin A2 が受精後に初めて合成され、それが転写の活性化に関与していた。

(2) マウス 1 細胞期胚における Thr356-pRb は cyclin A2/cdk2 によってリン酸化されていた。(3) 転写開始許容状態を形成するために H3(Lys9)のアセチル化レベルが増加していた。以上の事から、マウス 1 細胞期胚における転写開始には、少なくとも母性由来 cyclin A2 と cdk2 の複合体によってリン酸化された pRb の構造が変化し、それによって転写が開始する機構の存在が考えられた。また cdk2 は、cyclin E などの、A2

以外の cyclin とも結合して pRb をリン酸化することで、HDAC などが pRb から解離し、転写抑制状態を解除する可能性が示され、これらの機構が同時に転写開始に関与していると考えられた (図 6)。

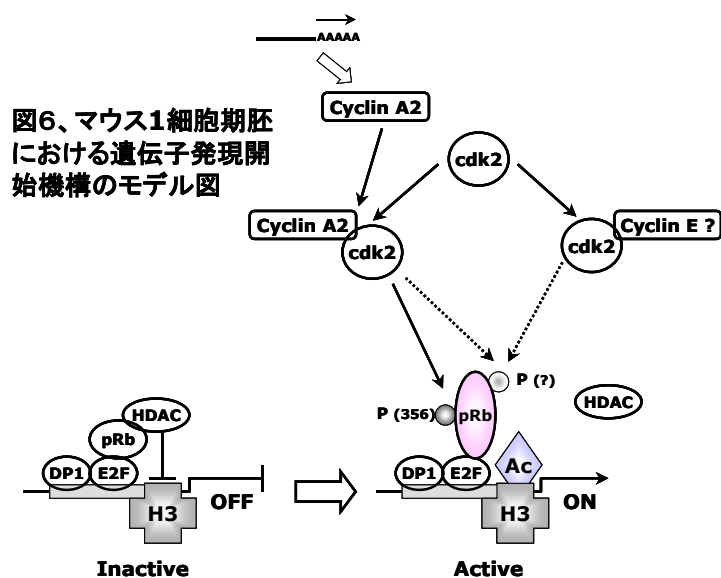


図6、マウス1細胞期胚における遺伝子発現開始機構のモデル図