

論文の内容の要旨

論文題目 Involvement of Histone H3 lysine 79 methylation and Dot1L in the mechanism regulating totipotency in mouse preimplantation embryos

(マウス着床前初期発生における分化全能性調節への Histone H3 lysine 79 メチル化および Dot1L の関与)

氏 名 大我 政敏

[序論]

受精前の卵は生殖細胞として最終分化を遂げた状態にあるが、受精後の1細胞期胚は全能性を獲得した細胞である。全能性は初期発生の過程で次第に失われ、胚盤胞期では一部の細胞が栄養外胚葉へと分化する (図1)。この分化を調節するメカニズムについては多くの研究がなされているが、それ以前の全能性を調節するメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。また、初期発生中の遺伝子発現パターンは発生の進行とともに大きく変化していくが、その調節機構についても未解明のままである。一方、分化した体細胞では分裂後も遺伝子発現パターンが維持され、その分化した状態が維持される。この分化した状態を維持する機構は” cell memory” と呼ばれ、ヒストン修飾に代表されるエピジェネティックな修飾がその調節に重要な役割を果たしていると考えられている。よって、分化した状態になく、さらに、遺伝子発現パターンが分裂後に維持されないで、大きく変化している初期胚では、cell memoryのメカニズムが体細胞とは異なっている可能性がある。

cell memoryのマーカの一つにヒストンH3のN末端から79番目のリジン残基のジメチル化 (H3K79me2) がある。この修飾はDot1L (Disruptor of telomeric silencing 1 Like) によってのみなされることが知られており、Dot1LによるH3K79me2は、活発に転写される遺伝子に多く見られるエピジェネティックな修飾として報告されている。さらに、分裂前に活発に転写されていた遺伝子領域では、分裂後もH3K79me2が維持されることから、分化状態を維持するcell memoryのマーカとして機能すると考えられている。

そこで本研究では、初期胚の分化全能性を調節するメカニズムを明らかにする目的で、受精前後におけるH3K79me2とそのメ

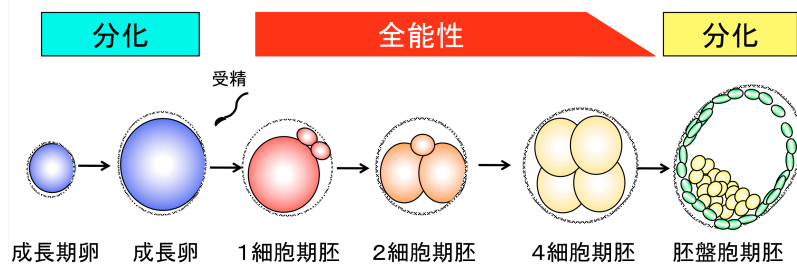


図1. 初期発生において全能性は次第に失われる

チル基転移酵素であるDot1Lの動態解析を行い、さらに、初期胚におけるDot1Lのメチル化活性制御機構の解明を試みた。

[結果と考察]

1. H3K79me2 と Dot1L の動態解析

まず、H3K79me2 と Dot1L が受精前から初期発生においてどのような動態を示すのかを調べるために、成長期卵、成長卵、1細胞期胚、2細胞期胚、4細胞期胚および胚盤胞期胚におけるH3K79me2 と Dot1L の動態を特異的抗体を用いた免疫染色法にて解析を行った。その結果、成長期卵および成長卵ではH3K79me2 が高レベルであるのに対して、1細胞期胚、2細胞期胚では低レベルであることが判った(図2A)。続く4細胞期胚ではH3K79me2 がやや増加し、胚盤胞期胚では再び高レベル

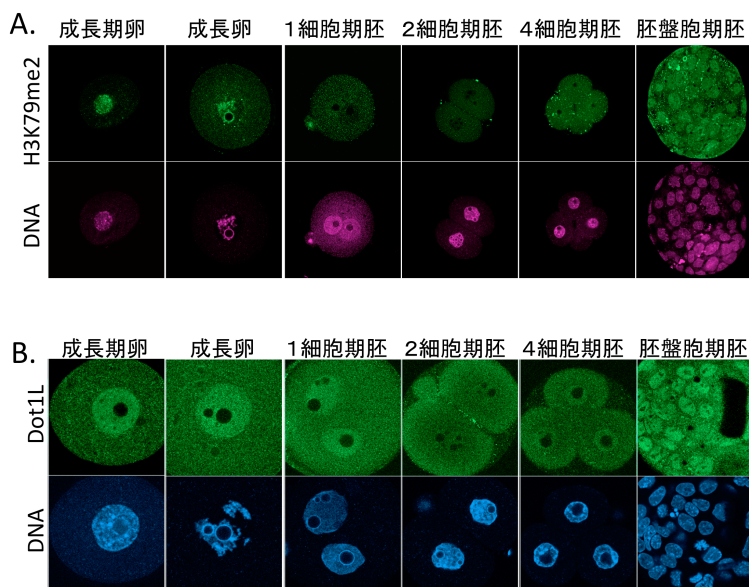


図2. 卵および初期胚におけるH3K79me2(A)とDot1L(B)の免疫染色像

となっていることが確認された(図2A)。Dot1Lは成長期卵、成長卵および1細胞期胚では、豊富に核に存在していたが、2細胞期胚では殆ど検出されなかった(図2B)。4細胞期胚では再びDot1Lは核に低レベルで観察され始め、胚盤胞期胚では豊富に核内に存在していた(図2B)。以上より、1細胞期胚と2細胞期胚ではH3K79me2がほとんど存在しないため、遺伝子発現パターンが分裂後に維持されないのではないかと考えられた。また、2細胞期胚において、H3K79me2が低いレベルにあることは、Dot1Lが核内にほとんど存在しないことに起因すると考えられた。1細胞期胚に関してはH3K79me2が低レベルであるにも関わらず、Dot1Lが核内に豊富に存在していたことから、1細胞期胚ではH3K79me2が、2細胞期胚とは別の機構によって制御されていると考えられた。

2. 1細胞期胚、2細胞期胚におけるH3K79me2の制御機構の解析

Dot1Lによるメチル化反応には、H2Bの120番目のリジンのユビキチン化(ubH2B)が必要であることが報告されている。そこで、1細胞期胚においてH3K79me2が低いレベルにあることに、このubH2Bが関わっているのではないかと

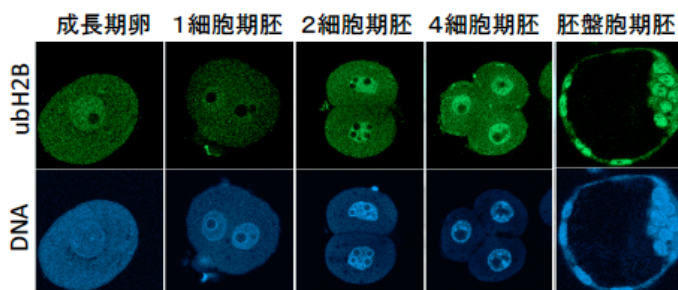


図3. 卵および初期胚におけるH2Bユビキチン化(ubH2B)の免疫染色像

考え、受精前後におけるubH2Bの動態を免疫染色法により解析した。その結果、成長期卵ではubH2Bが検出されたが、受精後の1細胞期胚ではubH2Bは僅かにしか検出されなかった(図3)。

そして、2細胞期胚、4細胞期胚、胚盤胞期胚では ubH2B が検出された (図 3)。以上の結果より、1細胞期胚では、Dot1L が核内に存在しているにも関わらず ubH2B が低いレベルに抑えられていることで、メチル化反応が起こらなくなり、その結果 H3K79me2 が低いレベルに維持されていると考えられた。

体細胞において、H3K79me2 は Dot1L の核局在制御によって調節されることが報告されている。そこで、2細胞期胚で H3K79me2 が低いレベルにあることに、Dot1L の核局制御機構が関与しているかどうかを検証するために、Flag-tag を付与した Dot1L の mRNA を 1細胞期胚に顕微注射し、Flag-Dot1L を発現させた。1細胞期胚、2細胞期胚において核への局在が見られるかを抗 Flag 抗体による免疫染色法で解析した結果、1細胞期胚では Flag-Dot1L の核への局在が確認されたが、2細胞期胚では認められなかった (図 4)。以上の結果より、2細胞期で H3K79me2 が低いレベルにある原因は、この時期に Dot1L の核局在が起こらないためであると考えられた。

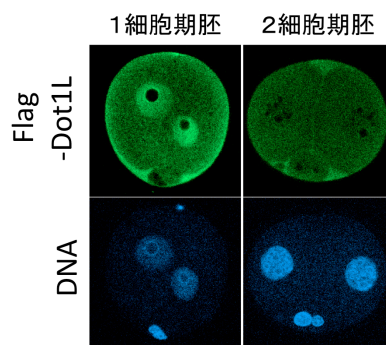


図4. Flag-Dot1Lの1、2細胞期胚における核移行の有無

Dot1L の 2細胞期胚特異的な核局在の制御機構を調べるために、Dot1L 内部の核局在シグナル (NLS) に着目した。まず、Dot1L が持つ 3つの NLS (NLS1:393-416, NLS2:1089-1112, NLS3:1165-1172) (図 5 A) のいずれかが機能しなくなることで、2細胞期胚では Dot1L が核へ局在できなくなっていると考え、それぞれの NLS について機能の有無を解析した。NLS1 と NLS2, 3 の働きを調べるために conserved catalytic core region (core : 1-344) を含む 1-393 (N393) と、これに NLS1 または NLS2, 3 を付与したコンストラクト (N393-NLS1, N393-NLS2, 3) をそれぞれ作製し、2細胞期胚で発現させ、その核への局在の有無を調べた。その結果、N393 は核への局在が見られなかったが (図 5 B)、N393-NLS1 と N393-NLS2, 3 のいずれのコンストラクトも核へ局在した (図 5 C, D)。この結果は、NLS1 と NLS2, 3 がいずれも 2細胞期胚で機能することを示しており、NLS 以外の要素が 2細胞期胚特異的な核外局在をもたらすことが示唆された。

続いて 2細胞期胚での Dot1L の核外排出機構に着目した。これまでに、Dot1L の核外排出機構については、Nuclear Export Domain 1 (NED1:479-659) (図 5 A) を介した排出機構が報告されていることから、NED1 とその下流のこれまで解析が行われていない領域 (660-972 と 973-1088) をそれぞれ欠失させ、その Dot1L の核局在への影響

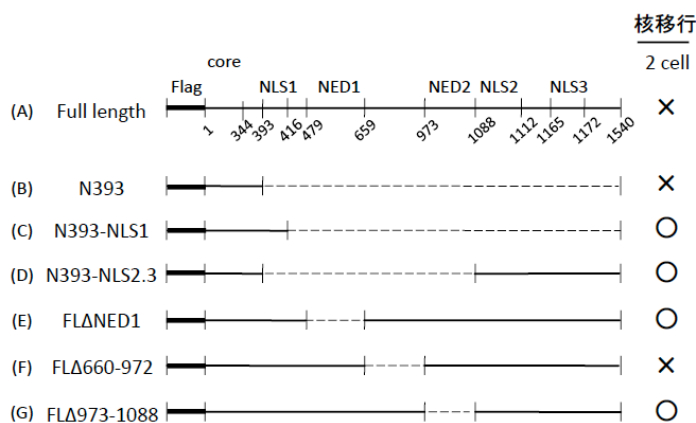


図5. 核局在制御に関わるdomainの解析
点線はdeleteされたdomainを示す。
core: Conserved catalytic core domain, NLS: nuclear localization signal, NED: Nuclear export domain

を調べた。その結果、660-972 の欠失変異体は核への局在が認められないままであったが (図 5 F)、NED1 あるいは 973-1088 のどちらか一方が欠失している変異体では核への局在が認められるようになった (図 5 E, G)。以上の結果より 2細胞期胚での核局在制御には核外排出活性が関与しており、この顕著な核外排出には既知の NED1 と新規の 973-1088 domain (NED2) の両方が必要

であることが明らかとなった。

3. 2細胞期胚での H3K79me2 の機能解析

これまでの結果より、2細胞期胚において Dot1L が核外排出されることで、H3K79me2 が低いレベルに維持されていることが考えられた。この仮説を検証するために、核内局在する N393-NLS1 (図 5C) を 2細胞期胚に発現させたところ、H3K79me2 の増加が見られた (図 6A)。対照区として ddH₂O を顕微注入したものでは H3K79me2 の増加は見られなかった (図 6A)。このことから、Dot1L の核外排出機構が H3K79me2 を低いレベルで維持することに重要であることが改めて確認された。続いて、2細胞期胚での Dot1L の核外排出機構の初期発生への関与を調べるために、N393-NLS1 を発現させた胚の発生率を調べた。その結果、N393-NLS1 を発現させた胚では 2細胞期胚以降の卵割が起こらず、発生が停止した (図 6B)。一方で対照区である ddH₂O を顕微注入したものでは、96.3%が胚盤胞期まで発生した (図 6B)。以上の結果より、2細胞期胚では Dot1L の核外排出機構により、H3K79me2 が低レベルで維持され、それが、2細胞期胚以降の発生に重要であることが示唆された。

[結論]

本研究ではまず、1細胞期胚、2細胞期胚では、

cell memory のマーカーとして機能する H3K79me2 が低いレベルで維持されていることを見出した。その原因として、1細胞期胚では ubH2B が低レベルであるために Dot1L によるメチル化が起こらないこと、2細胞期胚では NED1 と NED2 が協調して機能することで Dot1L が核外排出されていることを明らかにした (図 7)。さらに、H3K79me2 の低レベルでの維持は初期発生に必須であることを示した。このように Dot1L 活性の時期特異的な制御機構により、受精直後の初期胚では H3K79me2 が低レベルとなるので cell memory が機能せず、分裂後に遺伝子発現パターンが維持されなくなる。そしてそのことが、初期胚が未分化な状態、すなわち全能性を持つ状態となっていることに関与しているのではないかと考えられた。

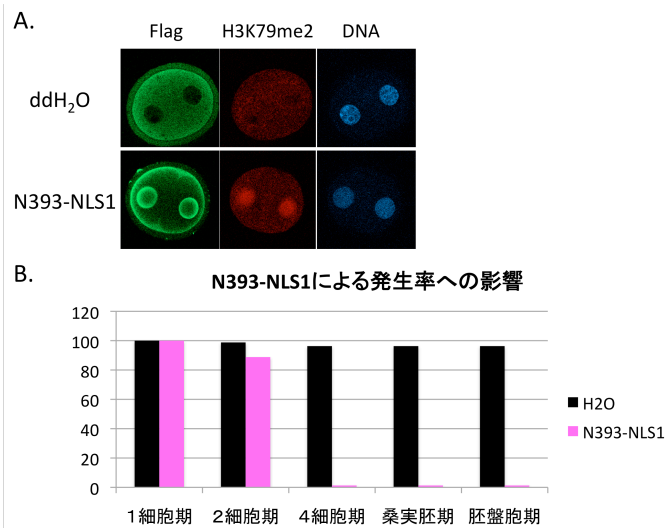


図6. 各Deletion mutantを発現した2細胞期でのメチル化誘導(A)とその発生率への影響(B)

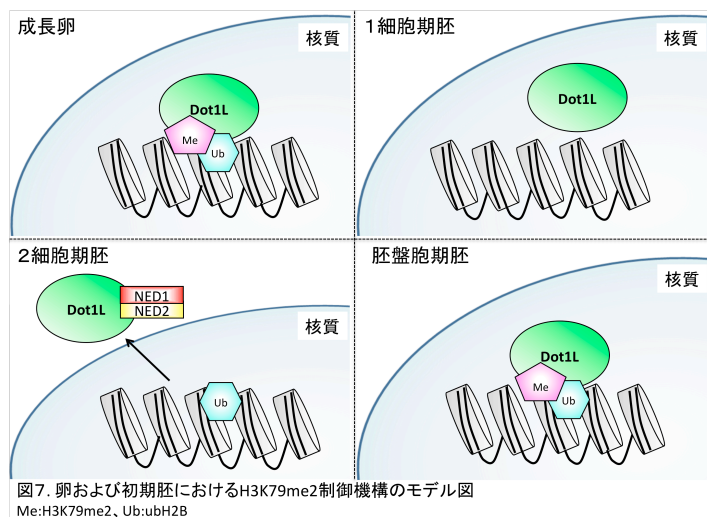


図7. 卵および初期胚におけるH3K79me2制御機構のモデル図
Me:H3K79me2, Ub:ubH2B