

シンポジウム2 配偶子形成とその成熟の分子機構

卵子形成・成熟過程におけるエピジェネティクスの解明

慶應義塾大学講師 田 中 守

目 的

多細胞生物の1個体内の細胞は基本的に同一ゲノムを有しているにも関わらず、個々の細胞機能はまったく異なっているという現象から、各細胞におけるゲノム上の遺伝子活用の方法、すなわちエピジェネティクスの解明がポストゲノム時代の重要なテーマとなってきている。生殖細胞系列は、唯一そのゲノムを次世代に伝達する役割を担っており、生殖細胞に特異的なエピジェネティクスの機構が備わっていることが想定される。膨大な量の真核生物のゲノムは、塩基性蛋白であるヒストンが結合することによって折り畳まれて凝縮し、染色体として核内に収納されている。ヒストンには、コアヒストンとリンカーDNAに結合するリンカーヒストンの2種類が存在している。リンカーヒストンは卵子を除く全ての細胞に発現する体細胞型リンカーヒストンと、卵子のみに発現する卵子特異的リンカーヒストンが存在する。

本研究では、我々が哺乳類で初めて発見した卵子特異的リンカーヒストンに注目し、受精過程におけるクロマチンの修飾機構から見た配偶子形成、成熟のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

方 法

1. Suppression Subtractive Hybridization (SSH) 法による卵巣特異的遺伝子の発見

C57BL6/Jマウスを使用し、卵巣(tester)とその他の組織(driver)より抽出したmRNAを使用し、SSH法を行い卵子特異的遺伝子ライブラリーを作成した。さらに新規遺伝子に注目しRACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)法により全長cDNAを求めた。

2. 卵子形成・受精・体細胞核移植における卵子特異的リンカーヒストンH1fooの発現

SSHによって発見されたH1fooの卵子形成期

における発現を検討するため、in situ hybridization法、免疫組織化学法によりH1foo mRNA、蛋白の発現変化を検討した。さらに受精過程におけるH1foo発現を検討するために自然妊娠胚及び体細胞核移植クローン胚を使用し、H1foo蛋白の発現を検討した。また、MII期卵子にGFP-H1c発現細胞の核移植を行い、体細胞型リンカーヒストンの移植胚における動態を観察した。

3. GFP結合H1foo蛋白の染色体への動的結合の検討

体細胞型リンカーヒストンは動的に染色体への結合・解離を繰り返しており、その結合動態が染色体の高次構造、遺伝子発現調節に関与していることが示されてきている。そこでGFP-H1foo融合ベクターを使用しH1fooを発現した3T3細胞を作成した。次に共焦点レーザー顕微鏡を用いてGFP-H1foo蛋白の染色体結合動態についてFluorescence recovery after photobleaching (FRAP)法により検討した。

4. H1foo蛋白の相互作用の検討

上記で作成した、恒常的H1foo発現細胞の核蛋白を抽出し、細胞周期関連蛋白の抗体アレイによって、H1foo蛋白と相互作用をする蛋白を検出した。

5. H1foo蛋白の機能調節機構の検討

卵子の成熟化機構におけるH1foo蛋白の役割を明らかにするために、大腸菌で作成したリコンビナントH1fooをMPFの活性中心であるリコンビナントcdc2/cyclinBによって、リン酸化されるかどうか検討した。さらに、H1fooとクロマチンの結合能をMNase assayにて検討した。

6. ヒトH1fooの全長cDNAのクローニング

十分な説明と同意の下に卵子由来のcDNAを使用し、RACE法によってヒトH1fooの全長cDNAのクローニングを行った。

成 績

1. SSHにより得られた卵子特異的遺伝子ライブラリーの中から、現在までウニとカエルにのみ発見されていた卵子特異的リンカーヒストンがクローニングされ、H1fooと名付けた。

2. H1foo mRNA 及び蛋白は、一次卵胞形成期より発現を開始し、卵胞発育とともにその発現量は増加する傾向を示した。また、卵子・初期胚におけるH1foo蛋白は、GV期卵、MII期卵、受精(核移植)後、2細胞期の核に発現を認めたが、4細胞期には消失した。したがってH1fooは、卵子形成から受精後配偶子の遺伝子発現が開始するまでの間、細胞核に局在していることが確認された。また、体細胞核移植数時間後に、体細胞型リンカーヒストンが消失することが確認された。

3. FRAPによる解析により、GFP-H1fooは、コントロールである体細胞型リンカーヒストンGFP-H1cに比べ50% recoveryが22秒と有意に速く、また、動的成分も92%と有意に高値を示した。したがって、卵子特異的リンカーヒストンH1fooは、体細胞型リンカーヒストンに比べ、動的成分が多く、極めて短時間にクロマチンに結合・解離を繰り返していることが示された。

4. 抗体アレイによってH1fooと相互作用をする核内細胞周期関連蛋白としてCyclin D3, p19, GAK, p16, Cdc2等がスクリーニングされた。H1fooは、特定の細胞周期調節蛋白と相互作用をすることが示唆された。

5. リコンビナントH1foo蛋白は、MPFの活性中心であるcdc2/cyclinBによってリン酸化された。また、MNase assayにより、DNAにも直接結合することが示された。

6. RACE法により、ヒトH1fooの全長cDNAがクローニングされた。他の卵子特異的リンカーヒストンと比較してDNAに結合するglobularドメインのアミノ酸配列が極めて良く保存されていることが判明し、重要な機能を持っていると考えられた。さらに、5'末端の非翻訳領域においてもカエルやマウスと共通の卵子特異的な蛋白翻訳調節機構が存在していることが示唆された。

結 論

卵子特異的遺伝子ライブラリーを作成し、哺乳類で初めて卵子特異的リンカーヒストンH1fooを発見した。このH1fooは、卵子形成期の卵子核から受精後配偶子の遺伝子発現が開始するまでの配偶子核に局在していることが確認された。体細胞核を卵子に移植すると体細胞型リンカーヒストンが卵子型に置換されることが明らかになった。また、卵子特異的リンカーヒストンは、その動態や性質が体細胞型と異なることが明らかとなり、卵子におけるエピジェネティクスを調節している重要な因子であると考えられた。本研究の結果により生殖細胞特異的なエピジェネティクス機構の一端が明らかとなり、臨床上問題となってきた体外受精法・顕微授精法の限界を乗り越える画期的な治療法の開発が進むものと考えられる。