

終了年月：2007年3月22日

専攻・コース名：先端生命科学専攻

氏名：白倉義之

学生証番号：47-56523

論文題目：マウス初期胚における *hsp70* 遺伝子の発現制御機構の解明

キーワード：着床前胚、遺伝子発現、ヒストン修飾、クロマチン免疫沈降法、
マイクロインジェクション、*hsp70*

指導教員名：青木不学

指導教員役職：助教授

マウス初期胚における *hsp70* 遺伝子の発現制御機構の解明

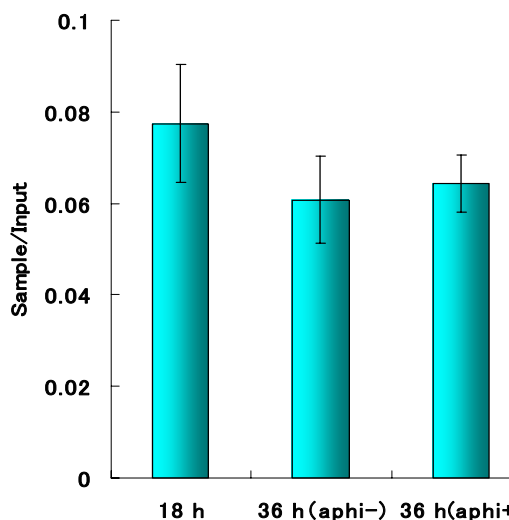
学生証番号 56523

資源生物学分野 白倉義之

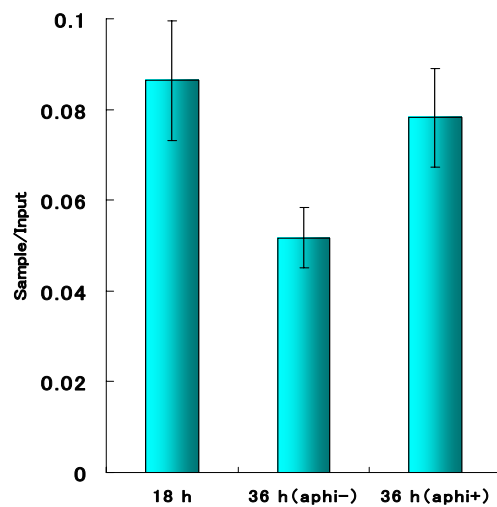
[要旨]

本研究は、2細胞期胚において一過的に発現する *hsp70* の発現調節機構を明らかにすることを目的としたものである。受精直後の胚は遺伝子発現を停止した状態にあるが、マウスでは胚ゲノムによる転写が1細胞期の後期から始まる事が知られている。そして、2細胞期の前期から後期の間には遺伝子発現パターンが劇的に変化する。*hsp70*はこの転写開始初期に発現し、発現の開始後、2細胞期後期には抑制されることから、受精後の最初の遺伝子発現を調節するメカニズムを研究する際の landmark となっている遺伝子である。体細胞では熱刺激などによるストレスを受け、誘導がかかり発現が上昇する事が知られているが、初期胚では1細胞期後期から2細胞期前期にかけてはストレスの有無とは関係なく発現している。しかしながら2細胞期後期になると発現が無くなり、熱刺激を加えても発現は起こらない。このことは、2細胞期中期、すなわち2細胞期S期に *hsp70* の発現調節に関して体細胞とは異なる初期胚特異的な変化が起こっていることを示唆しているが、そのメカニズムについてはDNA複製との関連も含めてこれまでほとんど明らかにされていない。近年、クロマチンを構成するヒストンの修飾が遺伝子発現の調節に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。そこで、本研究では、2細胞期胚での *hsp70* の発現調節機構を明らかにする目的で、その発現変化におけるDNA複製とヒストン修飾の関与を調べた。

(A) H4ac化の変化



(B) H3K4me2化の変化



PM-ChIP 法の結果

【結果と考察】

まず、体細胞と2細胞期胚における *hsp70* の発現を real-time PCR によって確認した。2細胞期前期の胚では高い発現が見られたが、後期において急激に発現量が低下していた。体細胞では、熱ショックにより著しい発現の上昇が見られたが、2細胞期前期および後期のいずれにおいても、熱ショックによる発現誘導は見られなかった。また、DNA複製阻害剤である aphidicolin によって、2細胞後期でも発現が見られるようになったことから、DNA複製が2細胞期中での *hsp70* の発現抑制に関与していることが明らかになった。

次に転写因子 HSF-1 の細胞内局在を調べた。HSF-1 は *hsp70* の promoter に結合して *hsp70* の発現を上昇させる転写因子である。体細胞では細胞質と核に一様に局在しているが、熱による刺激で細胞質から核内に移行する事が分かっている。初期胚での局在を免疫染色法で調べたところ、2細胞期を通して常に核内に多く局在していることが確認された。この局在は、熱刺激を与えても変化しなかった。さらに、DNA複製阻害による変化も見られなかった。したがって、2細胞期胚においては、HSF-1 の核内局在の変化は *hsp70* の転写の上昇や下降に関与していない事が示唆された。

最後に *hsp70* の制御領域におけるヒストン修飾の変化を2細胞期胚で調べた。一般にヒストン修飾の変化は、Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) 法により調べられているが、そのためには、 10^6 程度の細胞数が必要である。しかし、マウスの胚は、一匹のマウスからわずか数十個しか得られないので、ChIP 法に必要な数の胚を用意することは現実的ではない。そこで本研究室で確立された手法である Plasmid-microinjection Chromatin Immunoprecipitation (以下 PM-ChIP) 法を実施した。この方法では、初期胚に解析したい配列を持った plasmid DNA をマイクロインジェクションし、核内でクロマチン構造をとった plasmid DNA に対して ChIP 法を行うものである。*hsp70* の制御領域を含んだ plasmid を構築し、これを用いて PM-ChIP を行った結果、2細胞S期を挟んで H3K4 の dimethylation (H3K4me2) レベルが低下することが分かった。さらに、この低下は、aphidicolin 処理で抑制されたことから、2細胞期における *hsp70* の発現調節に H3K4me2 が関与していることが示唆された。