

減数分裂期におけるヒストン脱アセチル化の生理的機能とその制御機構

学生証番号 36502 資源生物制御学分野
秋山智彦

【序論】

哺乳類の減数分裂進行においてゲノムの構造や性質は大きく変化するが、このときクロマチンの構造に減数分裂特異的な変化が必要であると考えられる。クロマチン構造を変化させる因子の一つであるヒストンのアセチル化は、体細胞において遺伝子の転写制御や DNA の複製、組換え、修復に重要な役割を果たすことが数多く報告されている。しかし、卵減数分裂における、ヒストン修飾の変化についてはほとんど分かっておらず、その役割や調節機構を明らかにすることは、減数分裂機構を解明するために重要であると考えられる。近年、マウス卵を用いた実験により、体細胞分裂期において維持されるヒストンのアセチル化が、減数分裂期ではグローバルに消去されることが明らかになった。

本研究では、減数分裂の調節に重要な役割を持つと考えられるヒストン脱アセチル化について、その生理的機能を明らかにすることを目的とし、解析を行った。さらに、その制御機構を明らかにするためにヒストン脱アセチル化への p34^{cdc2} 活性およびタンパク質合成の関与を調べた。

【結果および考察】

1. 卵減数分裂期におけるヒストン脱アセチル化の生理的機能

まず、マウス卵減数分裂期のヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 活性を Trichostatin A (TSA) により阻害し、ヒストンの脱アセチル化を抑制した際、減数分裂の進行に影響するかどうかを調べた。TSA 添加培養液中で体外成熟させ第二分裂期まで到達した卵において、ヒストンのアセチル化が維持されていることをアセチル化したヒストン H4 のリジン 12 番 (H4K12) を認識する抗体を用いた免疫染色法により確認した (図 1A)。TSA 処理をした卵としなかった対照群の卵で第二分裂期に到達した割合に差が見られなかったことから、減数分裂期においてヒストンの脱アセチル化を抑制しても減数分裂進行には影響しないことが示された。

次に、着床前初期発生に対する、卵減数分裂期におけるヒストンの脱アセチル化を抑制したときの影響を調べた。減数分裂期に TSA 処理した卵としなかった対照群の卵を体外受精させ培養したところ、胚盤胞期までの発生率に差は見られなかった。したがって、卵減数分裂期におけるヒストンの脱アセチル化を抑制しても着床前までの初期発生には影響しないことが明らかになった。

そこで最後に、着床後の胚発生への影響を調べた。第二分裂期に到達した卵を体外受精させ、偽妊娠した雌マウスの卵管に胚移植した。減数分裂期に TSA 処理せずヒストンが脱アセチル化した胚を移植した雌マウスからは、平均して 8.3 匹の健康な仔が産まれた (図 1B)。しかしながら、TSA 処理により減数分裂期のヒストン脱アセチル化を阻害した胚を移植した場合は、平均 3.7 匹の仔しか産まれなかった (Fig. 2)。TSA 処理した胚を移植した雌マウスから出産した仔の中には、出生後致死になるものが一部に見られた。そこで、胚移植を行った受容雌マウスについて妊娠 11.5 日後に子宮を開き、着床した胚の数を調べたところ、減数分裂期のヒストン脱アセチル化を阻害した胚を移植した場合は、着床した胚の半数以上が再吸収されているかすでに死んでいるかのどちらかであった。この結果、減数分裂期のヒストン脱アセチル化を抑制した胚の一部が着床後早期に致死になることが示された。

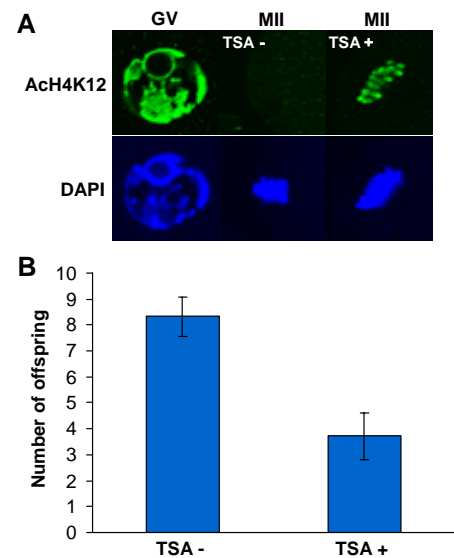


図1. 減数分裂期のヒストン脱アセチル化を阻害したときの影響
A) TSA 処理をして (TSA+) 第一分裂前期 (GV) から第二分裂中期 (MII) まで達した卵のヒストンアセチル化 (AcH4K12) は維持された。B) TSA+ の胚を移植した雌マウスからの産仔数は顕著に減少した。

これらの異常には、染色体異常が関係しているのではないかと仮定し、1細胞胚分裂期での染色体数を染色体標本作製して調べた。減数分裂期を TSA 処理しなかった場合には、染色体数に異常があった胚は 21%であったのに対し、TSA 処理したときでは、異常な染色体数の胚が 62%にも達した (図 2)。したがって、ヒストンの脱アセチル化は減数分裂期において染色体の分配を調節する機構に関わっていることが明らかになった。そして、減数分裂期中にヒストンがアセチル化されたままでいると、染色体数の異常を引き起こし、胚性致死および出生後致死に至ることが示された。

ヒトやマウスでは、高齢になるほど卵における染色体不分離を起こしやすいことが知られている。高齢マウスの卵減数分裂期についてヒストンのアセチル化状態を免疫染色法により調べたところ、アセチル化が残存していることが明らかになった。この結果から、高齢期の卵では、ヒストンの脱アセチル化機構に異常が生じ、それが染色体不分離を高頻度で起こす原因であることが示唆された。

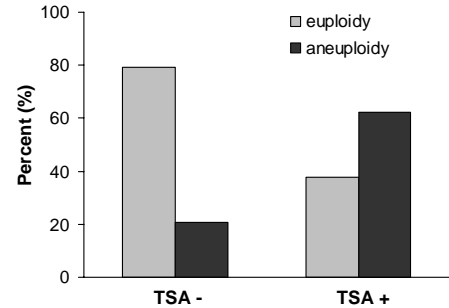


図2. TSAにより減数分裂期のヒストン脱アセチル化を阻害した受精卵は染色体数に異常を起こす

2. 卵減数分裂期におけるヒストン脱アセチル化の制御機構

卵減数分裂期における H4K12 のアセチル化状態の変動を抗アセチル化 H4K12 抗体を用いた免疫染色法により調べた結果、第一および第二分裂期には脱アセチル化されており、その間期では一時的にアセチル化された状態に戻ることが確認された。

これらのヒストン脱アセチル化状態の変動は減数分裂期の $p34^{cdc2}$ 活性の変化パターンに類似していたため、第一および第二分裂期に起こる $p34^{cdc2}$ の活性化を roscovitine により阻害したところ、H4K12 は脱アセチル化されなかった。このことから、減数分裂期におけるヒストンの脱アセチル化には $p34^{cdc2}$ 活性が必要であることが示された。さらに、 $p34^{cdc2}$ 活性がヒストンアセチル化酵素 (HAT) と HDAC のどちらにも影響を及ぼしているのかを調べるために、H4K12 が脱アセチル化された後に $p34^{cdc2}$ 活性を阻害した。もし、 $p34^{cdc2}$ 活性を阻害して、いったん脱アセチル化された H4K12 が再びアセチル化されたら、 $p34^{cdc2}$ 活性は HAT 活性を抑えているということになる。しかし、実験の結果では、H4K12 は脱アセチル化された状態のままであった。したがって、 $p34^{cdc2}$ 活性は、HDAC を活性化することにより、ヒストンを脱アセチル化させていることが示された。

Cycloheximide を用いてタンパク質合成を阻害し、同様の実験を行ったところ、第一および第二分裂期に起こる H4K12 の脱アセチル化は阻害された。この結果から、減数分裂期に合成されるタンパク質がヒストンの脱アセチル化に関わっていることが示された。さらに、H4K12 が脱アセチル化された後、roscovitine 処理では戻らなかったアセチル化が cycloheximide 処理により回復した。したがって、減数分裂期に合成されるタンパク質が HAT 活性を抑制し、ヒストンの脱アセチル化に関与していることが明らかになった。

これまでに、体細胞分裂期では HAT および HDAC の両方が不活性化されてヒストンのアセチル化が維持されることが報告されている。一方、本研究により、減数分裂期には $p34^{cdc2}$ 活性によって HDAC が活性化され、さらに新しく合成されたタンパク質によって HAT が不活性化されることにより、この時期特異的な脱アセチル化が起こることが示唆された (図 3)。

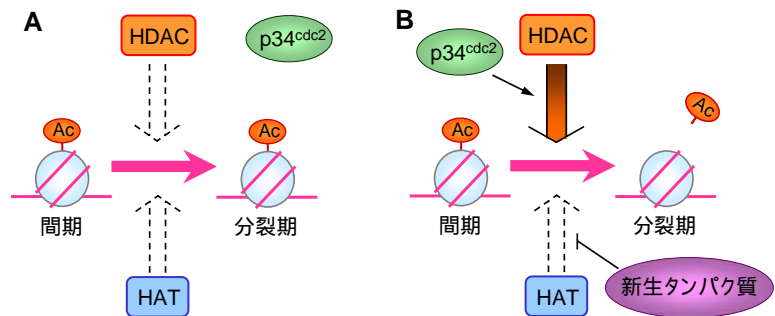


図3. ヒストン脱アセチル化の制御機構
A) 体細胞分裂期 B) 減数分裂期