

メダカ初期胚の発生過程におけるヒストン修飾の変化

2007年3月終了予定

先端生命科学専攻 動物生殖システム分野

学籍番号 56541 広田正史

指導教官 三谷啓志 教授 尾田正二 講師

キーワード ヒストン、修飾、メチル化、アセチル化、胚性遺伝子発現

【序論】

個体を形成する細胞には同一のゲノムが含まれているにもかかわらず、細胞種により、機能や形態が多様である。この多様性は細胞種により異なるパターンの遺伝子発現がなされていることに起因しており、近年、ヒストンがメチル化やアセチル化等の修飾を受けることにより、遺伝子の発現制御に関与していることが示唆されている。メダカ胚の初期発生は胚性の遺伝子発現に切り替わるまで母性 mRNA により維持される。この胚性の遺伝子発現に切り替わる時期は Mid-Blastula Transition (MBT) と呼ばれ、MBT 以降、分化を開始すると考えられている。哺乳類においては発生に伴って変化するヒストン修飾は初期発生が正常に進行するために極めて重要な役割を果たしていると考えられており、その詳細が明らかになりつつある。しかし哺乳類以外の脊椎動物においてはその初期胚においてヒストンがいかなる修飾を受けるのか、また発生に伴ってどのような変動を示すのかほとんど研究が手つかずのままである。本研究ではヒストン修飾に特異的な抗体を用いて免疫染色によりメダカ初期胚におけるヒストン修飾の実態を解明し、魚類の初期発生におけるヒストン修飾の詳細とその意義について解明することを目的とした。

【結果と考察】

メダカ胚を用いた初期発生の過程におけるヒストン修飾の変化

メダカ初期胚を用いて免疫染色を行った結果、ヒストン修飾がその種類により初めて出現する発生段階が異なっていることが明らかとなった。H3K9 のアセチル化は 8 細胞期(St.5)、H3K9 のジメチル化および H4K12 のアセチル化は 16 細胞期(St.6)、そして H3K4 のジメチル化および H3K4 のトリメチル化は桑実胚期(St.8)の胚において初めて認められた。メダカ初期胚における MBT は胞胚期(St.11)とされており、本研究により解析した 5 種類の修飾は MBT 以前に起こっていることになる。哺乳類ではヒストン修飾は MBT とほぼ同時期であるが、メダカ胚ではヒストン修飾の種類によって出現する時間に差が見られ、この結果は、MBT のトリガーとなっているような転写制御とは異なる、他の機能及び生理的な意義を有していると考えられる。また、ヒストン修飾の種類により、胚盤の全ての細胞の核にヒストン修飾が認められる場合と胚盤の一部の細胞に限局してヒストン修飾が認められる場合があり、かつ細部のヒストン修飾の有無のパターンがヒストン修飾の種類または細胞の胚盤における位置（おそらくは細胞の種類）により、発生に伴ってダイナミックに変動することが明らかとな

った。

	H3K9ac	H3K9di	H4K12ac	H3K4tri	H3K4di
1細胞期	×	×	×	?	?
2細胞期	×	×	×	?	?
4細胞期	×	×	×	×	×
8細胞期		×	×	?	?
16細胞期				?	×
32細胞期				?	×
桑実胚期(St.8)					
桑実胚期(St.9)					×
胞胚期(St.10)					×
胞胚期(St.11)					×
胞胚期(St.12)					×
培養細胞					

図1 核発生段階におけるヒストン修飾抗体による染色性の変化

×は染色性が認められず、は胚の全体画像から明確に染色性が認められ、は高倍率による視野においてのみ染色性が確認されることを示す。ジメチル化、トリメチル化、およびアセチル化をdi、tri、acとそれぞれ略す。?は未実験であることを表す。

メダカ胚における培養温度の変化に伴うヒストン修飾の変化

メダカ胚は水域に生育しており、温度の影響を強く受ける。一般に温度を低下させると発生が遅延することが知られている。また、本研究においてヒストン修飾の種類により、抗体染色性が初めて認められる発生段階が異なっていた。従って、胚を培養する温度がメダカ胚におけるヒストン修飾の変化に関与していることが考えられた。そこで、培養する温度を18、23、28に設定し一定時間胚を培養することにより、常温(約23)にて培養した胚と受精後の培養時間はほぼ同一で発生段階が異なる胚を得た。これらの胚におけるヒストンH3K9のアセチル化およびジメチル化に対する抗体染色性の違いを解析した。その結果、ヒストンH3K9のアセチル化は18にて培養した胚は、常温にて培養した胚において初めて認められる8細胞期以前の4細胞期において確認された。また、28にて培養した胚においてヒストンH3K9は強くアセチル化されており、細胞質における染色がほとんど確認されなかった。一方、ヒストンH3K9のジメチル化に関しては、温度変化に依存した抗体染色性の変化は認められなかった。この結果から、メダカ胚では、温度に依存してヒストン修飾が変化する機構と温度変化には非依存的なヒストン修飾に関する機構が存在する可能性が示唆された。