

受精前後における転写調節機構の解析

2008年3月修了

先端生命科学専攻資源生物制御学分野 66529 曾根原弘樹

キーワード リプログラミング ZGA DM-ChIP

指導教員 青木不学 准教授

序論

体を構成する分化した細胞は通常、未分化な状態に戻ることはない。生殖細胞は唯一の例外であり、受精を経て生じた初期胚は全能性を有し、あらゆる種類の細胞へと分化できる。受精前後に起こるこのリプログラミング機構を明らかにするために、本研究では受精前の遺伝子発現抑制と受精後の再活性化に注目した(図1)。マウス卵巣内において成長期卵(growing oocyte: GO)は活発に遺伝子発現を行っているが完全に成長した卵である fully grown oocyte(FGO)になると遺伝子発現を停止する。しかし、この受精前における遺伝子発現抑制状態は受精後に解除され1細胞期後期から胚性遺伝子が発現し始める(zygotic gene activation: ZGA)。本研究では受精前に発現抑制される遺伝子と受精後の再活性化により発現する遺伝子のプロモーター領域を解析することによりリプログラミング機構を明らかにすることを目的とした。まず、受精前に発現抑制される *zp3* のプロモーター領域におけるヒストン修飾を DNA microinjection chromatin immunoprecipitation 法(DM-ChIP 法)により解析した。DM-ChIP 法は DNA コピー数の不足により卵への適用が困難な ChIP 法を DNA のマイクロインジェクションによりコピー数を補うことで可能とする手法である。次に未だ実際にどのような遺伝子によって構成されるか明らかとなっていない ZGA 遺伝子の探索を行った。

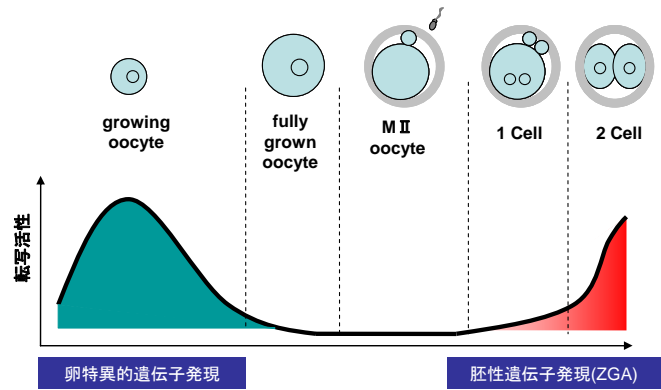


図1 卵成長期から発生過程までの概略とその期間における遺伝子発現

結果と考察

zp3 と *hsp70* のプロモーター領域におけるヒストン修飾の解析

zp3 は卵特異的遺伝子であり GO では盛んに転写されるが、FGO では発現しないことが知られている。一方、*hsp70* は GO でも FGO でも発現は抑制されている。既往の研究により、卵の成長に伴い、本来転写活性を上昇させるヒストン修飾であるアセチル化(Ac)が総体的に増加することが免疫染色法によって明らかとなっているが、遺伝子領域特異的な変化に関しては解明されていない。そこで GO と FGO における *zp3*、*hsp70* プロモーター領域の H4Ac レベルを DM-ChIP 法により解析した。GO と FGO の核内に *zp3* と *hsp70* プロモーターDNA をそれぞれインジェクション後、ChIP を行ったところ、*zp3*、*hsp70* 両プロモーター領域で H4Ac の上昇が観察された(図2)。この結果から、転写が抑制されている FGO のプロモーター領域においても H4Ac が増加していることが示唆された。

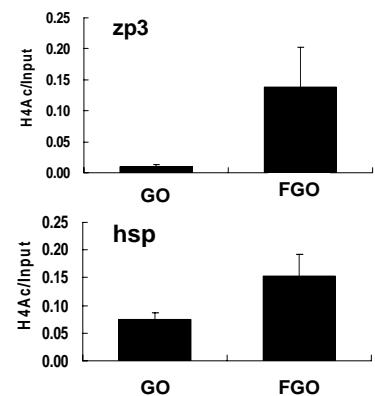


図2 *zp3*、*hsp70* プロモーター領域における H4Ac レベルの解析

zp3 と hsp70 プロモーター領域におけるH4 結合量の解析

近年、発現が抑制された遺伝子のプロモーター領域においてヒストン密度が上昇していることが報告されている。そこで zp3、hsp70 プロモーター領域における H4 結合量を DM-ChIP 法により解析した。その結果、zp3 プロモーター領域では FGO において GO より H4 との結合量が増加していたが、hsp70 プロモーター領域では増加が見られなかった(図 3)。これにより GO で発現していた遺伝子が FGO で抑制される際にプロモーター領域においてヒストン密度が増加し転写因子が結合しにくい状態が作られることが示唆された。

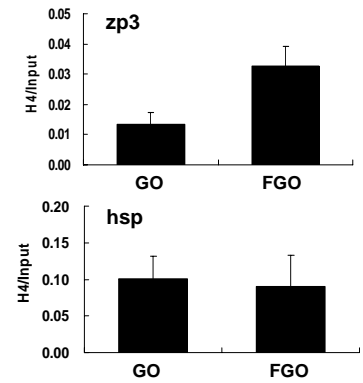


図 3 zp3、hsp70 プロモーター領域における H4 結合量の解析

ZGA 遺伝子の探索

受精後の遺伝子発現再活性化は 1 細胞期後期から開始するが、実際にどのような遺伝子が発現するのかは明らかではない。そこで 1 細胞期後期から発現する ZGA 遺伝子の探索を行った。候補遺伝子に対して RT-PCR を行った結果、urml を新たに ZGA 遺伝子として明らかにした。RNA polymerase II の阻害剤 α -amanitin 存在下で培養したところ MII 卵と同程度まで発現が低下したことから 1 細胞期で検出された mRNA は受精後の発現に由来することが明らかとなった(図 4)。

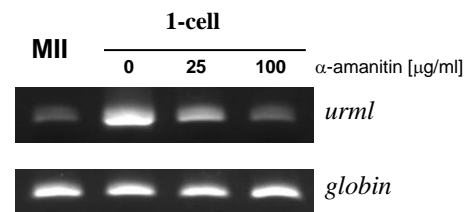


図 4 RNA polymerase II 阻害剤による urml の発現阻害

urml のプロモーター解析

ブラスト解析の結果、urml は 13 番染色体上にバリエントを持つことが分かった。そこで mRNA をシーケンスし転写されているバリエントを決定した。発現していたバリエントを*で示した(図 5)。

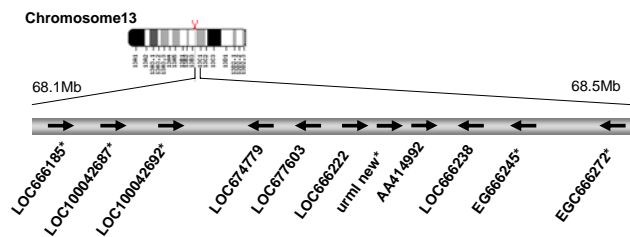


図 5 urml バリエントの配置

また、転写開始点上流の保存された領域を含む 650 bp をプロモーターとして EGFP に結合したプラスミドを作製し、1 細胞期胚の核内にインジェクションしたところ蛍光を呈した(図 6)。この結果から、urml 転写開始点上流領域は受精後の再活性化時にプロモーターとして機能することが示唆された。

まとめ

本研究から、受精前の遺伝子発現抑制時にプロモーター領域においてヒストンアセチル化レベルの上昇が見られるが、同時にヒストン密度が増加することによって転写を抑制する可能性が示された。また受精後に起こる遺伝子発現再活性化時に発現する遺伝子の 1 つを特定し、転写開始点上流 650 bp がプロモーターとなり得ることを示した。今後、受精前後における遺伝子発現パターンの変化とそれらを構成する遺伝子の調節機構に関する知見を深めることができれば、完全に分化した細胞である卵が全能性を有する胚へとリプログラムされるメカニズムを明らかにできると期待される。

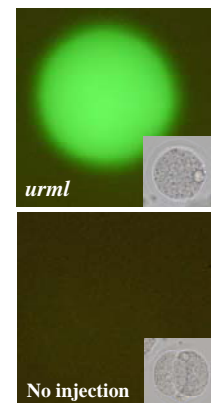


図 6 urml-650 bp のプロモーター活性