

Title	Histone acetylation and subcellular localization of chromosomal protein BRD4 during mouse oocyte meiosis and mitosis
Sub Title	マウス卵の減数分裂時および有糸分裂時におけるヒストンアセチル化ならびに核蛋白BRD4の細胞内局在
Author	長島, 隆
Publisher	慶應医学会
Publication year	2007
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.84, No.2 (2007. 6) ,p.26-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20070602-0026

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Histone acetylation and subcellular localization of chromosomal protein BRD4 during mouse oocyte meiosis and mitosis

(マウス卵の減数分裂時および有糸分裂時におけるヒストンアセチル化ならびに核蛋白BRD4の細胞内局在)

長 島 隆

内容の要旨

アセチル化ヒストンH3/H4 (Ac-H3/H4) は、そのパターンにより結合する転写因子が異なるため、転写因子の認識コードと考えられている。有糸分裂(体細胞分裂)時には、ヒストンの低アセチル化状態により転写因子が染色体から遊離することで、グローバルな転写抑制が起きる。ただし、一部の転写因子や染色体関連蛋白は、分裂時においても染色体上に留まり、細胞の基本的な情報と記憶 (cell memory) を次世代の細胞へ伝達すると考えられている。一方、卵のH3/H4は減数分裂時では全て脱アセチル化されており、卵から全分化能を有する細胞へ転換する際のリプログラミング (cell memoryの消去) に、脱アセチル化が深く関与することを示唆する。しかし、有糸分裂時にヒストンアセチル化依存性に染色体に結合する一部の蛋白が、減数分裂時においてどのような振る舞いをするかについては未だよく知られていない。

染色体結合蛋白のひとつであるプロモドメイン蛋白BRD4は、ヒストンアセチル化依存性にクロマチンに結合するとともに、有糸分裂時においても低アセチル化ヒストンとの結合を通じて染色体上に留まるユニークな核蛋白である。本研究では、マウス卵の減数分裂時におけるヒストンのアセチル化状態とBRD4の振る舞いを調べることで、卵のリプログラミング機構とBRD4の役割の一端を明らかにすることを目的とした。

ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬であるtrichostatin A (TSA) の存在下および非存在下で、NIH3T3細胞に対し蛍光免疫染色を行った。その結果、TSAによりH3/H4は強アセチル化されるとともに、BRD4の有糸分裂染色体への共局在が増強した。さらにドキシサイクリン誘導性にEGFP-BRD4を強発現する細胞株を用いて経時的に観察したところ、EGFP-BRD4は有糸分裂染色体との強い共局在を認めた。次に、卵におけるBRD4の局在を同様に解析したところ、有糸分裂時とは異なり減数分裂時では細胞質に一樣に分布し、TSAによる強アセチル化状態でも変化しなかった。さらにEGFPとBRD4-EGFPのmRNAをGV期卵にmicroinjectionした後に培養することで、卵成熟におけるBRD4の局在を解析した。その結果、BRD4-EGFPは蛍光免疫染色の結果と同様の分布を示したが、強発現に加えTSAによる強アセチル化状態で初めて減数分裂染色体と共局在した。

以上より、減数分裂時におけるBRD4の染色体への局在は、H3/H4のアセチル化状態のみに規定されるものではないと考えられた。強アセチル化状態に加え強発現により初めて減数分裂染色体へ結合したことから、体細胞とは異なり、マウス卵は、染色体関連蛋白を能動的にAc-H3/H4から遊離させるメカニズムを有することが示唆された。

論文審査の要旨

近年、エピジェネティックな転写制御と遺伝子発現調節が注目されているが、そのなかでヒストンのアセチル化と脱アセチル化が重要であることが明らかになってきている。本研究は、アセチル化ヒストンH3/H4と、その結合モジュールを有するBRD4との相互作用をもとに、卵におけるリプログラミングへの関与が示唆されている減数分裂特異的ヒストン脱アセチル化の生物学的意義を、BRD4の細胞内分布と共に検討した。その結果、有糸分裂時とは異なり減数分裂時では、ヒストンのアセチル化状態によらずBRD4は染色体と共局在しなかったため、ヒストンのアセチル化がBRD4の染色体への局在を決定づける唯一のものではないことが判明した。また、ヒストンの強アセチル化に加え、BRD4の過剰発現により初めてBRD4が減数分裂染色体と共局在したことから、未知のBRD4結合因子やBRD4の翻訳後修飾によって、BRD4と減数分裂染色体との相互作用が妨害されている可能性が示唆された。よって、減数分裂時では、ヒストンの脱アセチル化に加え、BRD4などの染色体結合因子を染色体から遊離させるメカニズムが存在し、分化した未受精卵から全能性を有する初期胚へと細胞転換するための遺伝子リプログラミング (cell memoryの消去) に寄与していると考えられた。

審査ではまず、卵と初期胚に関する研究であるのに、なぜ既に報告されている有糸分裂の実験が必要であったのかとの質問があり、ヒストンH3/H4のアセチル化レベルならびにBRD4の細胞内分布を、体細胞と卵および初期胚で比較検討するために必要であったと回答された。次に、Western blotによるEGFP-BRD4を発現する体細胞の確認実験で、EGFP-BRD4とBRD4のバンドが重なって見えるのはなぜかとの質問には、EGFP-BRD4は巨大な蛋白であり、ポリアクリルアミド濃度の薄いゲルを用いた電気泳動でも、BRD4との分離が難しかったと回答された。アセチル化リジン残基を認識する抗体の特異性は確認したのかとの質問には、ペプチド吸収試験によって確認したと回答された。さらに、なぜアセチル化ヒストンとBRD4の多重染色を行わなかったのかとの質問には、同じ動物種由来の抗体であるため、行うことができなかったと回答された。また、蛍光強度の差を客観的に評価できるのかとの質問には、同じ条件下で撮影したため比較検討は可能であると回答された。次に、BRD4は本当に卵の細胞質に存在するのかとの質問には、Western blotにて存在を確認したと回答された。最後に、今後の方向性とこの知見は生殖医学にどのような意味があるのかとの質問には、cell memoryへの関与が示唆されている染色体結合因子の染色体遊離メカニズムを明らかにすることで、全能性獲得と細胞系譜特異的プログラム伝達を担う機構の解明を通じて、ヒト配偶子および胚を扱う生殖補助医療の発展に貢献する可能性があるかと回答された。

以上、本研究は今後解明されるべき課題が残っているものの、減数分裂時における染色体結合因子の染色体遊離に関する新たな知見を示した点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 吉村 泰典
産婦人科学 青木 大輔 小児科学 高橋 孝雄
発生・分化生物学 須田 年生
学術確認担当者:

審査委員長: 青木 大輔

試問日: 平成19年2月15日