

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580129
 研究課題名（和文） ヒトデ初期胚におけるクロマチン機能獲得過程の生物有機化学的研究
 研究課題名（英文） Biochemical and Organo-chemical Aspects on Acquisition of Chromatin Function in Early Starfish Embryos
 研究代表者
 池上 晋 (IKEGAMI SUSUMU)
 長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授
 研究者番号：80011980

研究成果の概要：イトマキヒトデの初期胚においてクロマチンが発生進行とともに変化する過程を生物有機化学的に特徴付けることを試み、以下の結果を得た。胞胚期後期になってクロマチンにトランスグルタミナーゼが出現し、ヒストン H2B の 9 位グルタミン残基とヒストン H4 の 5 位リジン残基とのトランスアミド化反応を触媒し、その結果、 ϵ -(γ -Glutamyl)lysine 架橋したイソペプチドが形成する。この反応は発生進行に不可欠であることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：天然物化学、生理活性物質、細胞機能制御物質、生体分子、蛋白質、発生・分化、クロマチン、トランスグルタミナーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 農学の歴史において、多数の陸上生物種の発生・生理現象が分子のレベルで明らかにされ、その知見を基に特定種属の増殖を制御する化学的手法が開発されてきた。しかし、これまで、海産生物が研究対象にされることは稀であった。地球上の動物種の95%以上が無脊椎動物であり、その多くは沿岸域の海中に棲息している。沿岸生態系を保全することは重

要であるが、そのためには、そこで棲息する動物種の生殖・胚発生の分子機構を明らかにする必要がある。

(2) 研究代表者らは沿岸海域に棲息する無脊椎動物のうちで、とくに生態系を支配する重要種、棘皮動物イトマキヒトデについて、生殖・胚発生過程を生物有機化学的に解析してきた。イトマキヒトデの卵が成熟し、受精して胚となって発

生する過程を生化学的に調べた結果、発生過程で細胞核の主要構造体であるクロマチンが著しいタンパク質修飾を受け、機能が制御されることを観察した。すなわち、卵母細胞のクロマチンは転写活性を有しており、大量の母性 mRNA を生ずるが、卵成熟によって転写活性を失う。減数分裂と受精のあとに続く桑実胚期ではクロマチンの転写レベルは低い、胚が胞胚期中期に到達すると、クロマチンが機能的に改編され、mRNA合成速度が亢進する。この時期に新生される胚性 mRNA の翻訳によってヒト胚細胞核に特徴的な核型 Transglutaminase が出現する。この酵素の作用によってクロマチンの一部のヒストンが二量化される。研究代表者らはイトマキヒトデ原腸胚から核型 Transglutaminase を精製・単離するとともに、その全 cDNA とそれから予想されるアミノ酸配列を決定した。本酵素タンパク質は卵が受精した後、初期胞胚期まで存在しないが、中期胞胚期に細胞核に出現し、後期胞胚期以降、次第に増加する。これに伴い、ヒストンは二量化し、成体では卵巣を除くすべての組織に著量存在するようになる。とくに精子には多く、全ヒストン H2B の約10%が二量体として存在する。ヒストン H2B の9位のグルタミン残基とヒストン H4 の5位のリジン残基との間で、 ϵ -(γ -Glutamyl)lysine 架橋が形成され、ヌクレオソームの隣接するコアが連結することによって精子クロマチンが高度に凝縮し、精子クロマチンが卵内に侵入することを可能にすると考えられる。しかし、胚クロマチンにおけるヒストンH2Bの配列は精子のそれとは異なる上に、精子クロマチンには認められない遺伝子発現を支える構造体である。胚クロマチンに出現する主要なヒストン二量体構造の確定が待たれる状況にある。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、イトマキヒトデの初期胚において機能的なクロマチンが形成される分子過程を生物有機化学的に解明することを目的として研究を進める。核型 Transglutaminase によって初期胚において形成される二量化ヒストンの分子構造を決定する。

(2) 核型 Transglutaminase がヒストン二量化を触媒するのであれば、当該酵

素蛋白質はクロマチンに局在すると予想される。このことを生化学的、免疫組織化学的に明らかにする。

(3) Transglutaminase の酵素活性、あるいはその酵素基質分子の利用を阻害する天然有機化合物を見だし、この阻害剤を初期胚に投与し、ヒストン二量化を阻止することによってもたらされる発生の進行と遺伝子発現状況を解析することによって、二量化ヒストンを含有するクロマチンが発生進行にどのような役割を有するかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) イトマキヒトデ胚に存在する2種類のヒストン H2B は精子ヒストン H2B とは異なった配列であり、未決定であった。胚の2種類の H2B cDNA を得るために、初期胞胚の RNA を鋳型として cDNA をクローニングし、その塩基配列を決定することによって予想アミノ酸配列を得た。次に、胚細胞核から各種高速液体クロマトグラフィーによる精製操作を経てヒストン H2B-H4 二量体を単離した。 *Staphylococcus aureus* V8 プロテアーゼ等、各種のプロテアーゼを用いて消化し、得られるペプチド断片を分離・精製した。これらを、アミノ酸分析計、質量分析計によって分析し、アミノ酸配列と架橋位置を明らかにして、胚ヒストン H2B-H4 二量体の構造解析を進めた。精子の場合と異なり、胚のヒストン二量体には二量化に加えてメチル化、リン酸化、アセチル化などの複雑な修飾が重なった構造を取っている可能性が考えられた。このために、ペプチド断片の質量分析スペクトラムが複雑になる可能性が考えられたが、ポイントとなるイソペプチド構造を含有するペプチド断片の検出に努めた。

(2) イトマキヒトデ中期原腸胚をパラホルムアルデヒド・グルタルアルデヒド含有海水で固定し、オスミウム含有海水で後固定した。水含量を段階的に減少させる含水エタノール処理で脱水した後、エタノール・LR ホワイト混合物中に浸透させ、LR ホワイトに混和してピラミッド型ビームカプセルに入れ、陰圧下、加熱重合して包埋した。これをウルトラマイクロームで超薄切片とし、フォルムバルコートしたニッケルメッシュ 150 にマウントし、牛血清アルブミンでブロックした後、家兎抗核型 Transglutaminase 抗体液に浸し、洗

浄後ヤギ抗家兔 IgG 金コロイド抗体液を加え、洗浄した後、酢酸ウランで染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。

(3) イトマキヒトデ胚において、細胞質 Transglutaminase 活性を阻害せず、核型 Transglutaminase 活性だけを阻害するか、あるいは中期胞胚期から活発になる核型 Transglutaminase 遺伝子の転写活性を選択的に阻害する天然物質の探索を試みた。スクリーニングはヒストン二量体形成を阻害する化合物を放線菌の培養液から探索することによった。多数の放線菌株培養液を準備し、そのイソプロパノール抽出物をイトマキヒトデ胚に与えて発生させた。処理胚のうち、細胞毒性を示して死に至らずサンプルは除き、胚が前期原腸胚期まで発生し、この時期で発生停止をもたらすサンプルを選択した。次に、選択したサンプル原液を段階希釈して、この中に胚を入れ、対照胚が中期原腸胚期に達する時点で、胚の形態を観察した。これによって、広い濃度範囲において胚発生を初期原腸胚期で発生を停止させるサンプルを選別し、2つのサンプルが得られた。これらの菌株を用いて胚発生阻害活性をスクリーニングした結果、初期原腸胚期停止させるサンプルを選択した。

これらを大量培養し、培養液中の活性成分を吸着クロマト、ゲルろ過、HPLC (ODS) 等により単離し、構造を決定した。

4. 研究成果

(1) イトマキヒトデ中期胞胚から RNA を抽出し、RT PCR でヒストン H2B の cDNA を得た。この配列を決定し、アミノ酸配列が予測された。ヒストン H2B は 2 種の亜種分子が存在するがこのうちの一つの全アミノ酸配列が確定された。すなわち、その亜種 H2B 分子は 121 アミノ酸残基から成り、その N 末端配列は、

APKVSQKGGKAGNTK

であり、9 位のグルタミン残基と N 末端が Ac-SGRGKGGKGLGKGGGA

の配列を有するヒストン H4 の 5 位のリジン残基との間で、 ϵ -(γ -Glutamyl)lysine 架橋した二量体であることが明らかになった。

(2) 胚発生においてヒストン二量体形成を生成させる核型 Transglutaminase は蛍光免疫組織化学検査で後期胞胚期以降の

胚細胞核に局在することが明らかにされている。細胞核内での Transglutaminase の局在性を明らかにするには、免疫電子顕微鏡観察が適当である。本酵素蛋白質に対する特異抗体で処理された中期原腸胚細胞超薄片に対する二次抗体金コロイドの分布を調べたところ、特徴的にクロマチンに沿って局在していることが明らかになった。

(3) ヒストン二量体形成を阻害し、胚発生を初期原腸胚期で停止させる核型 Transglutaminase の阻害剤を放線菌の代謝産物中に探索した。しかし、新規核型 Transglutaminase 活性選択的阻害物質を得ることは出来ず、当初の目的を達成出来なかった。それゆえ、胚発生過程で細胞核以外に存在する Transglutaminase が主として桑実胚期において機能することに着目し、既知の非特異的 Transglutaminase 阻害剤を初期胞胚期になってから胚に与え、どのような影響を与えるかを調べた。受精後 8 時間を経過した初期胞胚を Transglutaminase の一般的阻害剤 Methylalutacenoate [H. Kogen *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 122, 1842 (2000)] (1.3 g/ml) で処理すると、ヒストン二量体が形成されないまま初期原腸胚に達し、最終的にこのステージで発生を停止した。これは核型 Transglutaminase 活性が阻害されることによってヒストン二量体が形成されず、これによってもたらされる遺伝子発現の攪乱に起因する発生停止であると推測される。これまでの研究で、原腸胚期での中胚葉分化が阻害され、発生の停止がもたらされる化合物として微生物代謝産物 Trichostatin A が見出されている。これはヒストン・脱アセチル化酵素の選択的阻害剤であり、この処理によって胚では胞胚期以前からヒストン高アセチル化がもたらされる。ヒストン高アセチル化によって胞胚中期に出現する核型 Transglutaminase の基質となるヒストンのリジン残基の遊離 ϵ -アミノ基が失われ、二次的にヒストン二量体形成が阻害される。これらの結果から、ヒストン・リジン残基の高アセチル化によっても核型 Transglutaminase 活性の阻害によってもヒストン二量化が損なわれ、それによって発生停止がもたらされると結論づけられる。

以上の知見を総合すると、生物種の特徴が希薄で未分化なヒトデ胚細胞が、中期胞胚期においてクロマチンの種属特異的な

修飾で細胞分化を開始させ、発生を進行させることが明らかになった。また本研究でそのしくみを追及する為の研究基盤が築けたものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計2件)

池上 晋、西山 了、加藤 宏一、山崎明子、イトマキヒトデ胚に存在するクロマチン会合性トランスグルタミナーゼの機能解析、日本動物学会第79回大会、静岡市、2009年9月19日

西山 了、加藤 宏一、池上 晋、山崎明子、イトマキヒトデ胚におけるヒストン二量化触媒トランスグルタミナーゼの局在性、日本動物学会第80回大会、福岡市、2008年9月6日

6. 研究組織

(1)研究代表者

池上 晋 (IKEGAMI SUSUMU)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：80011980

(2)研究分担者

藤井 貴弘 (FUJII TAKAHIRO)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・助教

(繰越時2009年は研究分担者を外れた)

研究者番号：60367901

(3)連携研究者