

## 別紙 4

報告番号	※	甲	第	号
------	---	---	---	---

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 アフリカツメガエル胞胚の核システムを支える分子基盤の研究  
氏 名 小田 春佳

## 論 文 内 容 の 要 旨

動物の受精後まもない胚の細胞（胞胚細胞）は、機能、構造の両面から分化後の体細胞とは異なる特徴を有する。アフリカツメガエル（以下、ツメガエル）胚では、受精後しばらくの間 S 期と M 期からなる短い細胞分裂（約 30 分に一回）が繰り返され、活発に細胞分裂（卵割）が行なわれる。胞胚期の間、細胞核は未分化な状態を維持しており、胚の遺伝子の転写は抑制されているが、速い細胞周期に対応してクロマチンの複製活性は非常に高い。原腸胚期に入ると、細胞周期が徐々に長くなり、細胞分裂の同調性は失われ、胚の遺伝子の転写が開始されて細胞分化が進行する。このような機能的特質に加え、胞胚細胞の核は、短い細胞周期にダイナミックな構造的調節を受ける特徴がある。胞胚細胞では核形成とともに DNA 複製が開始し、核は速やかに大きく成長して約 15 分でゲノム複製を完了して核膜が崩壊し、分裂期染色体が形成される。このような調節を受ける胞胚細胞の核は、核の構造的分子基盤が原腸胚以降の細胞と大きくことなると考えられる。近年、ツメガエルの未成熟卵の巨大な核（卵核胞）に蓄積する F-アクチンが核の構造維持に寄与することが示され、核骨格としての F-アクチンの機能が注目されている。しかしながら、通常の体細胞では核に F-アクチンが蓄積する報告はなく、胚発生における核アクチンについても不明である。そこで本研究では、胞胚細胞の核に F-アクチンが蓄積するのかについて検討した。アクチン結合タンパク質（UtrCH および LifeAct）に EGFP を付加した mRNA をツメガエル受精卵に顕微注射し、胞胚および原腸胚まで発生させて核を観察したところ、胞胚期の核内に F-アクチンが蓄積することが明らかとなった。さらに、前期・中期・後期胞胚および原腸胚から核を単離し解析した結果、胞胚期の間は、核に F-アクチンが一定の高い密

度で存在していることが示された。また、核 F-アクチンは核膜直下に特に高密度で存在した (核ラミナアクチン)。核質の F-アクチンは、核ラミナアクチンより密度が低く、核質内にほぼ均一に分布していた (核質アクチン)。一方、原腸胚期に入ると、核 F-アクチンはほぼ消失した。このことから、核に高密度の F-アクチンが蓄積することは、胞胚の特有の核構造の特徴であることが明らかになった。続いて、胞胚の核 F-アクチンの役割を解析するため、アクチン重合阻害剤を用いずに卵抽出液の調製法を検討し、核および F-アクチンの同時解析が可能な卵無細胞系 (IFE: inhibitor-free extract) を確立した。IFE で形成された核では、胞胚同様に F-アクチンが蓄積し、核ラミナアクチンと核質アクチンも胞胚と同様の分布を示し、IFE では胞胚の核がより正確に再現されることが示された (胞胚型核)。IFE でアクチンを脱重合させるとクロマチンが核膜から乖離し、胞胚から単離した核も IFE で形成された核と同様に両者が乖離した。このことから、胞胚型核ではクロマチン-核膜結合は F-アクチンに依存して行われることが示された。また、卵無細胞系で形成させた核を用いる実験により、核 F-アクチンは核の物理的強度を向上させることが判明した。さらに、卵無細胞系で形成された核を分裂期に移行させる手法により、分裂期紡錘体を形成させたところ、分裂期の細胞質 F-アクチンのみならず、核 F-アクチンもまた、分裂中期における染色体の紡錘体赤道面への整列を促進することが示された。以上により、核 F-アクチンはクロマチン-核膜結合を促進し、核の構造を支え、分裂期の染色体整列の促進に関わるなど、胞胚の核構造と機能に重要な役割を果たすことが明らかになった。

興味深いことに、原腸胚期には核 F-アクチンがほぼ消失することが判明したが、クロマチンは核膜から乖離しない。このことから、原腸胚期以降の核では F-アクチン以外の因子によってクロマチン-核膜結合が維持されると予想された。そこで次に、F-アクチンが消失した核のクロマチン-核膜結合の維持に関わる分子を探索した。ツメガエルの胞胚細胞では、核内膜の主要な構成分子である核内膜タンパク質の組成が、分化後の体細胞と大きく異なり、分化後の体細胞に発現する核内膜タンパク質の発現レベルが低いことがこれまでに明らかとなっている。そこで、各々の核内膜タンパク質を、アクチン重合を阻害した卵抽出液 (ICE: inhibitor-containing extract) に発現させ、クロマチン-核膜結合への影響を検討した。その結果、核内膜タンパク質の一つである LBR (lamin B receptor) が、クロマチン-核膜結合の維持に働くことが明らかとなった。クロマチン-核膜結合には、LBR の核質側内部配列 (N1、N2、N3) のうち N2 と N3 が関与すること、これら配列にヒストンおよび HP1 (heterochromatin protein 1) が結合することを明らかにした。胞胚細胞のクロマチン-核膜結合に LBR が用いられない生理的意味を探るため、LBR の全長 (WT) と、クロマチン核

膜結合を維持しない変異体 ( $\Delta N2-3$ ) を卵抽出液に発現させ、胞胚型の核膜構造に及ぼす影響を調べた。その結果、胞胚型の核膜上で LBR はクロマチンの近傍に凝集し、初期胚型ラミン L3 で形成される核ラミナ構造に乱れを生じさせることが判明した。このことから、胞胚では F-アクチンによってクロマチンと核膜の結合が維持されることが胞胚の核の機能に重要であることが示唆された。

本研究により、ツメガエル胞胚における核 F-アクチンの存在が初めて明らかにされた。さらに、胞胚では核 F-アクチン依存的にクロマチン-核膜結合が維持されることが示された。また、原腸胚以降は LBR によってクロマチンが核膜に結合すること、胚発生過程でクロマチン-核膜結合の分子機構が転換することが示唆された。遺伝子発現制御などの重要な“場”の構築のために重要な、クロマチン-核膜結合機構が転換することは、胞胚と原腸胚以降で大きく異なる転写状態の制御にも関与する可能性が考えられ、ツメガエルのみならず多くの動物の胚発生で重要な転換点である、転写活性化の分子メカニズム解明の糸口になると期待される。