初期胚におけるヒストン修飾に関する研究

Studies on the Histone Modification during Early Embryogenesis

（日本農芸化学会推薦）

代表研究者　長浜バイオ大学　池上　晋　Nagahama Institute of Bio-Science and Technology　Susumu Ikegami
協同研究者　長浜バイオ大学　太田伸二　Nagahama Institute of Bio-Science and Technology　Shinji Ohta

A histone heterodimer designated embryonic histone d(H2B-H4), which contains an ε-(γ-glutamyl)lysine cross-link between the 9th glutamine residue of histone H2B and the 5th lysine residue of histone H4 is formed during starfish (*Asterina pectinifera*) embryogenesis. Immunoblot analysis of nuclear preparations using a monoclonal antibody against embryonic histone d(H2B-H4) as a probe showed that embryonic histone d(H2B-H4) begins to appear in the midblastula stage when the rate of cell proliferation decreases, and its amount gradually increases up to the mid-gastrula stage. The activity of nuclear transglutaminase begins to be expressed at the midblastula stage and increases thereafter, which parallels the increase in histone embryonic d(H2B-H4). The sequence of the transglutaminase has been determined and contains nuclear localization signals which are not found in amino acid sequences of the other known trnaslutaminases. The methyl ester of altacenoic acid, an anti-transglutaminase substance from the bacterium *Eupenicillium alutaceum* inhibited not only the enzymatic activity of nuclear transglutaminase but also progression of embryonic development to arrest at the early gastrula stage. These results implicate that the transglutaminase present specifically in the nucleus catalyzes histone dimerization which is essential for progression of starfish embryonic development.

研究目的

真核生物の細胞内では DNA はタンパク質と結合し、クロマチンを形成する。クロマチン構成タンパク質の化学変化によってクロマチンの高次構造が変化する。クロマチンの高次構造変化がクロマチンの機能に変化をもたらし、細胞増殖、細胞分化を制御すると考えられる。

後生動物（多細胞動物）ではどの動物種でも成体のかたちは多彩だが、初期胚の時期には種に固有の形態の特徴が見られない。胚発生の後期になると胚のかたちはめざましく変化し、種に特有の体のパターンが現れ、次第にそれを展開させてゆく。成体のなかで無限増殖できる細胞は生殖細胞の他にはない。卵と精子が受精し、細胞数を増やしてゆく初期発生の間に、胚のどこか定められた場所で細胞の分化の方向が決定され、無限増殖型から有限増殖型へと変化する。個体のなかで卵と精子だけが 40 億年近い生命の歴史を宿す超時空的存在であり続けることができる。受精卵が卵割を繰り返し、分化した形質を賦与された体細胞になるまでは未分化である。生物種の特徴が希薄で始原生命の色濃い未分化な胚細胞が種に特有の分子を含有する分化した体細胞へと変換する過程において、棘皮動物イトマキヒトデ（*Asterina pectinifera*）ではこの種属特有のクロマチン修飾、すなわちヒストン二量化が生ずる。ヒストン二量化はトランスグルタミナーゼによる架橋反応が生細胞内で生じ得ることを示した初めての事例であり、これまで他の生物種属でヒストン二量化反応を実証した例はない。ヒストン二量体は、その構造から推測すると、染色体複製を妨げ、細胞分裂の停止をもたらす、畢竟、個体の死を具現する分子であると考えられる。

本研究は，中期胞胚期におけるヒストン架橋二量化が中期原腸胚期における発生停止の原因となるかどうかを実証することを主な目的として研究を進めた。

研究経過

1．精子クロマチンにおけるヒストン二量化

多細胞動物の精子は卵に進入するために染色体はコンパクトに凝縮している。精子が染色体を高度に凝縮するしくみはさまざまであるが、イトマキヒトデ精子の染色体では、102 から 135 アミノ酸残基から成る小さなタンパク質であるヒストン H2A、

H2B、H3、H4 が 2 分子ずつ、合計 8 分子会合して生じたヒストン８量体コアに 145 塩基対の DNA が 2 回巻き付いてヌクレオソームを形成する。ヒストン H1 はコアヒストンより大きく、約 220 アミノ酸残基から成る。ヒストン H1 分子中央の球状部がヌクレオソームの特定の部位に結合すると、伸びた腕が隣のヌクレオソームのコアヒストンの別の部位と接触して、ヌクレオソーム同士をつなぎ合わせ、規則的な繰り返し構造を形成する。その結果、ヌクレオソームを密に並べ、クロマチン繊維が生じる。

われわれはコアヒストン画分に通常のコアヒストンの２倍程度の大きさの分子量をもつタンパク質群を見いだした。その一つ、p28 の構造解析を行ったところ、ヒストン H2B の 9 番目の Gln 残基とヒストン H4 の 5 番目、あるいは 12 番目の Lys 残基がε-(γ-Glu)Lys 架橋を形成し、二量体化していることが明らかになった。そこで、この分子をヒストン d(H2B-H4) と再命名した。このようなヒストン二量体分子は他の生物では報告されておらず、この架橋はヒストン分子における新しい修飾様式であると言える。

精子が卵と融合する前に先体反応が行われる必要がある。精子先体反応は，先体反応誘起物質を含む卵のジェリー層に精子が接触することにより精子原形質膜のイオン透過性が変化し、細胞内の pH と Ca^{2+}濃度が上昇することによって誘導される。

天野ら(1992) はイトマキヒトデの成熟卵で精子を処理し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったところ、先体反応を起こした精子のヒストン H1 と H2B が減少し、見かけの分子量 28 キロダルトン付近のバンドが増加することを報告した。またカルシウムイオノホア A23187 で処理し、細胞内への Ca^{2+}の流入を促した場合も同様の結果が得られた。

先体反応に随伴してヒストン二量化反応が亢進する可能性を検討するために、天野ら(1992)の方法に従って精子懸濁液に卵ジェリーを加え、20 ℃で 60 分間反応させた。精子を集め、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。CBB 染色では、ヒストン H1 とコアヒストンの減少が見られ、見かけの分子量 28 キロダルトン付近のバンドが増加した。一次抗体に抗ヒストン d(H2B-H4)モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析では、見かけの分子量 28 キロダルトン付近のバンドが反応し、ヒストン d(H2B-H4)の増加が認められた。また、精子懸濁液に Ca^{2+}が最終濃度 50 mM になるように加え、さらに、A23187 を最終濃度が 1.25 μM になるように加え、20 ℃で 60 分間反応させた後、精子を集めた。これを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、CBB 染色と一次抗体に抗ヒストン d(H2B-H4)モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、卵ジェリー画分を用いた場合と同様にヒストン d(H2B-H4)の増加が確認された。このように、精子核内の Ca^{2+}濃度を上昇させることでヒストン d(H2B-H4)が増加したことから、ヒストン d(H2B-H4)は Ca^{2+}依存的に増加したことが示唆された。

２．トランスグルタミナーゼ活性阻害剤によるヒストン二量化阻害を介した発生停止

ヒストン d(H2B-H4)は卵、受精卵、桑実胚、初期胞胚には存在せず、中期胞胚期から出現し、その後、含有量が増加する。成体では卵巣を除くすべての組織に存在するが、精巣ならびに精子に最も存在量が多いことが認められた。

われわれはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A の存在下でイトマキヒトデ受精卵を飼育すると、胚は正常に発生し、原腸胚期に至るが、中胚葉分化が阻害され、発生は中期原腸胚期で停止することを見いだした。トリコスタチン A が作用する時期は胞胚期中後期の短時間に限られており、受精からこれより前まで処理して洗い去っても、この時期より後から処理を始めても発生の停止は起こらない。トリコスタチン A は 1 ng/ml の低濃度で発生を原腸胚期前期で停止させるが、これより１万倍高い濃度で処理しても発生停止の時期は変わらない。それ故、作用は高度に選択的である。ヒストン脱アセチル化酵素阻害によってヒストン H4 の N末端領域のリジン残基の ε-アミノ基がアセチル化されるが、これは中期胞胚期より前から生じる事象である。したがって、中期胞胚期にはヒストンH4 のアセチル化によって阻害される生体反応の存在が示唆された。
われわれは、中期胞胚期に合成され、かつ、トリコスタチン A 処理で消失するタンパク質を追求するために、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。CBB 染色では、見かけの分子量 28 キロダルトン付近のバンドがこのような変化を示すことが認められた。一次抗体に抗精子ヒストン d(H2B-H4)モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析においては、見かけの分子量 28 キロダルトン付近のバンドが反応し、ヒストン d(H2B-H4)の増加とトリコスタチン A 処理での消失が認められた。この抗精子ヒストン d(H2B-H4)モノクローナル抗体に反応する２つの 28 キロダルトンタンパク質は、ヒストン H4 と２つの胚ヒストン H2B サブタイプ p15 と p16 のいずれかとの二量体であった。ヒストン H4 と p15 の二量体の構造を決定したところ、図１に示すとおり、ε-(γ-Glu)Lys 架橋を有していた。この架橋はトランスグルタミナーゼによって形成されると考えられる。トランスグルタミナーゼは、ペプチド鎖内にある Gln 残基のγ-カルボキシアミド基をアシル供与体とし、1 級アミンやペプチ

図1
6.5cm
中島

ド鎖内のLys残基のε-アミノ基を受容体とするアシル基転移反応をCa^{2+}依存的に触媒する酵素である。

ヒストン H4 のN末端領域のリジン 残基の ε-アミノ基がアセチル化されると、この基がトランスグルタミナーゼのアミノ基供与体として機能できず、ヒストン d(H2B-H4)形成が阻害され，これによって発生停止がもたらされると考えられる。ヒストン d(H2B-H4)の合成基質がクロマチンに存在するヒストン・アセチルトランスフェラーゼによって奪われる事象は、ヒストン分子間架橋反応の場がクロマチンであることを示唆する。予想どおり、イトマキヒトデ胚には細胞核に特異的に存在するトランスグルタミナーゼが見いだされた。そのcDNA配列から導かれた予想アミノ酸配列（図２）には核移行シグナルが存在した。この核型トランスグルタミナーゼは核内に局在し、その発現と酵素活性は中期胞胚期から現れはじめ、中期原腸胚で最大となることが明らかになった。この変化は二量化ヒストンの存在量と呼応している。さらに、核型トランスグルタミナーゼが原腸胚クロマチン画分に強固に会合することが認められた。これらの結果から、核型トランスグルタミナーゼが核内でヒストンを基質として二量体の形成を触媒することが示唆された。核型トランスグルタミナーゼが二量化ヒストン形成を触媒することを証明するために、細胞膜を通過し、核型トランスグルタミナーゼを特異的に阻害する物質を胚に与えて発生させ、この胚における二量化ヒストン生成の有無を明らかにすることを目的として実験を行った。

図2
6.5cm
中間

荻田ら(2001) によって放線菌 *Eupenicillium alutaceum* からトランスグルタミナーゼ活性を阻害する物質としてアルタセン酸 B が単離され、構造決定された。これはトランスグルタミナーゼの活性中心 Cys のチオール基と共有結合を形成することで酵素を失活させ、阻害すると推測されている。

アルタセン酸 B および末端カルボキシル基をメチルエステル化したメチルエステル体の核型トランスグルタミナーゼの酵素活性への影響を検証した。活性測定はジメチルカゼインへの[^{3}H]プトレッシンの取り込み量を測定することにより行った。その結果、アルタセン酸 B とメチルエステル体のいずれも核型トランスグルタミナーゼの酵素活性阻害効果を示した。メチルエステル体は 3.7 ng/ml で酵素活性を 50%阻害した。なお，細胞質型トランスグルタミナーゼであるモルモット肝トランスグルタミナーゼに対するIC_{50}は0.023 μg/ml と報告されているので、ほぼ同程度の阻害効果を示すことが判明した。

次に、アルタセン酸 B とメチルエステル体をイトマキヒトデ胚に与え、発生阻害活性を検定した。受精後 8 時間経過した胞胚を、さまざまな濃度範囲で処理し、受精後 24 時間経過したあと、胚の形態を観察した。アルタセン酸 B 処理胚はどの濃度でも、間充織細胞の分化が認められる中期原腸胚に達していた。したがって本化合物は胚発生に影響を及ぼさないことが確定した。メチルエステル体は 0.6～2.5 μg/ml の濃度範囲では初期原腸胚期で発生が停止した。アルタセン酸 B は膜透過性をもたないために胚に作用しなかったが，メチルエステル体は胚細胞内に入り，トランスグルタミナーゼ酵素活性を阻害することによって胚発生、とくに胚葉分化の過程を阻害したものと考えられる。

さらに、発生停止胚でのヒストン d(H2B-H4)形成の有無を検証するために、0.6 または 1.25 μg/ml となるようにアルタセン酸 B メチルエステルを海水中に溶解し、この中に胞胚を加え、20℃で培養した。受精後 24 時間経過した胚を回収し、クロマチンを単離した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、抗ヒストン d(H2B-H4)モノクローナル抗体を用いてイムノブロット解析した。その結果、いずれの濃度で処理した胚でもヒストン d(H2B-H4)のバンドが消失していた。 このとき胚は初期原腸胚期で遊泳を続けていたので、胚の細胞機能は正常であると思われる。

ヒストンデアセチラーゼ選択的阻害剤トリコスタチン A 処理による発生停止胚において、核型トランスグルタミナーゼが影響を受けている可能性を検証するためにトリコスタチン A 処理胚からクロマチンを単離し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動した後，抗ヒストン d(H2B-H4)モノクローナル抗体とアセチル化ヒストン H4 抗体を用いてイムノブロット解析を行った。その結果、トリコスタチン A 処理胚においてヒストン H4 は強くアセチル化を受けており、ヒストン d(H2B-H4)のバンドは正常胚に比べ弱くなっていた。以上のことから、トリコスタチン A 処理は核型トランスグルタミナーゼの発現に影響せず、ヒストン H4 を高アセチル化し、ヒストン二量化を妨げると結論された。次に、トリコスタチン A のトランスグルタミナーゼ活性への影響を検討した。ダンシルカダベリンのジメチルカゼインへの取り込みによる酵素活性測定法を用いて、0.01～10 μg/ml トリコスタチン A 存在下での核型トランスグルタミナーゼの酵素活性を測定した。その結果、いずれの濃度でも阻害活性は見られなかった。これらの結果から、トリコスタチン A はヒストン d(H2B-H4)形成を阻害したが、これはトリコスタチン A が核型トランスグルタミナーゼの酵素活性を阻害することによってもたらされたのではなく、ヒストンデアセチラーゼの阻害によってヒストン H4 の Lys 残基の ε-アミノ基が高度にアセチル化され、その結果、ヒストン H4 がトランスグルタミナーゼの基質となることができず、二量体形成が阻害されたと結論された。

考察

本研究で、卵ジェリーまたはカルシウムイオノホア A23187 で、精子先体反応を誘導するとヒストン d(H2B-H4)が増加することが認められた。精子細胞内への Ca^{2+}の流入でヒストン d(H2B-H4)が増加したことから、精子にトランスグルタミナーゼ活性の存在が示唆された。そこでトランスグルタミナーゼの阻害剤であるアルタセン酸 B メチルエステルを用いて、先体反応を誘導した精子におけるヒストン d(H2B-H4)の増加が阻害されるかどうかを検討した。その結果、阻害剤の濃度依存的にヒストン d(H2B-H4)の増加が阻害されたことから、ヒストン d(H2B-H4)形成にトランスグルタミナーゼが関与することが示唆された。実際に精子にトランスグルタミナーゼが存在するかどうか調べるために、イトマキヒトデ胚の核から同定されているトランスグルタミナーゼを特異的に認識する抗体を用いてウエスタンブロット解析を行い、精子核においても胚核の移動度と同じ位置に核型トランスグルタミナーゼ特異抗体に反応するバンドが確認された。

以上の結果を総合すると，精子が卵ジェリーに接触し、先体反応を起こすと、精子核内の Ca^{2+}濃度が上昇し、精子核内のトランスグルタミナーゼが活性化され、ヒストン d(H2B-H4)が増加すると結論される。

精子は一倍体ゲノムを，胚発生の母体となる卵の中に導入する役割をもつ。したがって、精子は卵に辿りつけるように遊泳能力をもち、サイズが小さく、染色体はコンパクトに凝縮している。多様な生物種の精子がさまざまな方法で細胞核を高度に凝縮させているが、イトマキヒトデの精子では，ヒストン二量化によってクロマチンをコンパクトにまとめあげていると推定される。

精子が卵に侵入すると精子ヒストンは除かれ，ゲノムは卵ゲノムと合体し，クロマチン・リモデリングが進行する。受精後の盛んな卵割で細胞数が増加する。DNA 複製を伴う細胞分裂が繰り返され、細胞数が 256 となった時点で個々の割球が隣接する割球と連結し、中空のボール、すなわち胞胚となる。胞胚形成では核、 細胞質、 細胞膜がそれぞれ勝手にふるまうことが許されなくなり、それらは相互に依存し合い、一個の細胞としての統一性が生ずると考えられる。また、これと歩調を合わせて、胚細胞が他から分離されて独立に分裂する能力を失い、個体としての全体性が生じ、個体としての最初の形態形成を始めることになる。

胞胚期に入ると少数の細胞の細胞周期にG_1期が出現し、それまでの卵割の同調性が崩れてゆく。その後、次第にG_1期にある細胞数が多くなり、転写速度は漸増する。受精後 10 時間頃になると胚は胞胚期中期に達する。それまでの核は大きく、核小体が存在しないが、この時期を過ぎると核はコンパクトになり、核小体が出現する。胞胚期中期では細胞増殖速度の激減にともなって細胞分化が始まる。核に核型トランスグルタミナーゼが出現し、ヒストン二量体の形成が開始する。ヒストン二量体形成がクロマチンをコンパクトにする役割を果たし、これが細胞増殖阻害と細胞分化の基盤を形成すると考えられる。

研究発表

口頭発表

1. 池上 晋；「ヒトデの初期発生—体細胞形成から生態系に加入するまで」、第 74 回日本動物学会大会関連集会（函館、2003）
2. 池上 晋、太田恵美、太田伸二；「海綿由来ヒトデ卵母細胞アクチン・フィラメント破壊物質の構造と作用」、日本農芸化学会大会（東広島、2004）

誌上発表

1. Nunomura, K., Kawakami, S., Shimizu, T., Hara, T., Nakamura, K., Terakawa, Y., Yamasaki, A., and Ikegami, S.; *In vivo* cross-linking of nucleosomal histones catalyzed by nuclear transglutaminase and its induction by egg jelly triggering the acrosome reaction. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 3750-3759 (2003).
2. Uy, M. M., Ohta, S., Yanai, M., Ohta, E., Hirata, T., and Ikegami, S.; Exguamide, a new spirocyclic sesquiterpene from the marine sponge *Geodia exigua* that inhibits cell fate specification during sea urchin embryogenesis. *Bioorg.. & Medicinal Chem.*, **12**, 3037-3039 (2003).
3. Ohta, E., Okada, H., Ohta, S., Kobayashi, M., Kitagawa, I., Horiike, S., Takahashi, T., Hosoya, H.,

Yamamoto, K., and Ikegami, S.; Malformation of immature starfish oocytes by theonellapeptolide Ie, a tridecapeptide lactone from a marine sponge *Petrosia* species, through disturbance of cortical F-actin distribution. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **67,** 1908-1915 (2003).

4. Yanai, M., Ohta, S., Ohta, E., Hirata, T., and Ikegami, S.; A new α-, β–, γ–, δ-unsaturated carboxylic acid and three new cyclic peroxides from the marine sponge, *Monotria japonica*, which selectively lyse starfish oocyte without affecting nuclear morphology. *Bioorg. & Medicinal Chem.*, **11,** 1715-1721 (2003).

5. Uy, M. M., Ohta, S., Yanai, M., Ohta, E., Hirata, T., and Ikegami, S.; New spirocyclic sesquiterpenes from the marine sponge *Geodia exigua. Tetrahedron*, **59,** 731-736 (2003).

6. Kubota, N. K., Ohta, E., Ohta, S., Koizumi, F., Suzuki, M., Ichimura, M., and Ikegami, S.; Piericidins C5 and C6: New 4-pyridinol compounds produced by *Streptomyces* sp. and *Nocardioides* sp. *Bioorg. & Medicinal Chem.*, **11,** 4569-4575 (2003)

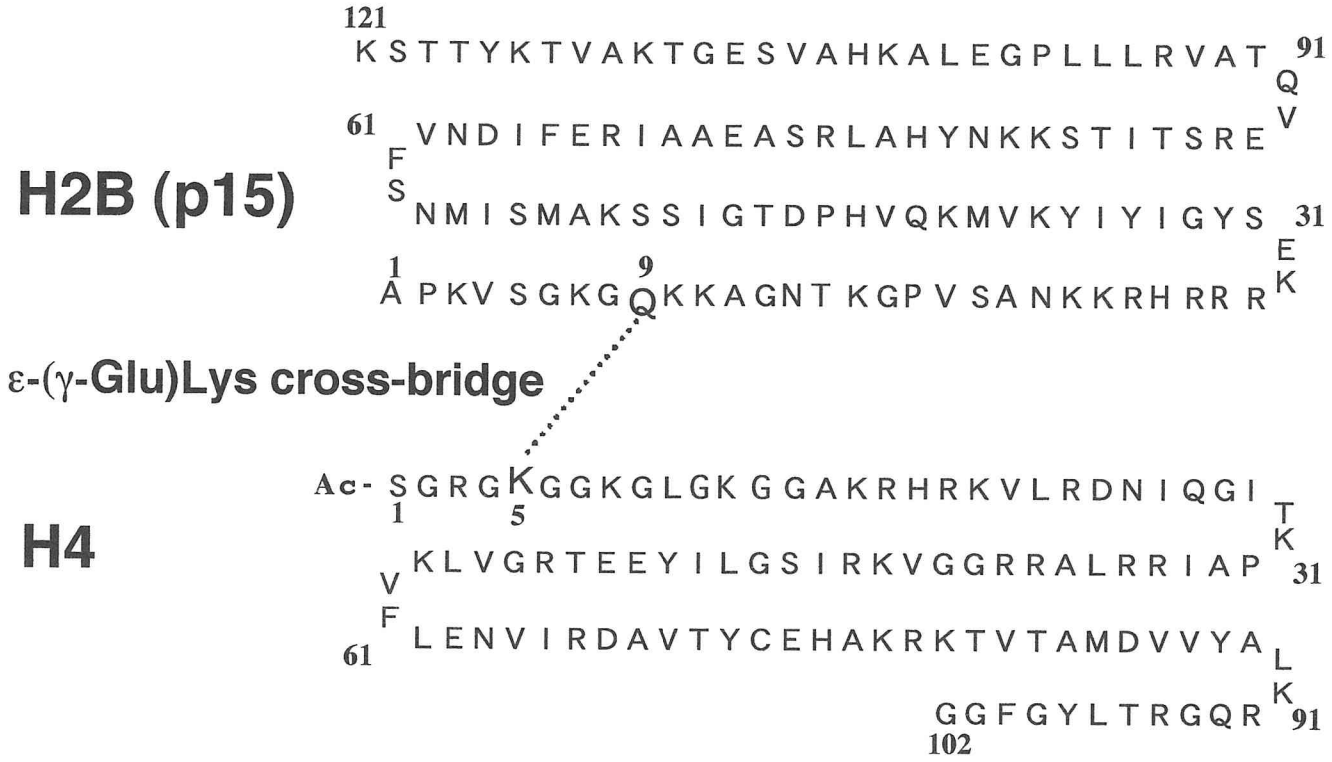
7. 池上　晋；海産無脊椎動物の初期発生に関する化学生物学的研究. *日本農芸化学会誌*, 77, 100-113 (2003).

8. Kubota, N. K., Ohta, S., Ohta, E., Koizumi, F., Suzuki, M., Ichimura, M., Rahayu, E. S., and Ikegami, S.; Two new analogues of the cytotoxic substance BE-52211 from *Streptomyces* sp. *J. Natural Prod.*, **67,** 85-87 (2004).

図の説明

Fig. 1. The structure of embryonic histone d(H2B-H4). The amino acid residues are expressed in single-letter code.

Fig. 2. The putative amino acid sequence (single-letter code) of embryonic nuclear transglutaminase deduced from the cDNA sequence. The underlined amino acid sequences are putative nuclear translocation signals which are not found in amino acid sequences of the other known transglutaminases.


121
K S T T Y K T V A K T G E S V A H K A L E G P L L L R V A T
91
Q
V
61
V N D I F E R I A A E A S R L A H Y N K K S T I T S R E
F
S
H2B (p15)
N M I S M A K S S I G T D P H V Q K M V K Y I Y I G Y S
31
E
K
1
9
A P K V S G K G Q K K A G N T K G P V S A N K K R H R R R
ε-(γ-Glu)Lys cross-bridge
Ac- S G R G K G G K G L G K G G A K R H R K V L R D N I Q G I
1
5
T
K
H4
K L V G R T E E Y I L G S I R K V G G R R A L R R I A P
31
V
F
61
L E N V I R D A V T Y C E H A K R K T V T A M D V V Y A
L
K
G G F G Y L T R G Q R
91
102

```
  1  MVRRSTRTRSTPTRFGYTDRFEPYARKPKRETTRTEGRRYVPATPLTLPTLKEK
 51  KTQLKVVSVDLCVERNQQEHKTSKYKVDNLVLRRGQPFHLNVKFDRDFKPSTDE
101  LVLELRMGSRANVTKGTRCVAPVVTSAPDHDDWGIKVESAKGANVTLKVFCSSE
151  ALIGYYNLYILTMSGGDEYEYESPKELIMLFNAWCKDDDVYMADEVKRQEYVMG
201  EVSLYFYGSKYRIGSSPWNYGQFEKMSLDCALYLLQKSGMPDSSRKSPIQVSRV
251  LSALVNAQDDDGVLVGRWDGEYDDGISPTTWTGSIAILSQYMKTRESVKYGQCW
301  VFGSLLTGLCRSLGLPTRTITNFASAHDTDGNLTLDYHYDENSEPLDDYDEDSI
351  WNFHVWNDCWMARPDLEEGYGGWQAVDATPQETSNGVYCMGPTSLRAIKQGHVY
401  MQYDTKFAFAEVNAEKVYWKVFTKSRKAPEVIDIDSDDVGCKISTKAVGKFERE
451  DITEQYKYKEGTELERIAVREASRHVRKAKRILKNLARDVDFDVDMAEEFPIGK
501  DIKFTITMVNKSQQTRNVFLGVTGSTVYYTGVKKAKVSSYNGTLPLKAKETRVI
551  PVTVPASDYLPQLTDYAGVTFFIMASVKETKQPFSRQYDAVLDKPDLEVKTEGP
601  IVRGKPFTAIVSLTNPLPYPLTDCSLLMEGSIIEGAKRVKAPHVPVNGKMAQRV
651  QLTPKTAGSCDLIVSFSSPQLSGVKAHVTLNVKSA
```