

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580416

研究課題名(和文) マウス初期発生におけるチューブリンのアセチル化制御機構と機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of tubulin acetylation during mouse preimplantation development

研究代表者

岸上 哲士 (KISHIGAMI, Satoshi)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：10291064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、チューブリンを含む非ヒストンタンパク質のアセチル化について初期発生における役割や制御機構を明らかにすることを目指した。本研究では、まず卵子老化に伴うチューブリンのアセチル化レベルの経時変化を明らかにするとともに、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤を用いて卵子老化において特にクラスIIIのHDACの重要性を示唆した。また卵子の活性化に伴うヒストンおよび非ヒストンタンパク質の高アセチル化への誘導現象を明らかにした。このように本研究を通じて、特に1細胞期におけるアセチル化制御の重要性について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Histone Deacetylases (HDACs) are known to play important roles during preimplantation development. However, the roles of acetylation of non-histone proteins mouse embryos still remains poorly understood. In this study, we have focused on acetylation of alpha-tubulin and HDACs in terms of oocyte quality during one-cell stage. First, we found that treatment with NAM, nicotinamide, an inhibitor for Class III HDACs inhibited cellular fragmentation and spindle elongation after postovulatory in vitro aging. Also, the alpha-tubulin increased acetylation during aging, suggesting not only histone but non-histone protein acetylation also increases with oocyte aging. Further, once an oocyte has been activated, histone and nonhistone proteins are hyperacetylated partly due to a reduction of HDAC activity. TSA treatment of zygotes enhances their acetylation. Thus, we provide the evidence that protein acetylation play important roles for oocyte quality which affect subsequent embryonic development.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：発生 アセチル化

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のアセチル化は、リン酸化とならび翻訳後修飾の一つであり、タンパク質の機能制御に重要な役割を果たしている。特に、ヒストンのアセチル化はエピジェネティクスの根幹をなすヒストン化学修飾の一つとして、遺伝子の発現制御に不可欠な役割を担っていることが知られている。標的タンパク質のアセチル化は、それぞれ特異的なヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) およびヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) により特定のリシン残基がアセチル化および脱アセチル化されることで可逆的に制御されている。HDAC の阻害剤の一つであるトリコスタチン A (TSA) で細胞を処理すると、細胞内のタンパク質の高アセチル化を誘導する。これまで申請者は、1 細胞期の体細胞クローン胚を一定時間 TSA で処理することにより出生率を 6 倍以上と大幅に改善することに成功している。一方、同様に受精胚を TSA 処理した場合、逆に出生率の低下および胎盤や胎児の異常を引き起こすことを報告した。このように、初期発生、特に 1 細胞期におけるタンパク質のアセチル化の制御は、その後の発生において大変重要であると考えられる。未受精卵および 1 細胞期の胚には、TSA の標的となるクラス 1 と 2 に属する 11 種類の HDAC のうち HDAC2 など数種類が発現しているが、2 細胞期以降では HDAC1 が主要な HDAC になる。一方、HAT 遺伝子群の詳細な発現様式については明らかになっていない。さらにアセチル化の標的タンパク質については、ヒストンの修飾については詳細な報告があるが、非ヒストンタンパク質のアセチル化と発生能については不明である。また TSA 処理により胚内のタンパク質の高アセチル化の誘導の際に、どのようなタンパク質のアセチル化に影響を及ぼすかについてこれまで網羅的に調べられた報告はない。最近、我々は TSA 処理胚のアセチル化タンパク質の網羅的な探索から チュープリンのアセチル化が大きく変化することを見いだした (松原ら、2010)。チュープリンは K40 がアセチル化され、未受精卵では主に紡錘体にのみ観察され、受精後には細胞質全体に広がることを報告されている (Schatten ら、1988)。チュープリンのアセチル化の機能については、チュープリンの重合や安定化に関わり、特に神経細胞では、分化や細胞内輸送に重要であることが報告されている (Creppe ら、2009)。最近、これまで不明であった チュープリン特異的なアセチル基転移酵素として MEC-17 が同定され、そのノックダウンでは神経発生の異常が報告された (Akella ら、2010)。チュープリンの特異的な脱アセチル化酵素としてはすでに HDAC6 と SIRT2 が同定されている。このように近年 チュープリンのアセチル化に関する知見が増え、その重要性が再認識され始めている。このような背景のもと、初期胚に

おける チュープリンのアセチル化の機能とその制御機構を明らかにすることは、初期胚の発生の分子基盤を理解するだけでなく、胚発生の効率化など応用研究にも大きく貢献することが期待される。

文献

Kishigami S, et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 340:183-189 (2006).
Kishigami S, et al. *Cent Eur J Biol*, 1:376-385 (2006).
Yoshida S, et al. *Dev Biol*, 301:464-477 (2007).
Schatten G, et al. *Dev Biol*, 130:74-86 (1988).
松原圭吾ら、第 103 回日本繁殖生物学会大会 (口頭発表)、青森 (2010).
Creppe C, et al. *Cell*, 136:551-564 (2009).
Akella JS, et al. *Nature*, 467:218-222 (2010).

2. 研究の目的

タンパク質のアセチル化の制御が哺乳類の初期発生に重要であることが、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤などを用いた実験などから示唆されている。しかし、ヒストンのアセチル化に比べ、初期発生における非ヒストンタンパク質のアセチル化の役割についてほとんどわかっていない。本研究課題では、非ヒストンタンパク質として チュープリンのアセチル化について初期発生における役割や制御機構を明らかにし、さらに体細胞クローン胚など低発生率を示す各種胚における チュープリンのアセチル化異常の有無と低発生率の表現型への寄与を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 各種 HDAC 阻害剤による排卵後の卵子の老化にともなう形態変化に与える影響。マウス B6D2F1 雌 (2~3 カ月齢) より、過剰排卵誘起後、採卵し試験管内で培養 (KSOM) することにより卵子の老化を観察。培養液にクラス I/II の HDAC に対する阻害剤トリコスタチン A (TSA) ならびにクラス III の HDAC に対する阻害剤ニコチンアミド (NAM) を培養液に添加し、卵子の形態変化を、採卵後 0、24、36、48 時間後にそれぞれ観察した。
- (2) 排卵後の卵子の老化にともなう チュープリンのアセチル化レベルの変化。採卵後卵子を培養し、0、12、24、36 時間後にサンプリングし、チュープリン抗体ならびにアセチル化チュープリン抗体を用いてウェスタンブロットティングを行った。
- (3) 各種 HDAC 阻害剤が排卵後の卵子の老化にともなう チュープリンのアセチル化に与える影響。採卵後卵子を TSA ならびに NAM 存在下で培養し、36 時間

後にサンプリングし、チューブリン抗体ならびにアセチル化チューブリン抗体を用いてウェスタンブロットングを行った。

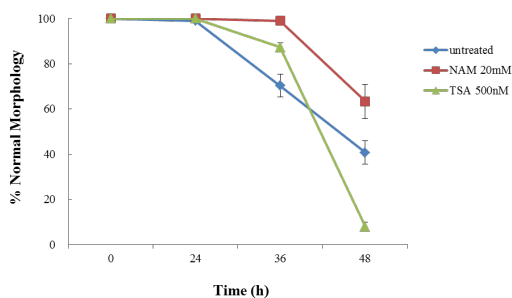
(4) 各種 HDAC 阻害剤が排卵後の卵子の老化にともなう紡錘体の伸展に与える影響。試験管内で 24 時間培養により老化した卵子をチューブリン抗体ならびにアセチル化チューブリン抗体を用いて免疫染色し、撮影した画像より紡錘体の長さを比較した。

(5) 体外受精ならびに人工的卵子活性化にともなうアセチル化の変化と TSA 処理が与える影響。体外受精またはストロンチウム処理により採卵した卵子の活性化を行う際に TSA を添加した。10 時間後に採取し、チューブリン抗体ならびにアセチル化チューブリン抗体を用いてウェスタンブロットングを行った。

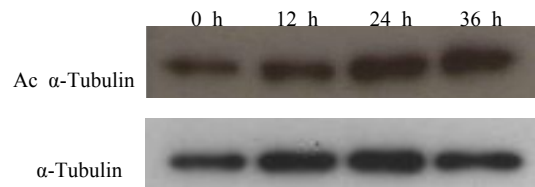
(6) 人工的卵子活性化にともなうアセチル化の変化と TSA 処理が与える影響。未活性化卵ならびに活性化卵を TSA で 3 時間処理し、チューブリン抗体ならびにアセチル化チューブリン抗体を用いてウェスタンブロットングを行った。

4. 研究成果

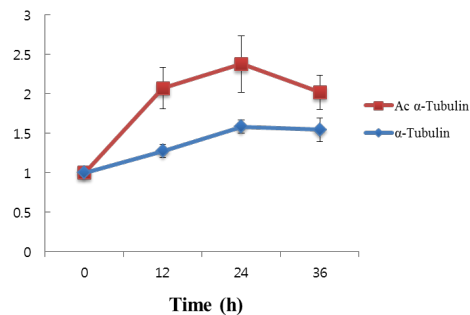
(1) 各種 HDAC 阻害剤による排卵後の卵子の老化にともなう形態変化に与える影響。下記の図の通り、ニコチンアミド添加時が、もっとも卵子の形態変化を抑制することが示された。



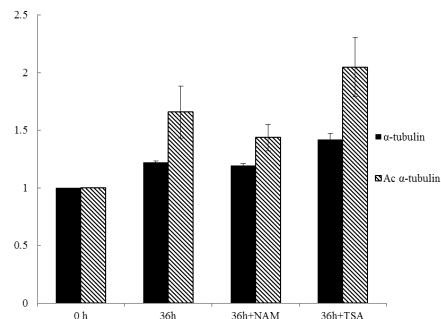
(2) 排卵後の卵子の老化にともなうチューブリンのアセチル化レベルの変化。卵子は培養に従い経時的にチューブリンのアセチル化レベルが亢進することが明らかになった。この結果から、卵子の老化にともない非ヒストンタンパク質のアセチル化異常が起こることが初めて明らかになった。



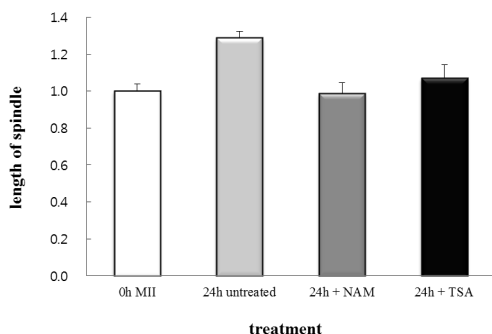
を定量した結果



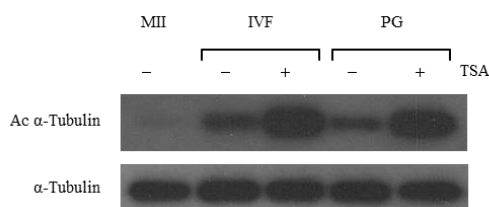
(3) 各種 HDAC 阻害剤が排卵後の卵子の老化にともなうチューブリンのアセチル化に与える影響。TSA では、未処理区に比べて、チューブリンのアセチル化が亢進し、NAM 存在下では抑制されることが示された。このことは、NAM 存在下で老化にともない形態変化が抑制された結果(1)と一致する。



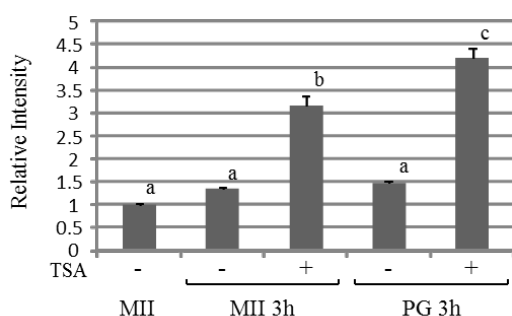
(4) 各種 HDAC 阻害剤が排卵後の卵子の老化にともなう紡錘体の伸展に与える影響。紡錘体は、卵子老化にともない伸展することが知られている。下記の通り、未処理の場合 24 時間で約 1.3 倍に伸展が見られるが、特に NAM 存在下では伸展が抑制されることが明らかとなった。



(5) 体外受精ならびに人工的卵子活性化にともなうアセチル化の変化とTSA処理が与える影響。TSA処理によりチューブリンのアセチル化が大きく亢進することが明らかになった。これにより、非ヒストタンパク質のアセチル化が、1細胞期のTSA処理により大きく亢進することが明らかとなった。



(6) 人工的卵子活性化にともなうチューブリンのアセチル化の変化とTSA処理が与える影響。人工的卵子活性化にともなうアセチル化の変化とTSA処理が与える影響。未活性化卵ならびに活性化卵をTSAで3時間処理したところ、チューブリンのアセチル化レベルが活性化した方が有意に向上した。この結果から、一見アセチル化に変化がないように思われた活性化後3時間の卵子内において、すでにチューブリンのアセチル化を亢進させるための準備が行われていることが明らかとなった。この機構として、HAT(ヒストンアセチル基転移酵素)の活性化や翻訳レベルの向上、局在の変化などの可能性が考えられ、今後の重要な課題であると考えられる。



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)

[雑誌論文](計 5件)

Lee AR, Ha LT, Kishigami S, Hosoi Y., Abnormal lysine acetylation with postovulatory oocyte aging. *Reprod*

Med Biol. 2014, 13, 81-86. 査読有
doi: 10.1007/s12522-013-0172-y
Kishigami S, Lee AR, Wakayama T. Using somatic-cell nuclear transfer to study aging. *Methods Mol Biol.* 2013, 1092, 109-126. 査読有
doi: 10.1007/978-1-62703-556-9_9.
Lee AR, Kishigami S, Amano T, Matsumoto K, Wakayama T, and Hosoi Y, Nicotinamide: a class III HDACi delays in vitro aging of mouse oocytes. *J Reprod Dev.* 2013, 59, 238-44. 査読有
Matsubara K, Lee AR, Kishigami S, Ito A, Matsumoto K, Chi H, Nishino N, Yoshida M, Hosoi Y, Dynamics and regulation of lysine-acetylation during one-cell stage mouse embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013, 434, 1-7. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.083.
Wakayama S, Kohda T, Obokata H, Tokoro M, Li C, Terashita Y, Mizutani E, Nguyen VT, Kishigami S, Ishino F, Wakayama T., Successful serial recloning in the mouse over multiple generations. *Cell Stem Cell.* 2013, 12, 293-297. 査読有
doi: 10.1016/j.stem.2013.01.005.

[学会発表](計 8件)

Kishigami S, Lee AR, Ha LT, Hosoi Y., Similar but distinct in vitro aging phenotypes of mouse SCNT oocytes, 10th Asian Reproductive Biotechnology Conference, Ho Chi Minh City, Vietnam, 2013, Aug 19-25.
Kishigami S, Insight into the mechanisms underlying HDACi requirements in SCNT, CABX workshop and international symposium, Jeju, Korea, 2012, Dec 3. 招待講演
Kishigami S, Roles of protein acetylation in mouse oocyte aging, 63th annual meeting of the Korea Society for reproductive medicine, Seoul, Korea, 2012, Dec 1. 招待講演
Lee AR, Kishigami S, Wakayama T, Matsumoto K and Hosoi Y, Effect of nicotinamide (class III HDACi) on mouse oocyte aging, 9th Asian Reproductive Biotechnology Conference, Manila, Philippines, 2012, Oct 23-28.
Kishigami S, Roles of protein acetylation in mouse oocyte aging, 34th Symposium of Japan Society for Biomedical Gerontology, Nagoya, 2012, Oct.16. 招待講演
Lee AR, Kishigami S, Matsumoto K and Hosoi Y, Role of nucleus in oocyte

aging, 第105回日本繁殖生物学会大会、筑波, 2012, 9月5日~8日.

Kishigami S, Lee AR, Matsumoto K and Hosoi Y, Dynamics of lysine acetylation during the one-cell stage mouse embryos after somatic-cell nuclear transfer, ISSCR 10th Annual meeting, Yokohama, 2012, June.13-16.

Kishigami S, Lee AR, Matsumoto K, Saeki K and Hosoi Y, Dynamics of lysine acetylation during the one-cell stage mouse embryos, 8th Asian Reproductive Biotechnology Conference, Guilin, China, 2011, Oct 25-30.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸上 哲士 (KISHIGAMI, Satoshi)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号: 10291064

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし