

内92-41

早稲田大学大学院理工学研究科

博士論文概要

論文題目

ウニ胚初期発生過程
におけるタンパク質
のADP-リボシル
化の研究

申請者

鎌田 康之

Y a s u y u k i K a m a t a

物理学及応用物理学専攻・発生生物学研究

平成 4 年12 月

現在、多種の細胞の核で、核の機能を担う酵素やヒストンなどがADP-リボシル化されることは広く知られている。そして、これらのタンパク質のADP-リボシル化の結果、核の機能が制御され、細胞分裂、細胞分化を引き起こすことが期待されている。ウニ初期発生では、孵化前に卵割が頻度高くしかも定期的に起こり、孵化後には外、中、内胚葉の分化が起こる。核でのタンパク質のADP-リボシル化が、初期発生過程のそれぞれの時期で卵割と細胞分化の機構に関与する可能性があると考えられる。本論文は、ウニ胚発生過程でのタンパク質のADP-リボシル化とその細胞分化への関与を示したものである。

第1章は序であり、これまでに主として哺乳類細胞で報告されているタンパク質のADP-リボシル化と、それを引き起こすADP-リボシルトランスフェラーゼについての知見を述べ、本研究の目的と意義を示している。

第2章は、ウニ胚発生過程で胚から単離した核、ミトコンドリア、ミクロソーム、細胞膜画分でのタンパク質のADP-リボシル化について述べている。ウニ胚では、タンパク質のADP-リボシル化は核と細胞膜画分でしか起こらず、発生過程でタンパク質のADP-リボシル化率が顕著に変化するのには核画分であり、細胞膜画分ではADP-リボシル化率がほとんど変化しないことを見いだした。核画分でのタンパク質のADP-リボシル化率は、受精後増加し、モルラ期で極大値を示し、孵化に至る間徐々に減少する。その後、間充細胞胚期から再び増加しはじめ、原腸形成期に再び極大値を示す。孵化前の時期には、卵割が定期的に繰り返される。ADP-リボシルトランスフェラーゼ阻害剤でタンパク質のADP-リボシル化を阻害しても、卵割は正常に起こり、発生の時間的な遅れもない。孵化前の時期だけに限って胚をADP-リボシルトランスフェラーゼ阻害剤で処理すると、これらの阻害剤は濃度依存的に死亡する胚の数を増加させるが、生き残った胚は正常に発生する。ADP-リボシルトランスフェラーゼ活性が高い原腸形成期では、これらの阻害剤は孵化前に胚の死亡を引き起こす濃度範囲では胚の死亡を引き起こすことはないが、主として外胚葉の分化を阻害し、異常胚を形成する。孵化から間充細胞胚期まではADP-リボシルトランスフェラーゼ活性の低い時期であり、この時期に限った胚の阻害剤による処理は胚発生に何の影響も及ぼさない。これら阻害剤がADP-リボシルトランスフェラーゼ活性の高い孵化前および孵化後の発生段階に限って胚発生を阻害することは、核でのタンパク質のADP-リボシル化が、胚発生でなんらかの重要な役割を担っていることを示唆している。

第3章では、ウニ胚核及び細胞膜でADP-リボシル化されるタンパク質について述べている。ウニ胚核では、すべての初期発生過程の胚で90Kの分子量をもつタンパク質がADP-リボシル化されることをSDS-PAGEによって見いだした。孵化前での胚では分子量125、32、21Kを示すタンパク質も、90Kほど強くはないものの、ADP-リボシル化される。これらのADP-リ

ボシル化されたタンパク質では、塩基性下で[ADP-リボシル]グループが容易に加水分解される。このことは、これらのタンパク質がポリ[ADP-リボシル]化されていることを示す。一方、細胞膜では22Kと68Kのタンパク質がADP-リボシル化をうけている。これらのタンパク質は、バクテリア毒素によってADP-リボシル化されることが知られているG-プロテインとは分子量が異なっている。測定したウニ胚のG-プロテインの分子量は他の細胞のG-プロテインの分子量と一致している。これら22Kと68Kタンパク質はG-プロテインとは異なり、内在性のADP-リボシルトランスフェラーゼによってADP-リボシル化されると考えられる。核でADP-リボシル化される90Kタンパク質、細胞膜でのこれらのタンパク質のさらなる性格づけが、これらのタンパク質のADP-リボシル化の役割を明らかにする手がかりとなるであろう。核での全タンパク質のADP-リボシル化率に比較して、そのタンパク質の一部であるヒストンのADP-リボシル化率は低いが、初期発生過程を通じて全タンパク質のADP-リボシル化率のような著しい変化は示さない。ウニ核ではヒストンH1がモノADP-リボシル化されている。H2B.2、H3.1、H4はポリ[ADP-リボシル]化され、5~11個のADP-リボース基が鎖状に結合していることを見いだした。H2AおよびH2B.1はADP-リボシル化されない。また、モルラ期ではポリ[ADP-リボシル]化されているH3.2は原腸形成期ではADP-リボシル化されていない。他種の細胞では、ウニ胚ではモノ[ADP-リボシル]化されているH1は、ポリ[ADP-リボシル]化されており、さらにH2AおよびH2B.1のポリ[ADP-リボシル]化もみとめられている。ウニ胚細胞でのヒストンのADP-リボシル化の、他種の細胞でのADP-リボシル化との違いは、胚独特のものであるか否かはまだ不明である。このことは、ヒストンのADP-リボシル化の発生での役割とともに、今後明らかにすべき課題である。ヒストンのADP-リボシル化がクロマチン構造の変化をひき起こすことを多くの研究者が示唆している。発生過程でのヒストンのADP-リボシル化のちがいが、クロマチン構造の変化を生じ、このことが細胞分化を引き起こす要因の一つになっている可能性もある。

第4章では、胚葉ごとの核のタンパク質のADP-リボシル化率の違いと胚葉分化との関連を示している。ウニ原腸胚から外胚葉細胞を分離し、その胚葉細胞から取り出した核では、タンパク質のADP-リボシル化が、内、中胚葉の核のそれより高率で起こっている。さらに、原腸胚期では、外胚葉の分化が異常に高いと考えられる動物極化胚での核のADP-リボシル化率は正常胚と比較して明白に高く、外胚葉細胞の分化の悪い植物極化胚では顕著に低い。細胞膜のADP-リボシル化率は、動物極化胚、植物極化胚ともに正常胚のそれとほぼ同じである。これらのことは、外胚葉細胞の分化に核のADP-リボシル化が重要な関連を持ち得ることを暗示している。さらに、核でADP-リボシル化率が高い動物

極化胚にA D P-リボシルトランスフェラーゼ阻害剤を投与すると、動物極化は阻止され、動物極化予定胚はかなり異常ではあるものの、動物極化胚と比較すると正常に近い形態をもつ胚に発生する。これらの知見は、核でのタンパク質のA D P-リボシル化は、主として外胚葉細胞分化を支持することを示している。A D P-リボシル化が高率で起こっている原腸胚では、D N Aメチル化も高く、しかもそれはタンパク質のA D P-リボシル化と同様に、主として外胚葉細胞で起こっている。D N Aメチル化は、動物極化胚で高く、植物極化胚では低いこともこれらの異常胚間でのA D P-リボシル化率の違いとよく似ている。正常胚でも動物極化胚でもD N Aメチル化を阻害すると主として外胚葉の分化が阻害される。さらに、単離核でのD N Aメチル化はタンパク質のA D P-リボシル化によって活性化されることを見いだした。D N Aメチル化は遺伝子発現を制御することが知られている。これらのことは、核でのタンパク質のA D P-リボシル化の役割の一つは、D N Aメチル化を促進し、その結果、細胞分化を引き起こすことであることを示唆している。この方向の研究がさらに進行すれば、A D P-リボシル化されたタンパク質の役割の一つが明らかになると考えている。

第5章はまとめであり、これまでに得られた知見をまとめ、今後解決すべき問題、即ち胚の核で主としてA D P-リボシル化される90Kのタンパク質の性格を明らかにし、その細胞分化での役割を見いだすこと、細胞膜でA D P-リボシル化されるタンパク質の性格を明らかにし、胚発生でのそれらタンパク質の役割を解明することなどの重要性を示している。