

5. AMPA 受容体以外の補助サブユニットの発見

1) Neto1, 2

neuropilin tolloid-like 1 (Neto1) は、細胞外部位に complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1 (CUB) 部位と1個の膜貫通領域をもつI型膜タンパク質である(図2)。Neto1とNMDA受容体の結合に関して、マウス脳から免疫沈降したNeto1複合体へのNMDA受容体サブユニットの回収が報告されている。そしてマウスNeto1の欠損変異は、NMDA受容体依存的な海馬長期増強を抑制することが、報告されている。また、Neto1はカイニン酸受容体の補助サブユニットとしても報告されている¹⁴⁾。

Neto2はラット小脳から精製されたカイニン酸受容体複合体のプロテオミクスにより同定された¹⁵⁾。Neto1, 2は類似した構造を有し、脳内でカイニン酸受容体に結合する^{14,15)}。Neto1, 2はカイニン酸受容体のグルタミン酸によるシグナル強度を劇的に増強し、また、不活性化動態と脱感作動態を遅らす。発現安定化の作用に関してはTARPsの例とは逆に、カイニン酸受容体の存在がNetoの発現を安定化する。マウスGluK5の欠損変異が海馬Neto1の発現量を減少することが、報告されている¹⁴⁾。

6. おわりに

本稿ではイオンチャンネル型グルタミン酸受容体の補助サブユニットの発見と、その機能解析の近年の成果を紹介した。これらの多種の補助サブユニットの存在は、グルタミン酸受容体の多様な機能調節を可能にし、生理機能の理解に貢献するだろう。

しかし、新たな課題も同時に挙げられる。脳神経細胞内では、どの補助サブユニットがどの程度の割合で受容体と結合しているのだろうか？ また、他のイオンチャンネル型受容体では補助サブユニットは存在しないのか？ 今後の研究の発展を期待したい。

- 1) Tomita, S., Chen, L., Kawasaki, Y., Petralia, R.S., Wenthold, R.J., Nicoll, R.A., & Brecht, D.S. (2003) *J. Cell Biol.*, 161, 805-816.
- 2) Kato, A.S., Siuda, E.R., Nisenbaum, E.S., & Brecht, D.S. (2008) *Neuron*, 59, 986-996.
- 3) Hashimoto, K., Fukaya, M., Qiao, X., Sakimura, K., Watanabe, M., & Kano, M. (1999) *J. Neurosci.*, 19, 6027-6036.
- 4) Tomita, S., Adesnik, H., Sekiguchi, M., Zhang, W., Wada, K., Howe, J.R., Nicoll, R.A., & Brecht, D.S. (2005) *Nature*, 435, 1052-1058.
- 5) Fukaya, M., Tsujita, M., Yamazaki, M., Kushiya, E., Abe, M.,

- Akashi, K., Natsume, R., Kano, M., Kamiya, H., Watanabe, M., & Sakimura, K. (2006) *Eur. J. Neurosci.*, 24, 2177-2190.
- 6) Rouach, N., Byrd, K., Petralia, R.S., Elias, G.M., Adesnik, H., Tomita, S., Karimzadegan, S., Kealey, C., Brecht, D.S., & Nicoll, R.A. (2005) *Nat. Neurosci.*, 8, 1525-1533.
- 7) Sumioka, A., Yan, D., & Tomita, S. (2010) *Neuron*, 66, 755-767.
- 8) Nomura, T., Kakegawa, W., Matsuda, S., Kohda, K., Nishiyama, J., Takahashi, T., & Yuzaki, M. (2012) *Eur. J. Neurosci.*, 35, 402-410.
- 9) Schwenk, J., Harmel, N., Zolles, G., Bildl, W., Kulik, A., Heimrich, B., Chisaka, O., Jonas, P., Schulte, U., Fakler, B., & Klockner, N. (2009) *Science*, 323, 1313-1319.
- 10) Kato, A.S., Gill, M.B., Ho, M.T., Yu, H., Tu, Y., Siuda, E.R., Wang, H., Qian, Y.W., Nisenbaum, E.S., Tomita, S., & Brecht, D.S. (2010) *Neuron*, 68, 1082-1096.
- 11) Kalashnikova, E., Lorca, R.A., Kaur, I., Barisone, G.A., Li, B., Ishimaru, T., Trimmer, J.S., Mohapatra, D.P., & Diaz, E. (2010) *Neuron*, 65, 80-93.
- 12) von Engelhardt, J., Mack, V., Sprengel, R., Kavenstock, N., Li, K.W., Stern-Bach, Y., Smit, A.B., Seeburg, P.H., & Monyer, H. (2010) *Science*, 327, 1518-1522.
- 13) Shanks, N.F., Savas, J.N., Maruo, T., Cais, O., Hirao, A., Oe, S., Ghosh, A., Noda, Y., Greger, I.H., Yates, J.R., 3rd, & Nakagawa, T. (2012) *Cell reports*, 1, 590-598.
- 14) Straub, C., Hunt, D.L., Yamasaki, M., Kim, K.S., Watanabe, M., Castillo, P.E., & Tomita, S. (2011) *Nat. Neurosci.*, 14, 866-873.
- 15) Zhang, W., St-Gelais, F., Grabner, C.P., Trinidad, J.C., Sumioka, A., Morimoto-Tomita, M., Kim, K.S., Straub, C., Burlingame, A.L., Howe, J.R., & Tomita, S. (2009) *Neuron*, 61, 385-396.

住岡 暁夫

(国立長寿医療研究センター)

Diverse regulation of ionotropic glutamate receptors by auxiliary subunits

Akio Sumioka (National Center for Geriatrics and Gerontology, Morioka-cho Gengo 35, Oobu city, Aichi 474-8511, Japan)

マウス受精卵前核期におけるクロマチンダイナミクス

1. はじめに

我々の身体を構成する細胞はおよそ60兆個と言われているが、それら全てはもともと一つの細胞、すなわち受精卵から増殖・分化したものである。受精卵は全ての細胞に分化し、個体を形成することができる。この能力は「全能

性」と呼ばれ、新たな生命の誕生には不可欠な能力である。しかしその由来である精子と卵子はどちらも全能性を持たず、それぞれ特有の分化状態にある細胞である。では、受精卵はどのようにして全能性を獲得するのか？ 細胞分化はDNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティック修飾によって遺伝子発現のオン/オフが切り替えられて成立する。つまり、全能性を獲得するためには、精子と卵子という分化状態を維持する遺伝子発現状態をリセットし、未分化な状態を維持する遺伝子発現状態に再構成しなくてはならない。このダイナミックなエピジェネティック情報のリセット・再構築は「リプログラミング」とも呼ばれ、近年iPS技術においても注目されている。

本稿ではマウス受精卵のリプログラミングの中でも父方ゲノムのエピジェネティック情報が大幅に書き換えられる前核期のリプログラミングに焦点を絞り、その詳細について最近の知見を中心に紹介したい。

2. 受精卵前核期

受精卵は前核期を経て2細胞期、4細胞期と分裂を続け、胚盤胞に達して着床する。前核期の細胞質内には雄由来・雌由来の二つの前核(1n)が独立して存在し、それぞれ雄性前核・雌性前核と呼ばれる。前核期は受精後の時間と両前核の位置・大きさによりPN0~PN5の六つのサブステージに分類される(図1)^{1,2)}。このうち、PN0, 1, 2はG1期に、PN3, 4の大部分はS期に、PN5のほとんどはG2期に相当する¹⁾。それぞれのサブステージでは雄性前核と雌性前核のエピジェネティック情報は大きく異なっており、この状態はエピジェネティックな不均等性(epi-

genetic asymmetry)と呼ばれる。DNA複製および転写開始時期は雄性前核の方が早く、PN3頃から確認されるのに対し、雌性前核ではPN4頃から確認される^{1,3)}。さらに、前核期を通じて雄性前核ではDNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティック修飾がダイナミックに変化するのに対し、雌性前核ではそのような変化は認められない(図2)⁴⁾。したがって、受精卵前核期におけるリプログラミングは雄性前核を中心に生じるものと考えられている。

受精卵前核期におけるリプログラミングにおいては、DNA脱メチル化反応における研究が盛んであり、これまでにさまざまな知見が得られている。さらに最近では、特徴的なヒストンバリエントが雄性前核に優先的に取り込まれ、リプログラミングに関与していることも報告されている。以下ではこれら2点について紹介していきたい。

3. DNA脱メチル化

DNAのメチル化はシトシン塩基(C)のピリミジン環の5位炭素原子がメチル化修飾を受けて5-メチルシトシン(5mC)になることにより成立する。精子および未受精卵において、それぞれのゲノムは高度にメチル化された状態にあるが^{5,6)}、受精後から胚盤胞形成にかけて大幅なDNA脱メチル化が行われる。父方・母方の両ゲノムのDNA脱メチル化は同時に生じるわけではなく、そのタイミング・様式に差異が認められる(図2a)。父方ゲノムではPN2~3頃からDNA脱メチル化が進行し、前核期が終わるまでに完了する。これはDNA複製とは無関係に生じるため、能動的脱メチル化と呼ばれる。一方、母方ゲノムでは2細胞期から分裂に伴ってDNAメチル化レベルが減少

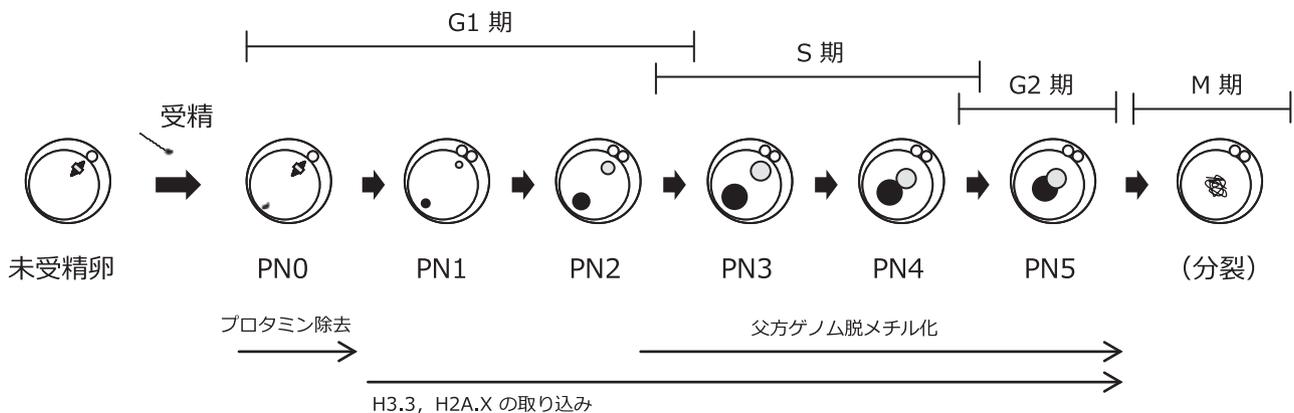


図1 マウス受精卵前核期のサブステージ

雄性前核は黒で、雌性前核は灰色で示している。PN0は受精直後の時期であり、PN1で小さな雌雄前核が形成され、PN2では雌雄前核が大きくなる。PN3でさらに大きさを増し、互いに近づくように中心部へ移動する。PN4では互いに接した状態にあり、PN5で重なりあい、やがて融合する。

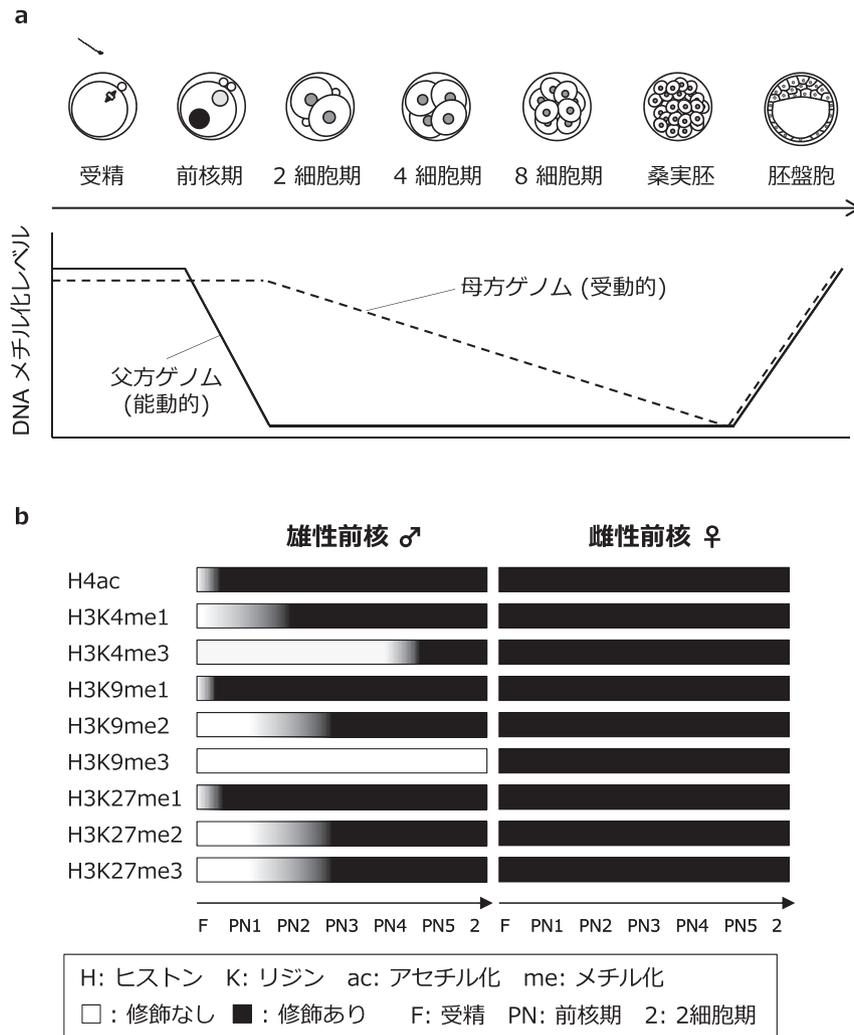


図2 前核期における雌雄前核のエピジェネティックな不均等性

(a) 前核期のDNAメチル化の推移. 実線は父方ゲノムの, 破線は母方ゲノムのDNAメチル化レベルを示す. (b) 雌雄前核のヒストン修飾の変化. 黒色は修飾が付加されていることを示し, 白色は修飾が付加されていないことを示す. 文献4より改変.

するが, これは複製されたDNA鎖の新規メチル化が行われず, 段階的に希釈されているためと考えられ, 受動的脱メチル化と呼ばれる. したがって前核期受精卵においては父方・母方の両ゲノムが同じ細胞内に存在するにも関わらず, 父方ゲノムのみが選択的に脱メチル化を受けていることとなる. この父方ゲノム特異的なDNA脱メチル化を行う責任因子は長年不明であったが, 最近になりTet3 (ten-eleven translocation 3) が前核期における能動的脱メチル化を行う責任因子であることが突き止められた⁷⁾.

Tet3はTet1, Tet2と共にTetファミリーに属する水酸

化酵素であり, 酸化反応によって5mCを5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) へと変化させる. Tetファミリー分子の発現には組織/細胞特異性があり, 受精卵においてはTet3が顕著に発現している. Tet3のmRNA量は未受精卵と前核期の受精卵に最も高く, 2細胞期には顕著に減少する⁸⁾. Tet3ノックアウトマウスを用いた解析では, Tet3欠損卵と野生型精子を受精させた場合には父方ゲノムの脱メチル化は生じないが, 野生型卵とTet3欠損精子を受精させた場合には正常に脱メチル化が起きる⁷⁾. この結果はDNA脱メチル化に寄与するTet3は母親由来であり, 受精

前から既に転写されて卵細胞内にプールされていることを示唆している。

ここで大きな疑問のひとつは、Tet3が同じ細胞質内にあるにも関わらず、なぜ母方ゲノムが脱メチル化されないのかであるが、これにはPGC7(別名Stella, Dppa3)と呼ばれるタンパク質の関与が報告されている⁹⁾(図3参照)。PGC7はジメチル化修飾されたヒストンH3リジン9(H3K9me2)に結合する生化学的性質を有するが、前核期においては雌性前核のみH3K9me2修飾を受けているため、PGC7は雌性ゲノムにより強固に結合して、Tet3による脱メチル化反応から母方ゲノムを物理的に保護すると考えられている。興味深いことに、父方ゲノムにおいてもインプリンティング遺伝子は脱メチル化されず、メチル化状態を維持しているが、これもPGC7がH3K9me2を介して父方ゲノムのインプリンティング領域に結合し、Tet3の

結合を防ぐことでメチル化状態を維持している⁹⁾。

Tet分子は5hmCをさらに5-ホルミルシトシン(5fC)、5-カルボキシシトシン(5caC)へと酸化する活性を有し、実際これらは前核期、2細胞期、4細胞期胚の父方ゲノム上で検出されている¹⁰⁾。しかし5hmCも含めこれら5mC代謝産物の機能や生理学的意義の重要性はいまだ明らかではなく、さらなる研究が必要とされている。

またTet3による脱メチル化以外にも、転写伸長因子複合体構成因子であるElp3(elongator acetyltransferase complex subunit 3)が雄性前核の脱メチル化に関与すると報告されている¹¹⁾。Elp3はラジカルSAM(S-adenosylmethionine)ドメインとHAT(histone acetyltransferase)ドメインの二つのドメインを持つが、このうちラジカルSAMドメインが雄性前核のDNA脱メチル化に重要であると考えられている¹¹⁾。しかしElp3による脱メチル化の

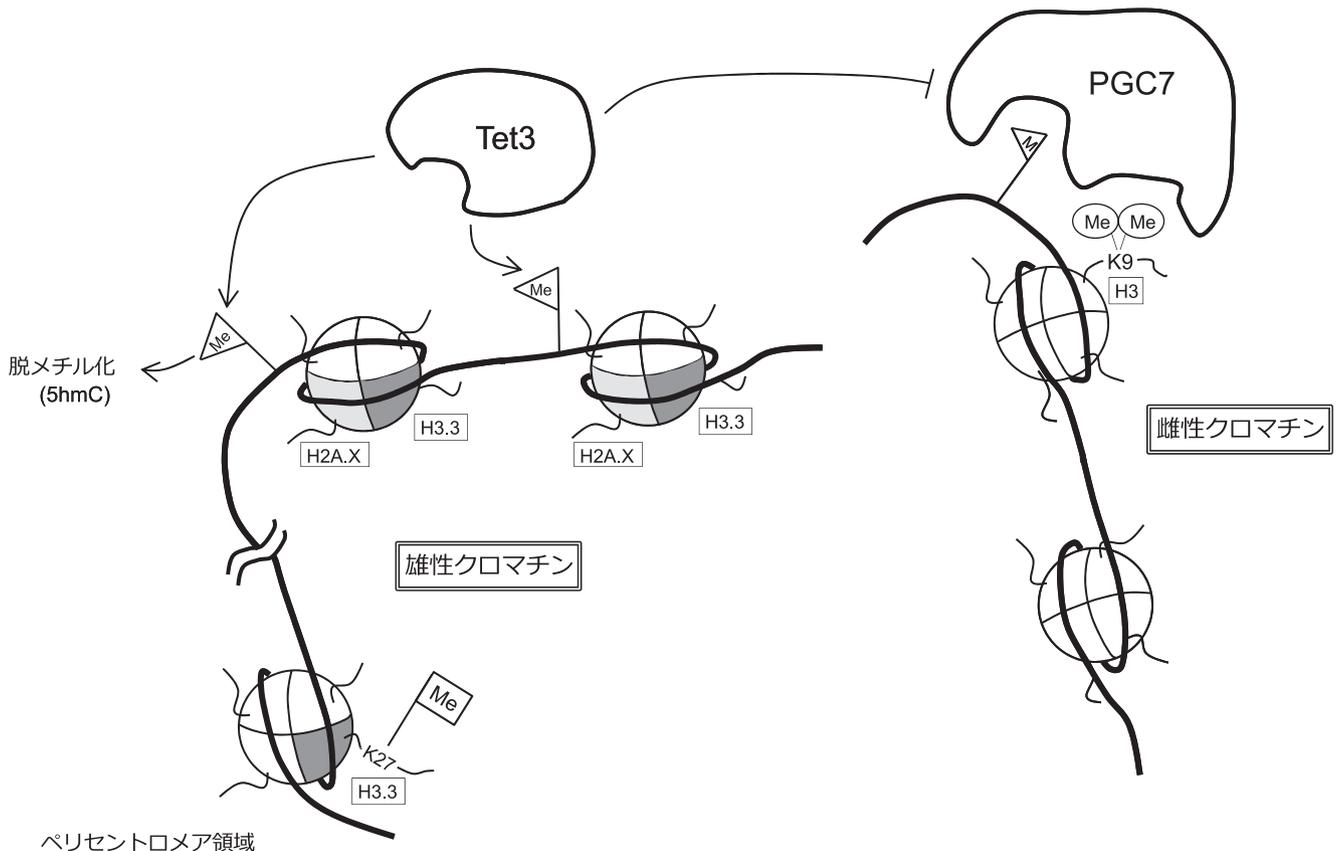


図3 前核期受精卵の雌雄クロマチン状態の模式図

雄性前核のクロマチンはH3.3やH2A.X等のヒストンバリエントが優先的に組み込まれ、パリセントロメア領域ではH3.3K27がメチル化されている。また受精直後に見られるDNAのメチル化は、Tet3によって速やかに脱メチル化される。一方雌性前核においては、PGC7がH3K9メチル化(H3K9me2)への結合を介してクロマチンを保護するため、Tet3による脱メチル化から逃れると考えられている。

詳細なメカニズムはいまだわかっていない。

4. ヒストン修飾とヒストンバリエント

体細胞や卵細胞と異なり、精子においては成熟の過程でヒストンの大部分が脱落して、プロタミンと呼ばれる塩基性タンパク質に置換されることで核が高次に凝集したクロマチン構造を形成する。精子が卵細胞質に侵入して受精が完了すると、プロタミンは精子クロマチンから即座に脱落し、代わりに卵子由来のヒストンを取り込んで雄性前核のヌクレオヒストンを形成する。雄性クロマチンに取り込まれるヒストンは高度にアセチル化されているが、メチル化修飾は備わっておらず、前核期の進行に伴い H3K4, H3K9, H3K27 等の残基にメチル化修飾が付加されていく⁴⁾。一方、雌性クロマチン中のヒストンは受精前にすでに受けていた修飾が維持されており、前核期途中で劇的に変化することはない。すなわち DNA メチル化と同様にヒストン修飾においても雌雄非対称性が認められ、ダイナミックなリプログラミングはもっぱら雄性クロマチンにおいて生じることを示唆している。

ヒストンには S 期にクロマチンに取り込まれるカノニカルヒストンの他に、S 期以外でもクロマチンに取り込まれるヒストンバリエントが多数存在する。その中でもヒストン H3 のバリエントである H3.3 は、前核期受精卵において雄性前核に優先的に取り込まれることが知られているが、近年の研究で、H3.3 は雄性前核のペリセントロメア領域 (pericentromeric region) に局在していること、さらにこの局在には H3.3 の 27 番目のリジン残基 (H3.3K27) のメチル化が重要であることが報告された¹²⁾ (図 3)。H3.3 の 27 番目のリジン残基をアルギニン残基に置換した変異体 (H3.3K27R) を受精卵に過剰発現させると、通常ペリセントロメア領域に存在するヘテロクロマチンの局在が崩れ、異常なペリセントロメア領域由来の転写産物が蓄積する。その結果、H3.3K27R 過剰発現卵では細胞分裂時に正常な染色体分配が行われず、発生が停止する。H3.3 以外の H3 (H3.1, H3.2) も K27 のメチル化は起こり得るが、H3.1K27R 変異体の過剰発現は胚発生に影響を与えないことから、この現象は H3.3 特異的である。さらにハエ受精卵を用いた研究では、雄性前核への H3.3 の組み込みを阻害すると雄性前核クロマチンの脱凝集が起こらないという報告があるが¹³⁾、雄性前核のクロマチン構造とヒストン修飾、さらに DNA 脱メチル化との相関はいまだ詳細が明らかでないことから、今後さらなる解明が待たれるところである。

また、前核期受精卵において H3.3 と同様に雄性前核に優先的に取り込まれるヒストンバリエントの一つに H2A バリエントの H2A.X がある。リン酸化された H2A.X は γ H2A.X と呼ばれ、DNA 二本鎖切断の修復時にクロマチンに取り込まれることから一般的に DNA 傷害マーカーとしても使用されているが、前核期において発現している H2A.X のリン酸化はクロマチンに取り込まれる際に必須ではない¹⁴⁾。しかし、H2A.X の機能や雄性前核に優先的に取り込まれることの意義はいまだわかっておらず、さらなる解析が待たれている。

これらの他にも雌雄前核で異なるヒストンバリエントや修飾は多数存在する。さらに上記の H3.3 の例に見られるように、ゲノム上の特異的な配列への局在や特定の遺伝子への局在が重要になる例もあると予想されることから、今後は後述のように遺伝子レベルの解析がおおいに期待されることである。

5. おわりに

受精卵前核期はおよそ 12 時間で終了する非常に短い時期である。しかしここでは、非常にダイナミックなエピジェネティック修飾の変化が起きており、全能性を獲得することで新たなライフサイクルをスタートさせている。現在のところ、免疫染色法やタイムラプスイメージングにより、グローバルなエピジェネティック変化は調べられているが、その先の現象は未知である。すなわち、リプログラミングにより具体的にどの遺伝子が修飾を受けて活性化もしくは抑制されているのか、どのようなメカニズムにより全能性を獲得するのか、これらについてはいまだ明らかとされていない。今後、次世代シーケンサー等を用いた解析によりこの謎を解くことができれば、新たな生命誕生のしくみを知ることができるだけでなく、自然状態のリプログラミング機構を応用することで、再生医療や発生工学のさらなる発展が期待される。

- 1) Adenot, P.G., Mercier, Y., Renard, J.P., & Thompson, E.M. (1997) *Development*, 124, 4615-4625.
- 2) Santos, F., Hendrich, B., Reik, W., & Dean, W. (2002) *Dev. Biol.*, 241, 172-182.
- 3) Aoki, F., Worrall, D.M., & Schultz, R.M. (1997) *Dev. Biol.*, 181, 296-307.
- 4) Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W., & Reik, W. (2005) *Hum. Mol. Genet.*, 14, R47-R58.
- 5) Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S.J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., & Reik, W. (2010) *Nature*, 463, 1101-1105.

- 6) Smallwood, S.A., Tomizawa, S., Krueger, F., Ruf, N., Carli, N., Segonds-Pichon, A., Sato, S., Hata, K., Andrews, S.R. & Kelsey, G. (2011) *Nat. Genet.*, **43**, 811–814.
- 7) Gu, T.P., Guo, F., Yang, H., Wu, H.P., Xu, G.F., Liu, W., Xie, Z.G., Shi, L., He, X., Jin, S., Iqbal, K., Shi, Y.G., Deng, Z., Szabó, P.E., Pfeifer, G.P., Li, J., & Xu, G.L. (2011) *Nature*, **477**, 606–610.
- 8) Wossidlo, M., Nakamura, T., Lepikhov, K., Marques, C.J., Zakhartchenko, V., Boiani, M., Arand, J., Nakano, T., Reik, W., & Walter, J. (2011) *Nat. Commun.*, **2**, 241.
- 9) Nakamura, T., Liu, Y.J., Nakashima, H., Umehara, H., Inoue, K., Matoba, S., Tachibana, M., Ogura, A., Shinkai, Y., & Nakano, T. (2012) *Nature*, **486**, 415–419.
- 10) Inoue, A., Shen, L., Dai, Q., He, C., & Zhang, Y. (2011) *Cell Res.*, **21**, 1670–1676.
- 11) Okada, Y., Yamagata, K., Hong, K., Wakayama, T., & Zhang, Y. (2010) *Nature*, **463**, 554–558.
- 12) Santenard, A., Ziegler-Birling, C., Koch, M., Tora, L., Bannister, A.J., & Torres-Padilla, M.E. (2010) *Nat. Cell. Biol.*, **12**, 853–862.
- 13) Loppin, B., Bonnefoy, E., Anselme, C., Laurençon, A., Karr, T.L., & Couble, P. (2005) *Nature*, **437**, 1386–1390.
- 14) Nashun, B., Yukawa, M., Liu, H., Akiyama, T., & Aoki, F. (2010) *Development*, **137**, 3785–3794.

青島 圭佑^{1,2}, 岡田 由紀^{1,3}
 (¹ 東京大学分子細胞生物学研究所
 病態発生制御研究分野,
² 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
 分子病態診断部門,
³ さきがけ JST)

Chromatin dynamics in mouse pronuclear zygotes
 Keisuke Aoshima^{1,2} and Yuki Okada^{1,3} (¹Laboratory of Pathology and Development, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan, ²Division of Molecular Pathobiology, Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, ³PRESTO, JST)