

氏名	にしき 錦	み 見	あき 昭	ひこ 彦
学位(専攻分野)	博士 (農学)			
学位記番号	農博第1066号			
学位授与の日付	平成11年5月24日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
研究科・専攻	農学研究科応用生物科学専攻			
学位論文題目	マウス着床前胚における転写因子NF- κ Bの活性化と新規100-kDa核内タンパクの解析			

論文調査委員 (主査) 教授 今井 裕 教授 宮本 元 教授 佐々木義之

論文内容の要旨

マウス着床前胚の発生において、1細胞期から2細胞期における遺伝子転写制御と活性酸素種による酸化還元制御が重要な役割を担っていることが知られている。しかし、両者の間にどのような相互関係が存在するのかについてはほとんど検討されていない。本研究では、この2つの制御機構に深く関わる因子として、酸化還元制御のもとで遺伝子転写を調節している転写因子NF- κ Bに着目し、マウス着床前胚におけるNF- κ Bの発現および活性化について検討した。また、一連の実験の過程で、NF- κ BサブユニットRelAの核移行シグナルを含むペプチドを認識する抗体が100 kDaの新規核タンパクを特異的に認識することから、このタンパクのcDNAをクローニングするとともに、そのマウス着床前胚における挙動を観察した。その主な内容は以下のようにまとめられる。

1. マウス着床前発生の過程において、未受精卵母細胞から胚盤胞期胚に至るまで、NF- κ BサブユニットRelAがmRNAおよびタンパクレベルで発現しており、特に、1細胞期前期において、NF- κ Bが時期特異的に活性化されていることが示された。NF- κ Bの特異的阻害剤を用いた実験から、1細胞期前期におけるNF- κ Bの活性化が、その後の胚発生、特に4細胞期以降への発生に不可欠であることが明らかになった。

2. 活性型NF- κ B分子で特異的に露出されるRelAの核移行シグナルペプチドに対する抗体の作製を試みたが、作製された抗体は活性型NF- κ Bではなく100 kDaの核タンパクを認識した。この100-kDaタンパクを精製し、その内部アミノ酸配列を決定したところ、タンパクデータベースの検索から100-kDaタンパクが未知のタンパクであることが示唆された。

3. 100-kDaタンパクの内部アミノ酸配列をもとにEST walkを行ったところ、開始コドンを含むと予想される部位からポリAシグナルまでのcDNA配列を構築することができた。HeLa細胞RNAを用いたRT-PCRとPCR産物のシーケンスからその塩基配列を確定し、これにコードされるアミノ酸配列を予測した。このアミノ酸配列が、分裂酵母と出芽酵母のmRNA前駆体スプライシング因子であるPrp1 p/Zer1 pならびにPrp6 pと高い相同性を示すことから、100-kDaタンパクがこれらのホモログであることが示唆された。また、100-kDaタンパクには、タンパク質間相互作用に関わるTPR(tetratricopeptide repeat)モチーフやDNA結合に関わるロイシンジッパーモチーフが認められた。100-kDaタンパクをGFPタグとの融合タンパクとしてHeLa細胞で発現させたところ、その発現タンパクは主として核に局在し、特に一部の細胞ではmRNA前駆体スプライシング因子特有の核内でのスポット状の顆粒として局在することが観察された。

4. マウス着床前胚における100-kDaタンパクの局在を免疫蛍光染色により観察した。その結果、8細胞期胚や桑実期胚ではほとんどの割球で核内に局在したが、一部の割球では核よりもむしろ細胞質に局在することが認められた。また、細胞周期を同期化した1細胞期胚では、100-kDaタンパクが中期(S期)から後期(G2期)にかけて核に蓄積されて行くことが明らかになった。

以上、本研究において転写因子NF- κ Bが1細胞期前期で時期特異的に活性化されることを明らかにし、この転写因子がマウス着床前発生における遺伝子転写制御と活性酸素制御の相互関係を理解する上で重要であることを示唆した。また、研究

の過程で発見した新規のスプライシング因子である 100-kDa タンパクが、マウス 1 細胞期胚において細胞周期依存的に核に蓄積されていくことを見出し、このタンパクがマウス着床前胚においてスプライシング因子として遺伝子転写調節に関与している可能性を示唆した。

論文審査の結果の要旨

マウス胚では、活性酸素によるレドックス制御が胚発生初期の遺伝子転写制御に重要な役割を果たしていると考えられているが、両者の制御機構の相互関係についてはこれまでに明らかにされていない。本論文では、レドックス制御下で遺伝子の転写制御を行っている NF- κ B に着目し、マウス胚の発生初期過程における発現と活性化について検討するとともに、NF- κ B の核移行シグナルに対する抗体を作製し、これを認識する新規の核タンパクを同定するとともに、胚発生初期における作用機序の解明を試みている。評価すべき主要な点は以下の通りである。

1. NF- κ B は受精から胚盤胞期に至る胚発生過程で恒常的に発現しているが、特に、1 細胞期前期に特異的に活性化し、このことが 4 細胞期以降の胚発生に不可欠であることを明らかにした。

2. NF- κ B を構成するサブユニット (RelA) の核移行シグナルに対する抗体を作製し、これを認識するタンパクを精製したところ、得られたタンパクは活性型 NF- κ B を認識するものではなく、アミノ酸配列を決定した結果、新規の 100-kDa 核タンパクであることが明らかになった。

3. dbEST から 100-kDa タンパクに対する全 cDNA を構築し、アミノ酸配列を推定したところ、分裂酵母と出芽酵母に存在する mRNA 前駆体スプライシング因子である Prp 1 p/Zer 1 p ならびに Prp 6 p と高い相同性を示した。また、100-kDa タンパク内には、タンパク質間相互作用に関わる TPR モチーフやロイシンジッパー DNA 結合モチーフを認めた。さらに、GFP タンパクとの融合タンパクを Hela 細胞で発現させたところ、融合タンパクは核内に局在するとともに、mRNA 前駆体スプライシング因子特有の存在様式を示すことを明らかにした。

4. マウス発生初期胚における 100-kDa タンパク質の挙動を免疫蛍光法により検討した結果、1 細胞期胚では DNA 合成期から G 2 期にかけて核内に蓄積されて行くことが明らかとなり、胚発生初期の遺伝子転写制御に重要な役割を果たしている可能性を示唆した。

以上のように、本論文は哺乳動物胚の発生開始と維持に不可欠な遺伝子転写制御機構について新たな研究の方向性を示したものであり、発生学、生殖工学、家畜繁殖学に貢献するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、平成 11 年 3 月 19 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。