

博士論文番号：0181007

アフリカツメガエル初期発生における
転写因子 E2F の機能解析

小野 達也

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物分子遺伝学講座

(加藤 順也 教授)

平成 16 年 1 月 8 日提出

目次

序論	3
方法および材料	16
結果	
(1) 内在性 E2F の DNA 結合活性は初期発生を通じて存在する	23
(2) 内在性 E2F の転写活性は胞胚期において上昇する	23
(3) 優性不能型 E2F を用いた解析	23
(4) 野生型 E2F を用いた解析	41
考察	60
参考文献	69
謝辞	83

序論

(1) はじめに

アフリカツメガエルの卵は受精後 12 回の同調的な卵割を行った後、中期胚遷移 (midblastula transition、以下 MBT と略す) を迎える。これを境に卵割は非同調的となり、それまでは不活性であった接合体ゲノムからの転写が活性化される。さらに胚を形成する個々の細胞の細胞周期は S 期 (DNA 合成期)、M 期 (有糸分裂期) のみからなる初期発生型の細胞周期から、G1 期 (第一ギャップ期)、S 期、G2 期 (第二ギャップ期)、M 期を一方向に繰り返す体細胞型細胞周期へと変化する。本研究ではこの MBT 周辺を中心として、アフリカツメガエル初期発生における転写因子 E2F (E2 promoter binding factor) の機能解析を試みた。E2F は体細胞型細胞周期において G1/S 期移行を直接制御している転写因子であり、その過剰な転写活性は G0 期 (休止期) にある細胞を S 期に進行させるのに十分である。その重要性から、体細胞型細胞周期における E2F の機能に関しては多くの知見があるが、初期発生および初期発生型細胞周期における機能についての報告は未だ少ない。またアフリカツメガエル初期発生における MBT は細胞周期にギャップ期が出現する時期であると同時に、接合体ゲノムからの転写が活性化される時期でもあることから、この時期における E2F の機能の重要性を予測した。

(2) モデル生物としてのアフリカツメガエル

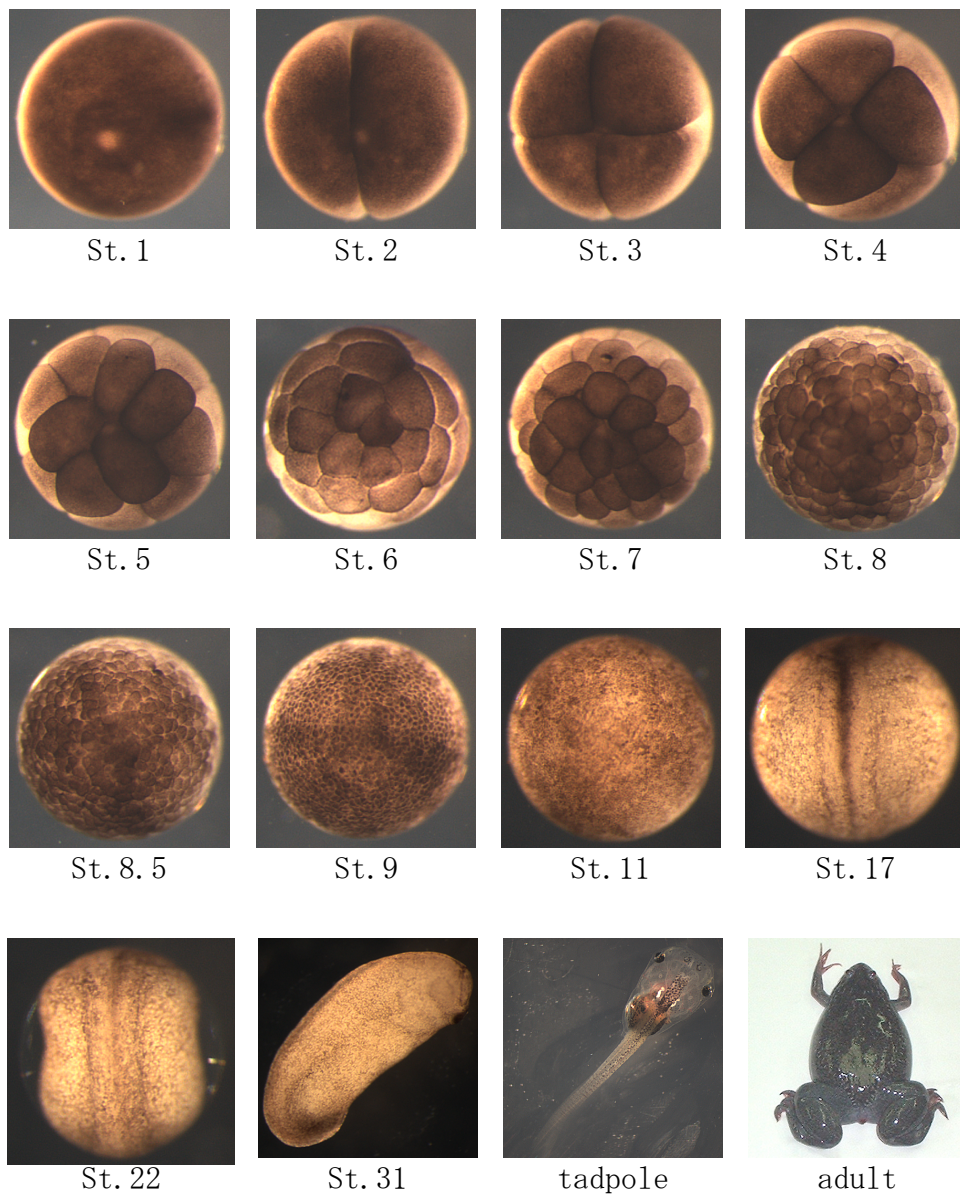
マウス、チキン、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、線虫と並んで、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は生物学において広く用いられているモデル生物である (参考図 1)。排卵誘発剤の注入により、一年中いつでも卵を得ることができること、他のカエルと異なり卵が一個ずつバラバラに産み出されること、人工授精が可能で、発生が同調した初期胚を多量に得ることができること、体外発生するため初期胚を顕微鏡下で観察できること (参考図 2)、卵が大きくインジェクション等の胚操作が容易であること、一つの初期胚あたりの容量が多いため、生化学的実験に適していること、卵抽出液を用いて無細胞系が確立できること、発生に関する知見が蓄積していること、さらにトランスジェニックが可能であること (Kroll et al. 1996, Amaya et al. 1999) などが利点として挙げられる。また大きな欠点としては、性的に成熟するまでに 2 年から 3 年と長い時間がかかるため、遺伝学的実験に適さないことがある。

しかし、アフリカツメガエルの一種である *Xenopus tropicalis* は性的に成熟するまでにかかる時間が半年ほどで、*Xenopus laevis* に比べて格段に短く、さらに *Xenopus laevis* のモデル生物としての利点を併せ持つ。よって *Xenopus*



参考図1 アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*)

アフリカツメガエルの成体の写真を示す。左側の小さい個体が雄、右側の大きい個体が雌である。



参考図2 アフリカツメガエルの初期発生

アフリカツメガエルの初期発生を示す。発生ステージはNieuwkoopとFaberに準ずる (Nieuwkoop and Faber 1956)。水温23℃で最初の卵割はおよそ90分かかり、その後はSt. 8.5まで一回の卵割あたりおよそ30分で進む。

tropicalis は遺伝学的解析にも利用でき、また生化学的解析にも適した優れたモデル生物になりうると考えられる。またそのゲノムは *Xenopus laevis* が 4 倍体で 3.1×10^9 bp であるのに対し、*Xenopus tropicalis* は 2 倍体で 1.7×10^9 bp であり、*Xenopus laevis* の約半分である。この利点を生かし、*Xenopus tropicalis* におけるゲノムプロジェクトも進みつつある。

(3) アフリカツメガエル初期発生における細胞周期制御

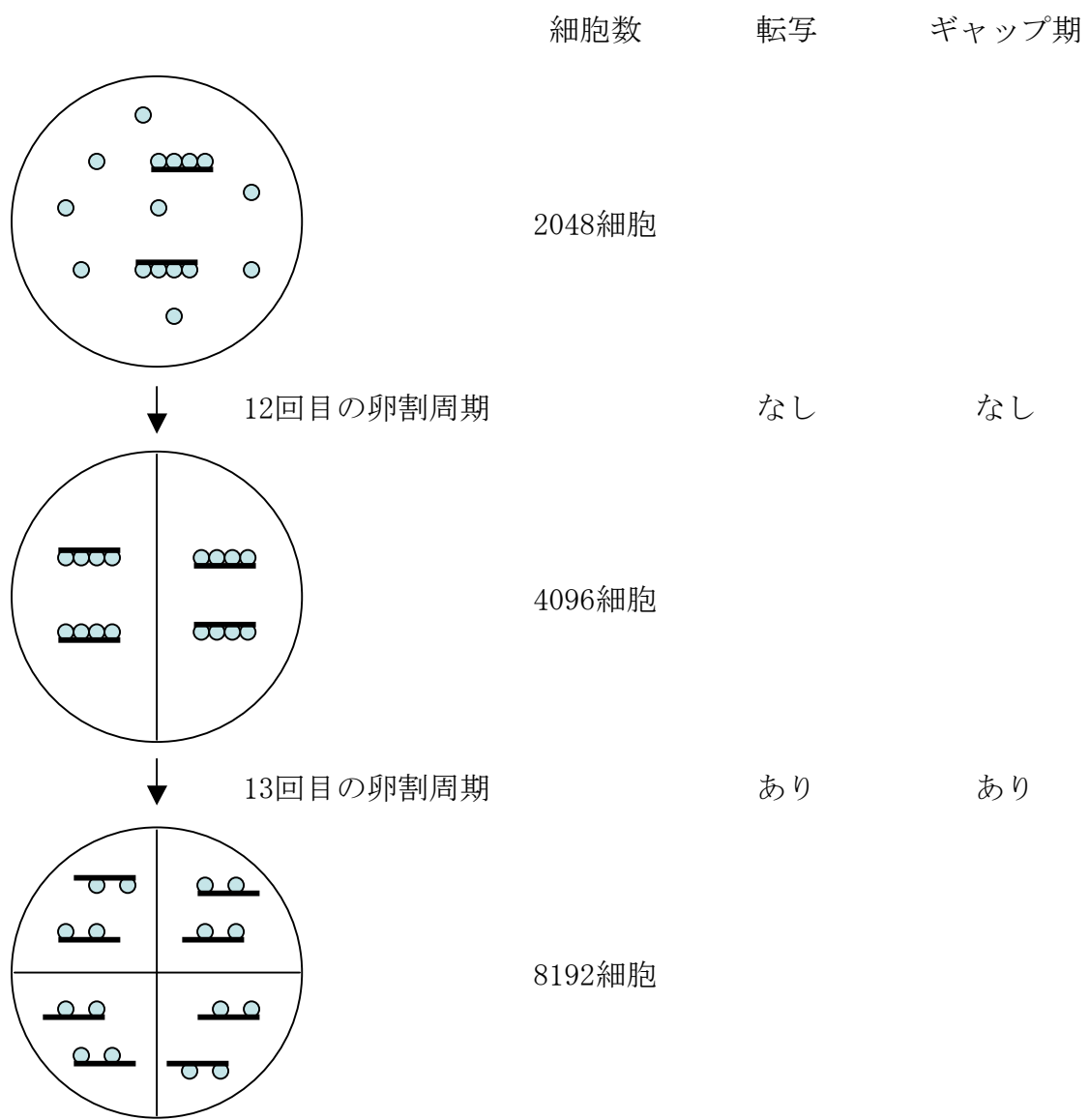
(3-1) 第一卵割

受精から第一卵割までの細胞周期はその後の卵割と比べると長い（約 90 分）。まず、受精によって速やかに Cyclin A、Cyclin B、および Mos の分解が起き S 期へ進行する。そして Cyclin B の再合成とともに Cdc2 の 15 番目のチロシン（Tyr15）が一過性にリン酸化され、G2 期が出現する（Ferr11 et al. 1991）。このリン酸化には Wee1 が関与している（Murakami and Vande Woude 1998）。卵割過程では Cyclin A は Cdc2 とのみ結合しており Cdk2 とは結合しない（Min sh11 et al. 1990）。一方、Cdk2 は Cyclin E と結合し、卵割過程の DNA 複製に関与している（Guadagno and Newport 1996）。また、Cyclin E/Cdk2 が卵割期における中心体の複製にも関与することが報告された（Hinchcliffe et al. 2001）。

(3-2) 第二卵割から MBT

アフリカツメガエル初期胚の第二卵割から 12 回目の卵割まで、分裂はほぼ同調的で 1 回あたり 30 分と極めて短く、接合体ゲノムからの転写を伴わない。そして 12 回の分裂（細胞数 4096 個）の後に細胞周期の同調性は失われ、ゲノムからの転写が始まる。この変化が MBT と呼ばれる。2~12 回目の卵割における細胞周期は S 期と M 期によって構成されており、G1 期と G2 期はほとんど存在しない。しかし、初期胚に過剰の DNA を注入したり、その無細胞系に一定以上の精子核を加えると、S 期の伸長や G2 期の出現が起こり、転写も始まる（Newport and Kirshner 1982b, Newport and Dasso 1989）。このことから核と細胞質の比がある一定の値に達すると MBT が生じると考えられ、一般に「滴定モデル」が受け入れられている（参考図 3, Newport and Kirshner 1982b）。このモデルでは未受精卵に過剰に存在する何らかの母性因子が卵割期に起こる幾何級数的な DNA 量の上昇によって滴定され、ちょうど MBT においてこの因子が不足し、よって MBT において細胞周期が長くなり、ゲノムからの転写が始まるとするモデルである。

卵割期における DNA 複製に関与しているのは主に Cyclin E/Cdk2 である。しかし、体細胞分裂の場合と異なり、卵割期においては Cyclin E は細胞周期を



参考図3 Newport and Kirschnerの「滴定モデル」

未受精卵に過剰に存在する何らかの母性因子が卵割期におこる幾何級数的なDNA量の上昇によって滴定され、ちょうどMBTの頃に不足するようになる。このため、MBTで細胞周期が伸長化し、転写が開始される。図の大きな円は11回目の卵割後の一つの細胞を、小さな円は何らかの母性因子を、短い線はDNAをそれぞれ模式的に表す。

通じて安定に存在している (Hartley et al. 1997)。これは卵割期の早い DNA 複製に対応するためであると考えられる。一方、Cyclin B は母性 mRNA から合成され、卵割に伴い分裂と合成を繰り返す。この間、Cdc2 の Tyr15 のリン酸化はほとんど起きず、MBT までの Cdc2 活性の制御は Cyclin B の分解と合成のみに依存していると考えられる。この時期に Cdc2 の Tyr15 がリン酸化されないのは、このリン酸基に対してフォスファターゼとして働く Cdc25A の活性のためであると考えられる (Sang et al. 1999, Shimuta et al. 2002)。Cdc25A は卵成熟期には存在しないが、受精後速やかに合成、蓄積され MBT をすぎる頃に分解される。Cdc25A の優性不能型変異体を初期胚にインジェクションすると Cdk2、Cdc2 の Tyr15 のリン酸化が亢進し、卵割速度が遅くなる。

(3-3) MBT 以降

MBT 以後、初期胚の細胞周期は同調性を失うと共に徐々に伸長化し、ギャップ期を加え、体細胞型の細胞周期へと近づいていく。また、細胞周期の正常な進行をモニターするチェックポイント機構は、MBT 後に機能するようになり (Newport et al. 1989; Clute et al. 1997; Kappas et al. 2000)、またアポトーシスを誘導するシグナル伝達系も MBT において初めて活性化する (Anderson et al. 1997; Stack et al. 1997; Sible et al. 1997; Hensey et al. 1998)。細胞周期制御因子を含めた母性由来の mRNA はこの時期から原腸胚期にかけて分解され、代わりにゲノムからの転写が始まる (表 1)。このため MBT から原腸胚期にかけては母性由来と、ゲノム由来の細胞周期制御因子が混在することになる。

卵割期に発現している Cdc25A と Cyclin E 蛋白質は MBT の頃に、Cyclin A 蛋白質は原腸胚初期に不安定化し分解される (Sang et al. 1999, Hartley et al. 1996, Howe et al. 1995)。その詳細なメカニズムは不明である。しかし少なくとも Cyclin E 蛋白質、Cyclin A 蛋白質に関しては、興味深いことに蛋白質合成を阻害して細胞分裂を停止させても受精後の一定時間後に必ず起こることがわかっている (Howe et al. 1995, Howe et al. 1996)。このことから、これら母性蛋白質の分解は、MBT に非依存的な何らかの計時機構 (developmental timer) によると考えられている。

母性由来の Cyclin A は特別に Cyclin A1 と呼ばれ、体細胞においては発現していない。この Cyclin A1 は原腸胚期初期において分解され、体細胞型の cyclin A2 と切り替わる (Howe et al. 1996)。このように MBT 以前の初期胚で機能する細胞周期制御因子の少なくとも一部のものは母性特異的なものであり、体細胞型のものとは違う可能性が考えられる。このように母性由来とゲノム由来が発生のある時期において入れ替わる分子として他に Wee1、Nek2 が報告さ

表1 中期胞胚遷移 (MBT) における変化

	pre-MBT (1 2 回目までの卵割)	post-MBT (1 3 回目以降の卵割)
細胞周期	初期発生型細胞周期 (ギャップ期なし)	体細胞型細胞周期 (ギャップ期あり)
ゲノムからの転写	なし	あり
卵割	同調	非同調
細胞の運動性	なし	あり
チェックポイント機構	なし	あり
アポトーシス誘導	なし	あり

れている (Okamoto et al. 2002, Uto et al. 1999)。なお、なぜ母性由来とゲノム由来のアイソフォームが存在するのかはわかっていない。また Cyclin E に関しては、母性由来とゲノム由来で一次構造に違いがないことがわかっている。

(4) ショウジョウバエの MBT との比較

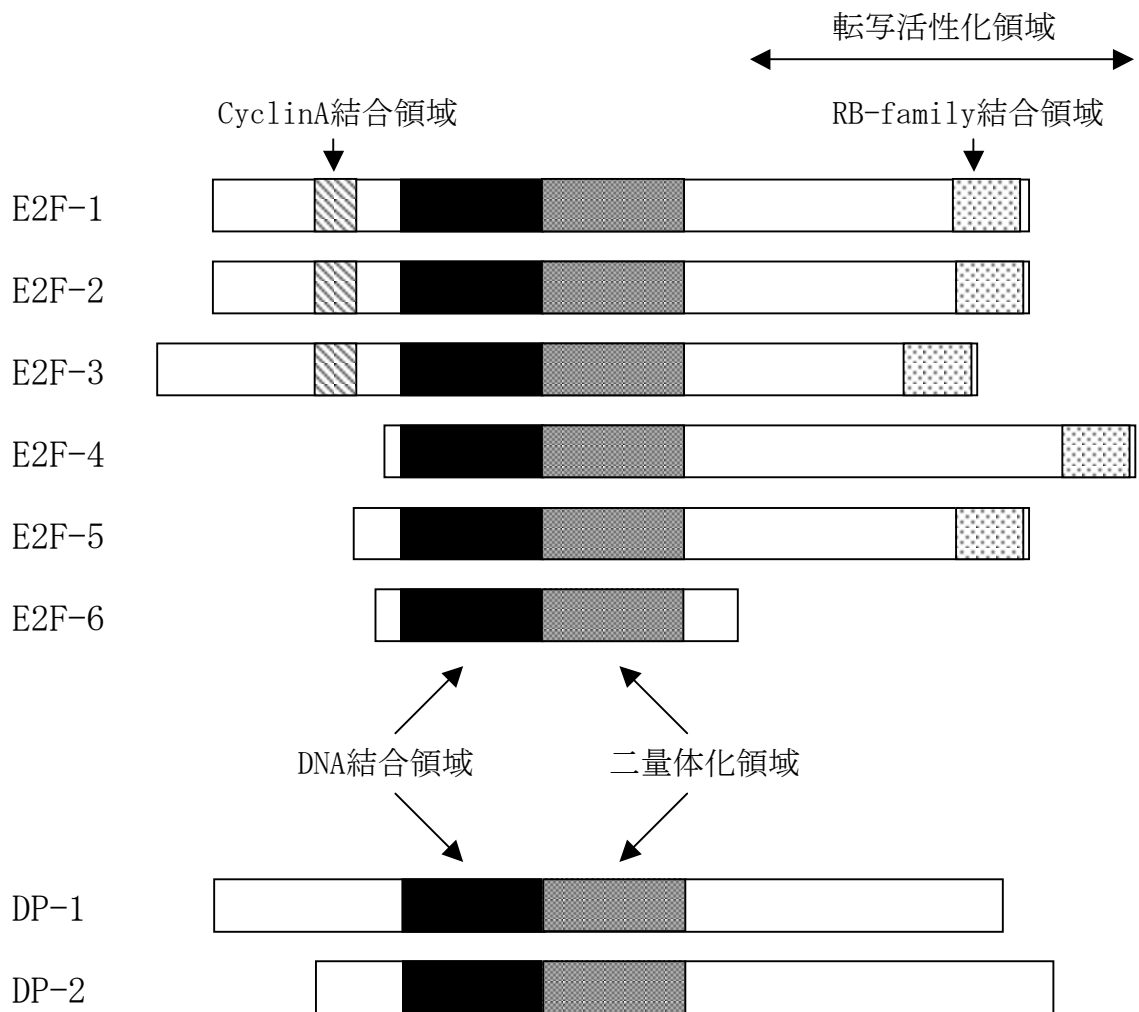
初期発生における母性因子の崩壊は、生物種によって時期の差はあるものの多くの生物種で観察されている。ショウジョウバエは受精後 13 回の細胞質の増加を伴わない、ギャップ期のない同調的な分裂を行うが、この時の分裂も母性因子に依存している。そして 14 回目の分裂サイクルにおいて細胞性胞胚となり、G2 期が出現する。ショウジョウバエの Cdc25A (String) は受精と共に蓄積し、14 回目の分裂サイクルの前に分解する。この分解は MBT における最初の細胞周期の遷移に関わっている (Edgar and Dater 1996)。アフリカツメガエルの Cdc25A の合成、分解が String と同じ意義を持つか否か、興味を持たれる。また、ショウジョウバエの Cdk 阻害因子である Dacapo は胚性因子として MBT 後に発現するが (Lane et al. 1996, deNooji et al. 1996)、アフリカツメガエルにおいても Cdk 阻害因子である p28^{Kix} は胚性因子として発現する (Shou and Dunphy 1996)。このように、ショウジョウバエとアフリカツメガエルで細胞周期制御因子の発現時期にいくつかの共通点が見られることから、初期発生過程における細胞周期制御メカニズムは進化的にかなりの部分で保存されている可能性がある。今後の詳細な比較検討が期待される。

(5) 転写因子 E2F

(5-1) E2F の概要

E2F (E2 promoter binding factor) はアデノウイルスの E2 遺伝子プロモーターの細胞性転写活性化因子として同定された (Kovesdi et al. 1986)。E2F 活性はアデノウイルスの発癌遺伝子産物の 1 つである E1A によって誘導されるが、細胞周期の G1/S 期の移行期に強く発現すること、多くの細胞増殖を制御する遺伝子上流域に E2F が結合することが明らかとなり、細胞の S 期進行を制御する転写因子であることが示唆された。その後、癌抑制遺伝子産物である pRb (retinoblastoma protein) が E2F と結合し、複合体を形成することで、その転写活性化能を抑制していることが明らかとなり、癌抑制遺伝子産物の標的因子として一躍脚光を浴びるようになった (Nevins 1992; Weinberg 1995)。

現在までに六種類の E2F タンパク (E2F-1~6) と二種類の DP タンパク (DP-1~2) が human の E2F ファミリーとして報告されている (参考図 4, Dyson 1998)。1 つの E2F タンパクと 1 つの DP タンパクが、二量体化に必要な L-X₆-L-X₆-L-X₆-



参考図4 human E2Fファミリーの構造

現在までに6種類のE2F蛋白質と2種類のDP蛋白質がhuman E2Fファミリーとして報告されている。E2FとDPは保存されたDNA結合領域と二量体化領域を持つ。各分子におけるCyclinA結合領域とRBファミリー結合領域の相対的な位置も合わせて示す

C-X₆-L からなるロイシンジッパー様構造を介して、ヘテロ二量体を形成することにより転写因子としての活性を発現する (Shan et al. 1992)。転写活性化ドメインは E2F-1~5 の C 末端側に存在する。E2F-6 には、この転写活性化ドメインが存在しない。よって、転写活性化作用はないが、他の E2F の転写活性化作用を阻害する負の制御因子として作用すると考えられた (Morkel et al. 1997; Trimarchi et al. 1998)。この予想とほぼ一致して、DNA メチル化酵素、ヘテロクロマチン結合蛋白質、ポリコムグループに属す蛋白質等と E2F-6 が複合体を形成して、細胞が G₀ 期にある時、プロモーター上の E2F 認識配列を占拠し、ヌクレオソーム構造を凝縮させることで下流の遺伝子の発現を抑制することがわかっている (Ogawa et al. 2002)。また、E2F-1~3 は N 末端側に CyclinA 結合ドメインを持つ (Krek et al. 1994; Krek et al. 1995)。DNA 上の E2F 結合配列は TTTCGCG で、c-myc、N-myc、c-myb、B-myb、デヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR)、チミジンリン酸化酵素 (TK)、DNA ポリメラーゼ α 、CycinE、CyclinA、cdc2、および E2F ファミリーに属する遺伝子等のプロモーター領域に存在することがわかっている (Dyson 1998)。ほとんどの組織、臓器で E2F ファミリーのすべてのメンバーの発現は検出されるが、それぞれで発現量、発現パターンが異なっている。例えば、E2F-1 では心臓、脳、肺、胎盤などでは発現量が多いが、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓では発現量が少ない (Shan et al. 1992)。また、細胞周期における E2F ファミリーの mRNA の発現パターンを見てみると、E2F-1 は G₁ 期初期では発現が認められず、G₁ 期後期から S 期にかけてその mRNA が増大する。E2F-4 や E2F-5 あるいは DP-1 は G₁ 初期から発現が認められ、中期でピークを示し、S 期までその発現が観察される (Sardet et al. 1995)。

(5-2) 体細胞周期における E2F の機能とその制御機構

E2F は、細胞周期の G₁/S 期において機能し、細胞の S 期進行を誘導する転写因子である。その活性は、細胞周期の G₀、G₁ 期において、癌抑制遺伝子産物である pRB (retinoblastoma protein) ファミリーに属する因子 (pRB、p107、p130) によって負に制御されている (Chellappan et al. 1991; Weinberg 1995; Dyson 1998; Harbour et al. 2000a; Harbour et al. 2000b)。E2F の転写活性化ドメインは C 末端側に存在するが、この領域内に pRB ファミリーとの結合ドメインが存在する。pRB ファミリーの癌抑性能に重要なポケット構造により (Lee et al. 1998)、E2F の転写活性化ドメインが覆われ、転写活性化能が阻害される (Flemington et al. 1993; Helin et al. 1993; Ross et al. 1999)。また、pRB は、その活性をリン酸化によって制御されており (Chen et al. 1989; Hinds et al. 1992)、G₀、G₁ 期において E2F に結合し、その活性を制御することができるのは、低リン酸化状態の pRB である (Weinberg 1995; Sherr 1996)。G₁ 期

の初期から中期にかけて、CyclinD-Cdk4/6 によるリン酸化を受け、続いて G1 期の後期に CyclinE-Cdk2 によるリン酸化を受けて、高リン酸化状態となり、pRB は不活性化し、E2F が解放される (Sherr 1996; Lundberg et al. 1998)。解放された E2F は CyclinE や、Cdc25A、DNA ポリメラーゼ α 等の、S 期開始に必要な因子群の転写を活性化することで、細胞の S 期進行を促す。

pRB が少なくとも、2 種類の Cyclin-Cdk 複合体によってリン酸化される必要性に関しては議論が絶えなかったが (Lundberg et al. 1998; Geng et al. 1999)、pRB が順にリン酸化を受けることによって、構造が変化し、相互作用し得る因子が異なることが示され、(Harbour et al. 1999; Zhang et al. 1999; Zhang et al. 2000) その生理学的な意義が明らかになりつつある。

また、E2F は pRB と結合したままプロモーター上に結合し、転写抑性因子として活性を持つ複合体として機能することも知られている (Weintraub et al. 1992; Hsiao et al. 1994; Johnson et al. 1994; Neuman et al. 1994; Adnane et al. 1995; Bremner et al. 1995; Sellers et al. 1995; Weintraub et al. 1995; Chow et al. 1996a; Chow et al. 1996b; Ferreira et al. 1998; Dyson 1998; Meloni et al. 1999; Zhang et al. 1999; Harbour et al. 2000b)。この機能には、pRB のポケット構造に結合した HDAC (histone deacetylase) (Brehm et al. 1998; Luo et al. 1998; Magnaghi et al. 1998)、SWI/SNF 複合体等のクロマチン再構成因子の機能が重要であり (Dunaief et al. 1994; Singh et al. 1995; Zhang et al. 2000)、プロモーター周辺のエンハンサーの活性を阻害し、転写活性化を抑制する。実際、HDAC、SWI/SNF 複合体と同時に結合している pRB が E2F によりプロモーター上にリクルートされ、転写抑制化複合体として機能することが示されている (Zhang et al. 2000)。この複合体が、CyclinD-Cdk4/6、CyclinE-Cdk2 による pRB のリン酸化に伴い、転写抑性能を失う、またはプロモーター上から外れることで、S 期開始に必要な因子群の転写が起こり、細胞の S 期進行が促進される (Harbour et al. 2000b)。

細胞の S 期進行には、pRB から解放された E2F が S 期開始に必要な因子群の転写を活性化することが重要なのか、またはプロモーター上で活性な転写抑性能を持つ pRB-E2F 複合体が不活性化することで、転写を抑えられていた因子の発現が起こることが重要なのか、あるいはそのいずれのメカニズムも重要なのかは明確でない。E2F が S 期開始に必要な因子群の転写を活性化することで S 期進行が促されるという考察は、その多くが、E2F を過剰発現させた実験結果から導かれているが、この系においては、過剰量の遊離 E2F が、プロモーター上で転写抑性因子として機能している pRB-E2F 複合体を、競合的な作用によって外してしまっている効果を合わせて見ている可能性を否定できない。この問題に対しては、E2F の過剰発現に依らない実験による解析が、今後の課題であ

る (Dyson 1998; Harbour et al. 2000b)。

(5-3) アポトーシス誘導における機能

pRB の機能が失われた細胞では、癌抑制遺伝子産物である p53 依存的なアポトーシスが誘導される (Dyson 1998; Harbour et al. 2000a; Harbour et al. 2000b)。これは細胞周期制御に必須である pRB 経路が破綻した細胞を除去するためのメカニズムである (Morgenbesser et al. 1994)。pRB ノックアウトマウスは胎児性致死となるが、これは無制御に広がったアポトーシスによるものである (Clarke et al. 1992; Jacks et al. 1992; Lee et al. 1992)。pRB の機能と p53 依存的アポトーシスを繋ぐのは、pRB 失活により遊離状態となった E2F-1 で、この機能は他の E2F ファミリーにはない (DeGregori et al. 1997)。遊離となった E2F-1 が p19^{ARF} (alternative reading frame) の発現を誘導する (Bates et al. 1998; Sherr 1998)。この p19^{ARF} が MDM2 (murine double minute 2) の機能を阻害することで、p53 が安定化し、p53 依存的アポトーシスが誘導される (Pomerantz et al. 1998; Zhang et al. 1998; Sherr 1998)。ただし、E2F-1 による p19^{ARF} の発現誘導は、E2F-1 の過剰発現により生じており (DeGregori et al. 1997)、in vivo において、遊離の E2F-1 が引き起こすアポトーシスの第一段階が p19^{ARF} の発現誘導であるかは不明であり、今後の解析が必要である (Harbour et al. 2000b)。

E2F により誘導されるアポトーシスには、p53 非依存的アポトーシスも存在する (Pan and Griep 1995)。このアポトーシスの誘導には、E2F は転写活性化ドメインを必要とせず、E2F の DNA 結合ドメインだけで十分である (Hsieh et al. 1997; Phillips et al. 1997)。このアポトーシスでは、細胞膜上に存在するデスレセプターの構成因子である TRAF2 の蛋白質量が低下し、NF- κ B 等による抗アポトーシスシグナル伝達経路が阻害されていることがわかっているが (Phillips et al. 1999)、E2F の DNA 結合ドメインの発現が、TRAF2 の蛋白質量低下にどのように繋がるのかは不明である。

E2F によって誘導されるアポトーシスには、p53 依存的と p53 非依存的アポトーシスの二種類があるわけだが、いずれも in vivo において機能していることがわかっている。pRB ノックアウトマウスでは、中枢神経系では p53 依存的アポトーシスが、末梢神経系では p53 非依存的アポトーシスが生じている (MacLeod et al. 1996)。二つのアポトーシス経路の、生体内における相対的な貢献度を解析していくことが今後の重要な課題である (Harbour et al. 2000b)。

(5-4) 初期発生における E2F の機能

最近、アフリカツメガエルの初期発生において、前後軸形成に関わる因子として、xE2F (xenopus E2F) が単離された (Suzuki et al. 2000)。xE2F は、そのアミノ酸配列の相同性から、human E2F-3 に相当する因子であると考えられる。xE2F の mRNA を胚にインジェクションすることで過剰発現させると、腹側、尾部のマーカ遺伝子の発現が誘導され、背側、頭部の形成が抑制された。また、xE2F の DNA 結合ドメインに、ショウジョウバエの転写抑制因子 engrailed の転写抑制化ドメインを繋いだ、優性不能型 xE2F を過剰発現させると、腹側、尾部の形成が抑制された。さらに、xE2F は Hox 遺伝子の発現を直接制御していること、また発生に関与する一方で、細胞周期制御には関わっていないことが示された (Suzuki et al. 2000)。この結果は、E2F には細胞周期制御、アポトーシス制御以外にも、発生を制御する機能が存在することを示している。これは、例えばマウスにおいて pRB/E2F 経路に変異が入ることで観察された表現型が、細胞周期、アポトーシスの制御に異常が生じることによるのか、あるいは、少なくとも部分的には発生を制御する因子に影響が生じることによるのか、という新たな疑問を投げかける (Harbour et al. 2000b)。ただし、過剰発現した際に xE2F、あるいは優性不能型 xE2F が Hox 遺伝子に直接影響するのは確かだとしても、内在性 xE2F が実際に Hox 遺伝子を制御しているのかは不明である。これは、xE2F の DNA 結合ドメインのみの変異体では効果が生じないことから考察できる。E2F が発生を直接制御するという可能性および、xE2F が細胞周期制御に関わらないという可能性は、さらなる解析を必要とする (Harbour et al. 2000b)。

xE2F の解析において、xE2F mRNA は母性因子として未受精卵にも存在し、MBT 前後に関わらず存在していることが示されたが (Suzuki et al. 2000)、xE2F タンパクの初期発生における発現パターンは不明である。しかし、アデノウイルス E2 プロモーター中の E2F 認識配列に対しての結合活性が、未受精卵、および初期胚の抽出液中に存在することが示されている (Philpott et al. 1994)。また、アフリカツメガエルの DP-1、2 (X1 DP-1、2) はタンパクとして MBT 以前の初期胚に存在し、未受精卵にも発現していることが示されている (Girling et al. 1994)。これらのことから、MBT 以前の胚にも E2F タンパクは存在していると考えられるが、転写が起これないとされている時期に、転写因子である E2F がどのように機能しているのかは、まったく不明である。また、体細胞周期においては、G1 期において E2F は pRB によって制御されているが (Weinberg 1995; Dyson 1998; Harbour et al. 2000a; Harbour et al. 2000b)、S 期、M 期のみを繰り返す初期発生細胞周期において、E2F はどのような制御を受けているのか、さらに MBT 以前の胚に pRB は存在するのか、といった疑問にも、今だ明確な答えは存在しない。

方法および材料

基本的な実験操作（電気泳動、大腸菌への遺伝子導入等）は一般的なプロトコール、特に「バイオ実験イラストレイテッド」1～5巻（秀潤社）を参考にした。

(1) 採卵および人工授精

実験を行う2～5日前に *xenopus laevis* (♀) に100 UのPEAMEXを尾部に皮下注射し、採卵を開始する12時間前に500 UのGONATROPINを同じく尾部に皮下注射した。また *xenopus laevis* (♂) に関しても精巣を摘出する12時間前に500 UのGONATROPINを尾部に皮下注射した。GONATROPIN注射後、水温を18～20°Cに保つことで、ほぼ正確に12時間後に *xenopus laevis* (♀) は卵を産み始めた。新鮮な卵のみを実験に用いるために *xenopus laevis* (♀) から絞り出した卵のみを1×MMR (0.1 M NaCl₂, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.5) の入った150 mmディッシュ中に採卵した。GONATROPIN注射後、12時間経過した *xenopus laevis* (♂) は氷水中で冷凍麻酔にかけた。その後、頸椎を解剖用ハサミで破壊し、開腹して精巣を摘出した。摘出した精巣は1×MMRを浸したキムタオル上に置き、4°Cに保管した。この状態で精巣は約一週間受精能を維持する。未受精卵を採取した150 mmディッシュから、未受精卵が乾かない程度に1×MMRを取り除いた後、摘出した精巣の一部を切り取り、ピンセットを用いてディッシュ中で十分にほぐした。その後ディッシュに十分量の水を加えた。この状態で10分間静置し、その後水を取り除き、脱ゼリー溶液 (2.5 % cysteine(w/v) in 1×MMR, pH 8.0, 要時調整) を加え、4分間静置した。その後、素早く1×MMRで5回、初期胚を洗った。その後、初期胚をフィコール溶液 (6 % Ficoll(w/v) in 0.1×MMR) 中に移した。

(2) インジェクション

インジェクターにはHARVARD社シリンジポンプMODEL PHD 2000(IW)を用いた。インジェクションに用いた針は針先の直径を33 μm、針先の長さを8 mmとなるように作成した。初期胚をインジェクションに用いる場合は、針を刺し込む際に初期胚が転がってしまうのを避けるために、ガーゼを敷いた150 mmディッシュにフィコール溶液を用意し、この中に移した。インジェクションした胚はスポイトを用いて採取し、別のディッシュに用意したフィコール溶液中に移した。このディッシュには底に1 %アガロースゲルを敷いておいた。これはフィコールの作用により初期胚がディッシュの底に張り付いてしまうのを防ぐためである。採取した初期胚は23°Cに設定したインキュベーター内に静置した。

(3) 初期胚からの RNA の抽出

グアニジン-塩化セシウム超遠心法を用いて行った。「バイオ実験イラストレイテッド」2巻、第9章『RNAの抽出』を参考にした。

初期胚のサンプリングを時間経過ごとに行い、各ポイントで70~100個の胚を回収し、1チューブに20~30個の胚を分注して液体窒素で急凍した後、 -80°C で保存した。胚の入ったチューブに500 μl のグアニジン溶液 (4 M guanidinium isothiocyanate, 20 mM sodium acetate (pH 5.2), 0.1 mM dithiothreitol (DTT), 0.5 % sodium *N*-lauroyl sarcosinate (sarcosyl) (w/v), 濾紙で濾過してから使用する。) を加えホモジナイズする。これを15 ml チューブに移し、さらに3.5 ml のグアニジン溶液を加えて4 ml のホモジェネートを作製した。このホモジェネートを20 G のニードルに20回程通し、ゲノムDNAを切断した。その後7000 rpm、20分間、室温で遠心し、不溶物を沈澱させ、上清を回収した。ポリアロマー製超遠心チューブをDEPC処理水 (0.2 % diethylpyrocarbonate (DEPC) (v/v), DEPCを加えた後、激しくボトルを振り、オートクレーブする。) で洗った後、5.7 M CsCl (5.7 M CsCl, 10 mM EDTA, 最終濃度0.2 % (v/v) になるようにDEPCを加えオートクレーブする。オートクレーブ前後の質量を計り、蒸発した分をDEPC処理水で補う。) を1.5 ml 入れ、この上にホモジェネートを界面を乱さないように静かに重層し、チューブを満たした。なお、5.7 M CsCl とホモジェネートの界面にマジックで印をつけておいた。スイングローター (SW 55 Ti) を用いてBECKMAN L-70 超遠心器で、35000 rpm、20時間、 18°C で遠心した。遠心終了後、密度勾配が崩れないように静かにチューブをローターから取り出し、パスツールピペットを液面すれすれに差し込み、溶液をマジックでつけた印まで取り除いた。その後パスツールピペットを新しい物に変えて、チューブの底面から5 mm程度のところまで溶液を取り除き、チューブを逆さにして残った溶液を除去した。ディスポーザブルのメスをバーナーで熱し、チューブの底面から5 mm程度のところを切断し、チューブの底を切り取った。70 % エタノールを加えてRNAペレットを洗い、10分間風乾した後、360 μl のDEPC処理水にRNAペレットを溶かし、新しいエッペンドルフチューブに移した。これに3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 40 μl 、100 % エタノール1 ml を加え、 -20°C で1時間放置した後、15000 rpm、10分間、 4°C で遠心し、RNAをペレットにした。上清を除去し、70 % エタノールで洗い、10分間風乾した後、100 μl のDEPC処理水にRNAペレットを溶かした。作製したRNA溶液は、 -80°C で保存した。また濃度は吸光度から算出した。

(4) RT-PCR

オリゴ(dT)プライマー(20 mer)を用いて、初期胚から抽出したRNAに対して

cDNA 合成を行った。「バイオ実験イラストレイテッド」3巻、第4章『RT-PCR』を参考にした。初期胚から抽出した RNA 3 μg にオリゴ(dT)プライマー (500 ng/ μl) 1 μl と DEPC 処理水を加え、total volume を 11 μl とした。この RNA プライマー混合液を 70°C で 10 分間インキュベートした後、氷上で 3 分間放置した。×5 first strand buffer (逆転写酵素 ; SUPERScript II に添付) を 4 μl 、0.1 M DTT を 2 μl 、2.5 mM each dNTPs mix を 2 μl を加え、42°C で 5 分間プレインキュベートした後、逆転写酵素 (SUPERScript II ; BRL 社) を 1 μl 加え、よく混合し、42°C で 50 分間インキュベートして cDNA を合成した。最後に 70°C、15 分間インキュベートして、反応を止めた。作製した cDNA 溶液は -20°C で保存し、0.5 μl ~ 1 μl を PCR の鋳型として用いた。

(5) GST 組み換え融合蛋白質の大腸菌での発現誘導および精製

試験管 4 本に 5 ml の LB 培地 (1 % bacto trypton(w/v), 0.5 % bacto yeast extract(w/v), 0.5 % NaCl(w/v), オートクレーブ後、冷めてから ampicilin を最終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で加える。)を用意し、LB プレート (1 % bacto trypton(w/v), 0.5 % bacto yeast extract(w/v), 0.5 % NaCl(w/v), 1.5 % agarose(w/v), オートクレーブ後、50°C 程に冷めてから ampicilin を最終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で加え、プレートに注いで固まらせる。) 上のコロニーから楊子で大腸菌を植え継ぎ、前培養を 37°C で 6~12 時間行った。2 本の 2 l 三角フラスコに 190 ml の LB 培地を用意し、前培養液を加え、本培養を 37°C で 2~4 時間行った。濃度が 0.25 mM となるように IPTG (SIGMA 社) を加え、18°C で 12 時間、発現誘導した。培養液を 250 ml 集菌管に移し、6000 rpm、10 分間、4°C で遠心し、上清を捨て、ペレットを 20 ml の氷冷した NETN (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.5 % NP-40(v/v)) で懸濁した。フラスコ 2 本分の懸濁液を 50 ml チューブ 1 本に移し、ソニケーターを用いて菌体を破碎した。9000 rpm、20 分間、4°C で遠心し、上清を回収した。これを 3 回繰り返し、上清から不溶性のゴミを完全に除去した。回収した上清に glutathione-sepharose 4B (Amersham Pharmacia 社) を 400 μl 加え、4°C で 2 時間反応させた。6000rpm、5 分間、4°C で遠心しビーズを回収し、エッペンドルフチューブに移した。1 ml の elution buffer (20 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 1 mM 2-ME, pH 8.0) でビーズを 10 回洗った後、reduced glutathione-NaCl buffer (100 mM reduced glutathione, 180 mM Tris, 120 mM NaCl, 要時調整) を 500 μl 加え、4°C で 30 分間反応させた。15000 rpm、20 分間、4°C で遠心し上清を回収した。残ったビーズには、再び reduced glutathione-NaCl buffer を 500 μl 加え、反応させた後、同様に上清を回収した。回収した上清をマイクロコン 100 に移し、12000 rpm、4°C で遠心して injection buffer (88 mM NaCl, 7.5 mM MgCl₂, 20 mM HEPES,

20 mM 2-ME, 5 % glycerol(v/v)) にバッファー置換した。その後さらに遠心を繰り返し、蛋白質溶液を 50~100 μ l まで濃縮した。エッペンドルフチューブに 5 μ l ずつ分注し、液体窒素で急凍した後、 -80°C で保存した。精製、濃縮した融合蛋白質溶液は、BSA (Bovine Serum Albumin) と共に泳動し、ゲルを CBB 染色して濃度を定量し、回収率、濃縮率、精製度を検定した。

(6) 初期胚からの SDS-PAGE サンプルの調整

初期胚 1 個につき、10 μ l の EBC buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 % NP-40(v/v)) を加えホモジナイズし、15000rpm、5 分間、 4°C で遠心した。上清を回収し、等量の 2 \times SDS-PAGE sample buffer を加え、 100°C で 5 分間インキュベートし、ゲルにアプライした。

(7) 初期胚を用いたレポーターアッセイ

二細胞期胚の両半球に、injection buffer に溶解したレポータープラスミドをインジェクションし、時間経過ごとに初期胚を回収した。Luciferase 活性が阻害されてしまうため、回収した初期胚は凍結保存せず、すぐに実験に用いた。初期胚 5 個を 1 サンプルとし、PBS で 2 回、室温に温めた 100 μ l の lysis buffer (β -Gal Reporter Gene Assay kit に添付) で 1 回洗った後、室温に温めた 100 μ l の lysis buffer を加え、15000 rpm、5 分間、 4°C で遠心し、上清を 50 μ l 回収し、25 μ l を β -Gal 活性の測定、25 μ l を Luciferase 活性の測定に用いた。

以下の操作は、 β -Gal Reporter Gene Assay kit (BOEHRINGER MANNHEIM 社)、および Luciferase Reporter Gene Assay kit (BOEHRINGER MANNHEIM 社) に添付のプロトコールに従って行った。

(7-1) β -Gal 活性の測定

substrate reagent と initiation reagent (いずれも β -Gal Reporter Gene Assay kit に添付) を調整し、室温に温めた後、上清 25 μ l に substrate reagent を 50 μ l 加え、ボルテックスを用いて混合した。室温で 15 分間放置した後、25 μ l の initiation reagent を加え、ボルテックスを用いて 3 秒間混合し、すぐにルミノメーターを用いて β -Gal 活性を測定した。

(7-2) Luciferase 活性の測定

Luciferase reagent buffer (Luciferase Reporter Gene Assay kit に添付) を調整し、室温に温めておき、上清 25 μ l に Luciferase reagent buffer を 50 μ l 加え、ボルテックスを用いて 3 秒間混合し、すぐにルミノメーターを用いて Luciferase 活性を測定した。

(8) *in vitro* キナーゼアッセイ

初期胚 5 個を 200 μ l EBC buffer でホモジナイズし、遠心後、上清を回収した。これに p13Suc1-agarose ビーズ (upstate biotechnology) を 5 μ l 加え、4°C で 1 時間反応させた。反応終了後、low salt buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100 (v/v), 0.1 M NaCl)、high salt buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100 (v/v), 1 M NaCl) で順にビーズを洗い、最後に kinase buffer (20 mM HEPES (pH 7.5), 15 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 100 u/ μ l aprotinin, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM β -glycerophosphate, 1 mM NaF) で洗った。0.2 mg/ml bovine serum albumin, 0.2 mg/ml histone H1、50 μ M [γ -³²P]ATP (0.12 mCi/ml) を含む kinase buffer を 25 μ l、ビーズに加えて 25°C で 20 分間反応させた。反応終了後、等量の 2× SDS-PAGE sample buffer を加え、100°C で 5 分間インキュベートし、SDS-PAGE により histone H1 を分離した。泳動後、ゲルを乾燥させ、Fuji BAS-2500 image analyzer を用いて ³²P の取り込みを検出した。

(9) 初期胚ゲノムの定量

初期胚 10 個を 600 μ l genome extraction buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.0), 10 mM EDTA, 1 % SDS (w/v), 100 μ g/ml proteinase K) でホモジナイズし、37°C で 12 時間インキュベートした。phenol/chloroform で蛋白質を変性除去後、エタノールでゲノムを沈降した。*xenopus* Cyclin D1 promoter の部分的な配列を特異的に増幅するプライマーを用いて、精製したゲノムを鋳型として定量的 PCR を行った。PCR 産物は 1 % agarose gel で泳動し、ethidium bromide で染色した。このシグナル強度を ATTO densitograph を用いて定量した。また場合によっては、ゲノム自体を泳動し、ethidium bromide で染色後、そのシグナルを定量した。

(10) 凍結切片の作成と染色

MEMFA buffer (100 mM MOPS (pH 7.4), 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 3.7 % formaldehyde (v/v)) 中で初期胚を 4°C で 12 時間固定した後、Tissue Tek OCT compaund (SAKURA) 中に包埋し、-80°C で凍結させた。CRIOSTAD を用いて凍結サンプルを 8 μ m の厚さで切片にし、シリコンコートしたスライドガラス (MATSUNAMI) 上に移した。切片が乾燥した後、ヘキストで核を染色し蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(11) 抗体

α -*xenopus* Cyclin E 抗体 (polyclonal) は His 融合蛋白質として大腸菌から精製した *xenopus* Cyclin E をウサギに免疫して作成した (妹尾 修士論文)。

ウサギ血清中の抗 *xenopus* Cyclin E 抗体は一般的なプロトコールに従ってアフィニティー精製した。 α -Cdc2 phospho-Tyr15 抗体 (polyclonal) は New England Biolabs 社から、 α -Cdc2 抗体 (monoclonal) は abcam 社から、 α - γ -tubulin 抗体 (monoclonal) は sigma 社から、 α -GST 抗体 (polyclonal) は Santa Cruz 社からそれぞれ購入した。

(12) ゲルシフトアッセイ

野生型プローブとして 5'-ATT TAA GTT TCG CGC CCT TTC TCA A-3'、変異型プローブとして 5'-ATT TAA GTT TCG ATC CCT TTC TCA A-3'を用いた。1 mg/ml のセンス鎖溶液とアンチセンス鎖溶液をそれぞれ 10 μ l ずつ混合し、94°Cで 5 分間、53°Cで 5 分間、20°Cで 5 分間インキュベートし、アニールさせ、T4 DNA kinase を用いて二本鎖の 5' 末端を 32 P ラベルした。初期胚 1 個あたり 10 μ l のゲルシフト用 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.9), 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol (DTT), 25 % glycerol (v/v), 0.5 mM PMSF, 100 u/ μ l aprotinin) で初期胚をホモジナイズし、遠心後、上清を回収した。10 \times binding buffer (200 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 400 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 % NP-40 (v/v)) を 0.75 μ l、1 mg/ml のソニケートしたサケ精子 DNA を 1 μ l、1 ng/ μ l の 32 P ラベルしたプローブを 1 μ l、初期胚ライセートを 5 μ l、D.W. を最終容量 12.5 μ l になるように加え、室温で 30 分間インキュベートした。必要に応じて 100 ng/ μ l、または 50 ng/ μ l の非ラベルプローブを 1 μ l、反応液に加えた。反応終了後、サンプルを 4 % neutral polyacrylamide gel を用いて 4°Cで泳動した。泳動終了後、ゲルを乾燥させ、Fuji BAS-2500 image analyzer を用いて 32 P ラベルしたプローブのシフトアップを検出した。

(13) 大腸菌株

本研究に用いた大腸菌株名とその遺伝子型を以下に記す。

DH5 α : *supE44, Δ lacU169, (ϕ 80lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1*

XL1-Blue : *recA⁻ (recA1, lac⁻, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, (F['] proAB, lacI^q, lacZ Δ M15::Tn10(Tc^r)))*

JM109 : *recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thi, Δ (lac-proAB) F['] [traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZ, Δ M15]*

BL21 (DE3) pLysS : *E. coli B, F⁻, dcm, ompT, hsdS (rB-mB⁻), gal, λ (DE3) [pLysS Cam^r]*

(14) PCR プライマー

本研究に用いた PCR プライマーを以下に記す。

xenopus Cyclin D1 promoter F : 5' - AAG AAG TGG CTG GTC TCT GG - 3'

xenopus Cyclin D1 promoter R : 5' - TGG CAG CCC TAT CTA TCT CC - 3'

xenopus vasa F : 5' - GAA GAA GAG GAT CGT CCA CG - 3'

xenopus vasa R : 5' - TAC AAC TAC TGG ACG CAC GC - 3'

xenopus septin F : 5' - ACC AAT CCT GAG ACA CCA GG - 3'

xenopus septin R : 5' - CAT CTG ACT CTG CAT CTG GC - 3'

xenopus D7 protein F : 5' - AGG TGG AGA CCT CAA CAT GG - 3'

xenopus D7 protein R : 5' - AGG TTC TGA AGC AGC ACT GG - 3'

xenopus GAPDH F : 5' - ACC AAG TCA TCA CCG TCT TCC - 3'

xenopus GAPDH R : 5' - GCC ATG TGA CAC ACA AGA TCC - 3'

結果

(1) 内在性 E2F の DNA 結合活性は初期発生を通じて存在する

MBT 以前の初期発生においては、接合体ゲノムからの転写活性がない。そのような環境に転写因子である E2F は存在するのか、またその DNA 結合活性は存在するのかを知るために、初期胚から作成したライセートを用いてゲルシフトアッセイを行った (図 1)。各発生ステージの初期胚を回収後、ライセートを作製し、初期胚 0.25 個に相当するライセートをアッセイに用いた。また、各ステージの初期胚ライセートを等量ずつ混合したライセートをシグナルの特異性を示すコントロール実験に用いた。結果、内在性 E2F は未受精卵から存在し、その DNA 結合活性は未受精卵から少なくとも原腸胚期 (St. 12) まで存在していることがわかった。またシグナルが飽和していないことを確認したことから (データ省略)、内在性 E2F の DNA 結合活性は初期発生において一定に存在することがわかった。さらにシグナルの位置が発生を通じて不変であることから、MBT 前後に関わらず E2F 複合体の構成は変化しないことが予想される。

(2) 内在性 E2F の転写活性は胞胚期において上昇する

内在性 E2F の転写活性の挙動を解析するために初期胚にレポータープラスミドをインジェクションし、レポーターアッセイを行った (図 2)。レポータープラスミドとして pEZ-WT-Luc を用いた。アデノウイルスの E2 遺伝子のプロモーター中に存在する E2F 認識配列を 2 コピー含むエンハンサーエレメントを、4 コピー同方向に直列につないだ人工プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子の上流に持つプラスミドである。一細胞期の初期胚に pEZ-WT-Luc を 400 pg インジェクションし、各発生ステージで回収した。ライセート作成後、初期胚 1.25 個に相当するライセートをアッセイに用いた。結果、内在性 E2F の転写活性は胞胚期において初めて検出され、その後発生が進むにつれて上昇することがわかった。

内在性 E2F の転写活性が初めて検出される時期は初期胚が MBT を迎える時期とほぼ同じである。MBT では細胞周期の変化、伸長がおこるが (Newport et al. 1982a, Masui et al. 1998)、この時期に細胞周期を正に制御する E2F の転写活性が出現し、上昇するのは意外である。この活性の生理的意義が何であるかを以下で解析していく。

(3) 優性不能型 E2F を用いた解析

(3-1) 優性不能型 E2F-1

胞胚期において出現し、その後上昇する内在性 E2F 活性が初期発生において

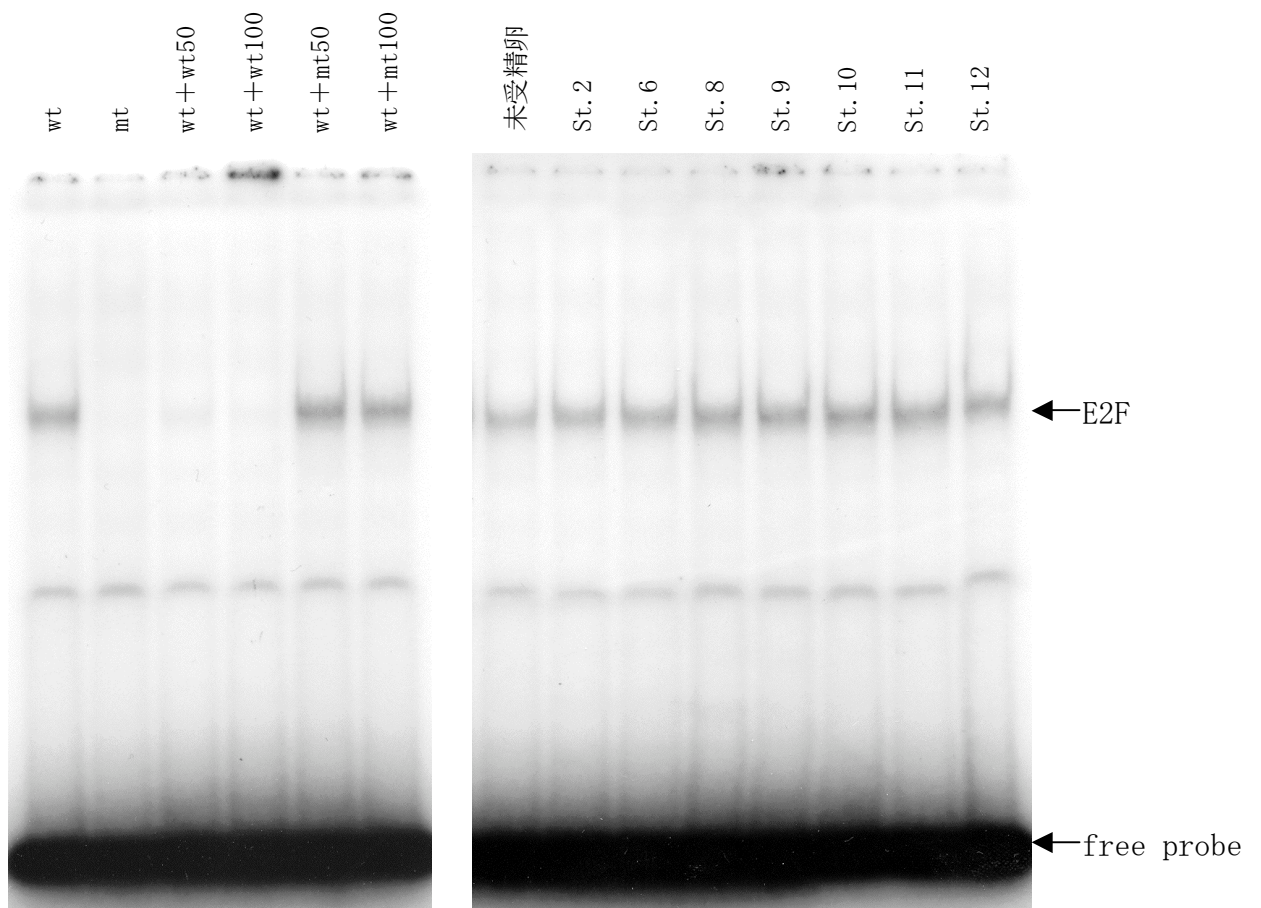


図1 内在性E2FのDNA結合活性は発生を通じて存在する

ゲルシフトアッセイにより初期発生におけるE2FのDNA結合活性の挙動を解析した。0.25個の初期胚に相当するライセートをアッセイに用いた。未受精卵からステージ12（原腸胚）までほぼ一定に存在し、シグナルの位置は不変であることがわかった。得られたシグナルは、E2F結合配列に変異を入れた変異型プローブ（mt）を用いた場合には検出されず、またラベルしていない野生型プローブ（cold wt）を50倍、100倍加えた場合失われることから、E2Fに特異的なシグナルであると考えられる。

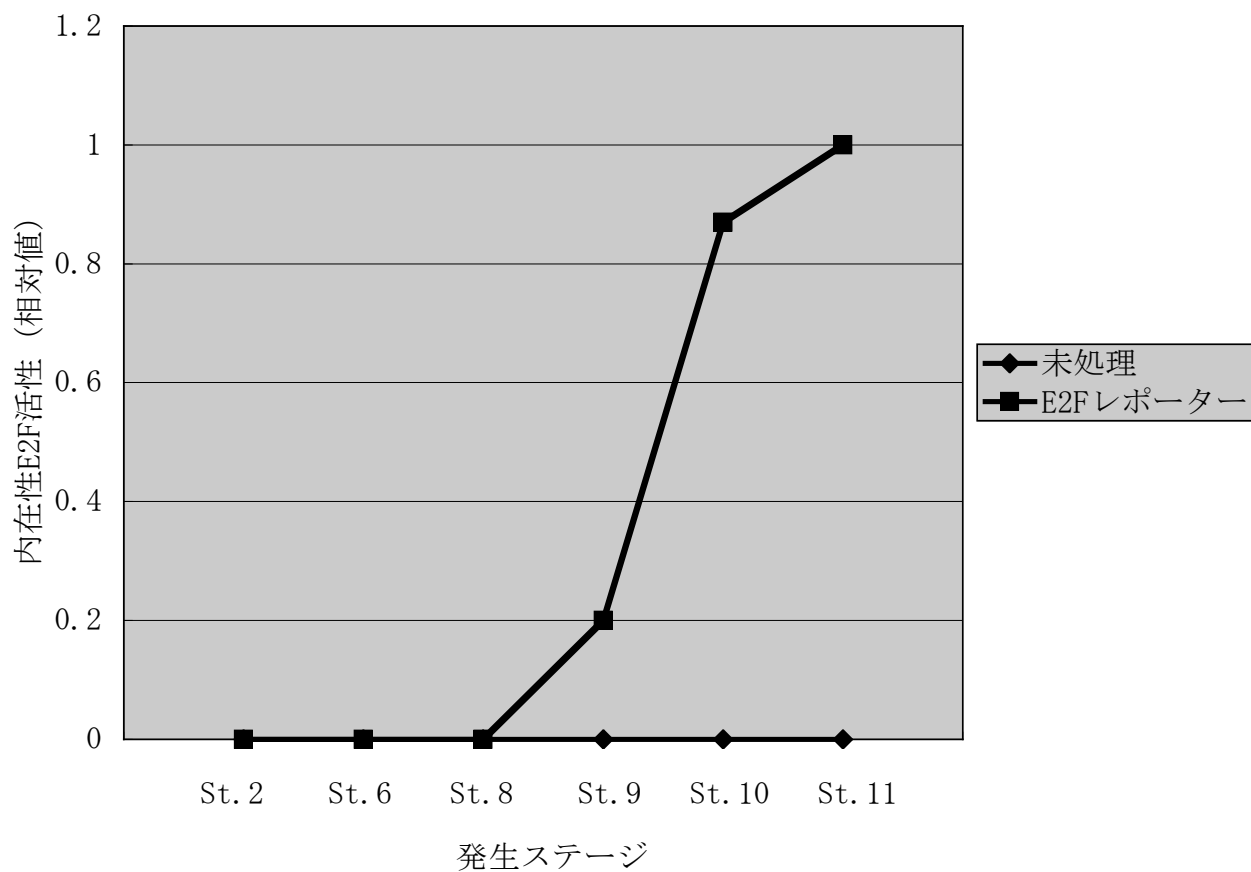


図2 内在性E2Fの転写活性は胞胚期において上昇する

ルシフェラーゼ遺伝子の upstream に E2F 認識配列をもつレポータープラスミド (pEZ-WT-Luc) 400 pg を初期胚にインジェクションし、内在性 E2F 活性を測定した。1.25 個の初期胚に相当するライセートをアッセイに用いた。E2F 活性は胞胚期において上昇することがわかった。グラフの値は St. 11 の E2F 活性に対する相対値を表す。

どのような役割を担っているかを知るために、この活性を阻害した際にどのような表現型が初期胚に生じるのかを観察することにした。この目的のために human E2F-1 の優性不能型変異体 (Dobrowolski et al. 1994) を GST 融合蛋白質として大腸菌から精製し、初期胚へのインジェクションに用いることとした (図 3-1A)。GST-DN E2F-1 は機能しうるドメインとして DNA 結合ドメインのみを持つ。精製した蛋白質を用いたゲルシフトアッセイの結果から、GST-DN E2F-1 は DNA 結合活性、および E2F 認識配列に対しての特異性を保持していることがわかった (図 3-1B)。また GST-DN E2F-1 と初期胚ライセートの量をふって行ったゲルシフトアッセイの結果の比較から、一個の初期胚に存在する内在性 E2F の DNA 結合活性は、40 ng の GST-DN E2F-1 の DNA 結合活性におおよそ相当することがわかった (図 3-1C)。以後の実験では、GST-DN E2F-1 を二細胞期の片半球にインジェクションする場合には 20 ng、一細胞期にインジェクションする場合には 40 ng 使用したが、これらの量は、内在性 E2F の DNA 結合活性と比較して同程度であり、生理的な意味を失う大過剰量ではないことがわかった。さらに初期胚にインジェクション後、原腸胚期まで初期胚内に存在し続けることを確認した (図 3-1D)。両生類であるアフリカツメガエルの初期胚において哺乳類であるヒトの E2F が機能しうることは既に報告されている (Akamatsu et al. 1998)。

(3-2) 優性不能型 E2F-1 は胞胚期に上昇する内在性 E2F 活性を抑制する

GST-DN E2F-1 のインジェクションによって内在性 E2F の活性を抑制することができるか、レポーターアッセイを用いて解析した。一細胞期の初期胚に pEZ-WT-Luc 400 pg を単独で、または GST-DN E2F-1 40 ng と共にインジェクションし、回収後、ライセートを作製した。初期胚 1.25 個に相当するライセートをアッセイに用いてルシフェラーゼ活性を測定した (図 3-2A)。結果、胞胚期における内在性 E2F 活性の上昇、およびその後の活性を GST-DN E2F-1 は抑制することがわかった。また GST-DN E2F-1 のインジェクションは、内部標準として共にインジェクションした pCMV・SPORT- β gal (サイトメガロウイルス由来のプロモーターの下流に β -ガラクトシダーゼ遺伝子をもつレポータープラスミド) から発現する β -ガラクトシダーゼ活性に影響を与えないことから、GST-DN E2F-1 による内在性 E2F 活性の抑制は特異的な効果であることがわかる (図 3-2B)。

(3-3) 優性不能型 E2F-1 は胞胚期以後の初期発生を妨げる

二細胞期に至った初期胚の片半球に GST-DN E2F-1 を 20 ng、またはコントロールとして GST を 20 ng インジェクションし、初期胚が示す表現型を観察した

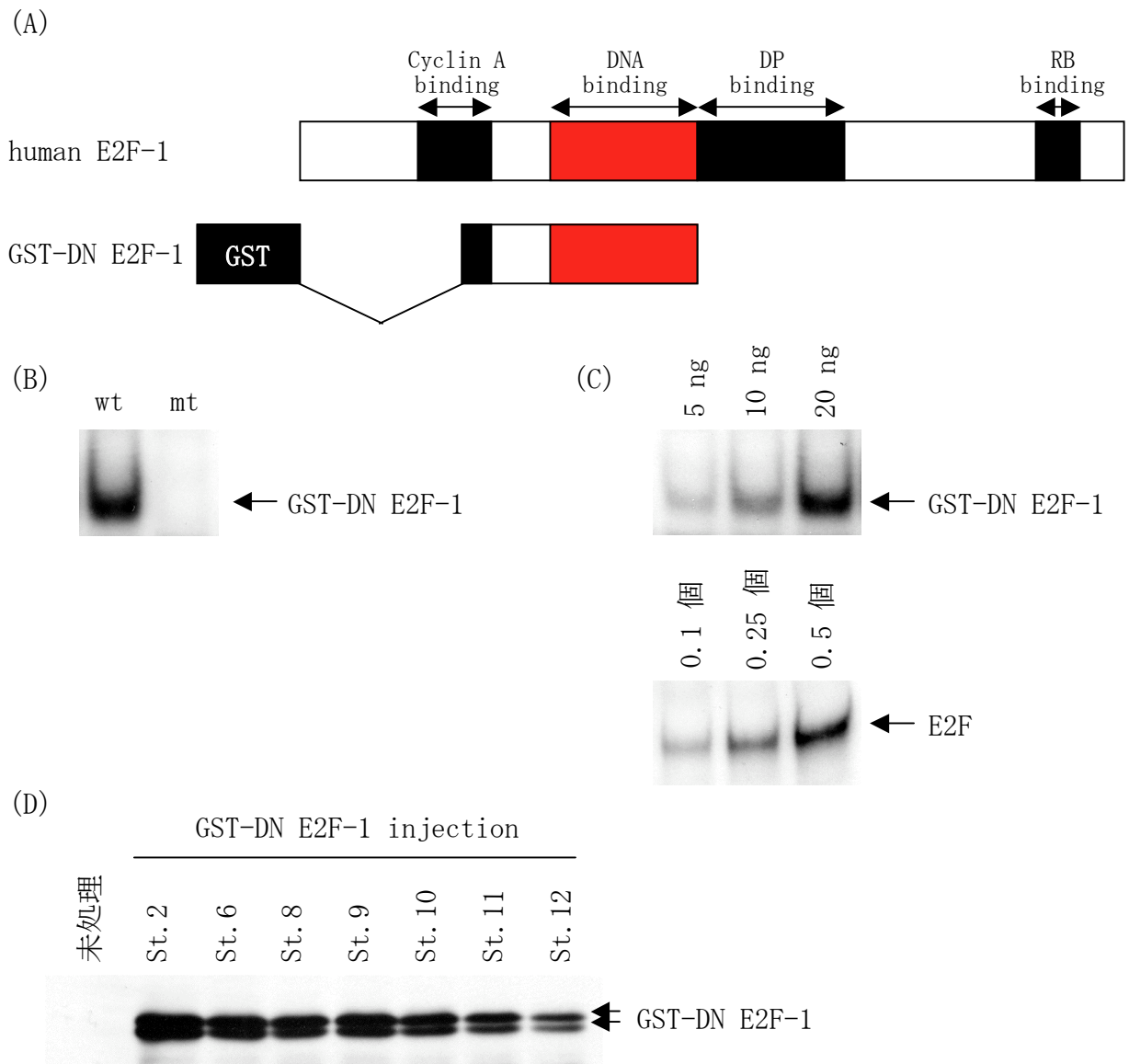


図3-1 優性不能型E2F-1

優性不能型E2F-1をGST融合蛋白質として精製した。(A)野生型human E2F-1とGST融合優性不能型E2F-1 (GST-DN E2F-1) の構造の比較。GST-DN E2F-1は機能し得るドメインとしてDNA結合ドメインのみを持つ。(B)50 ngの GST-DN E2F-1を用いてゲルシフトアッセイを行った。GST-DN E2F-1はDNA結合活性およびE2F認識配列に対しての特異性を有している。(C) GST-DN E2F-1と内在性E2FのDNA結合活性を比較した。(D) 二細胞期にインジェクションした20 ngのGST-DN E2F-1はステージ12まで分解されずに初期胚内に残る。

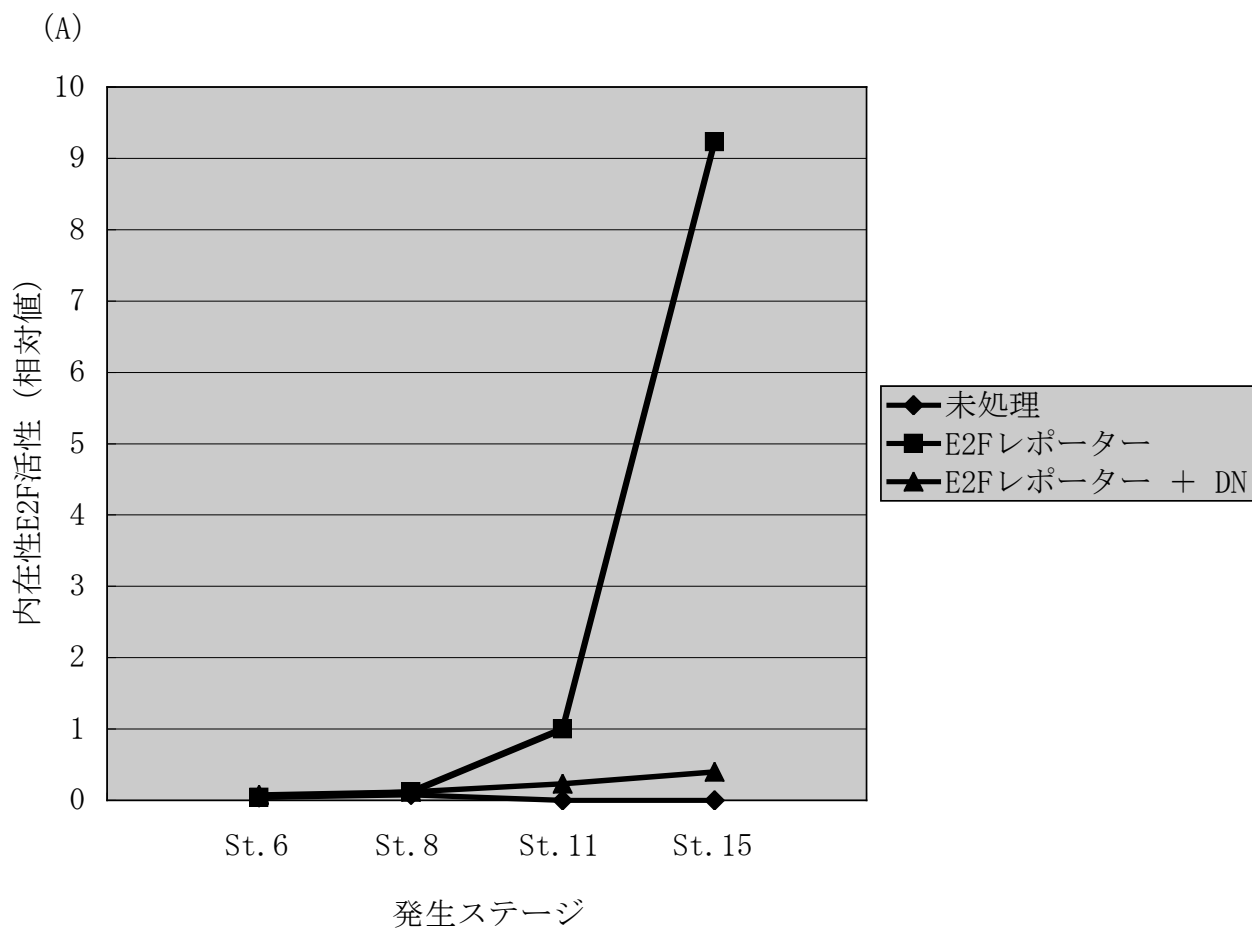


図3-2 優性不能型E2F-1は胞胚期に上昇する内在性E2F活性を抑制する

(A) 400 pgのE2Fレポータープラスミドと共に40 ngの優性不能型E2Fを一細胞期の初期胚にインジェクションした。1. 25個の初期胚に相当するライセートをアッセイに用いた。優性不能型E2Fは胞胚期におけるE2F活性の上昇、およびその後のE2F活性を阻害することがわかった。グラフの値はレポーターのみをインジェクションした初期胚のSt. 11におけるE2F活性に対する相対値を表す。

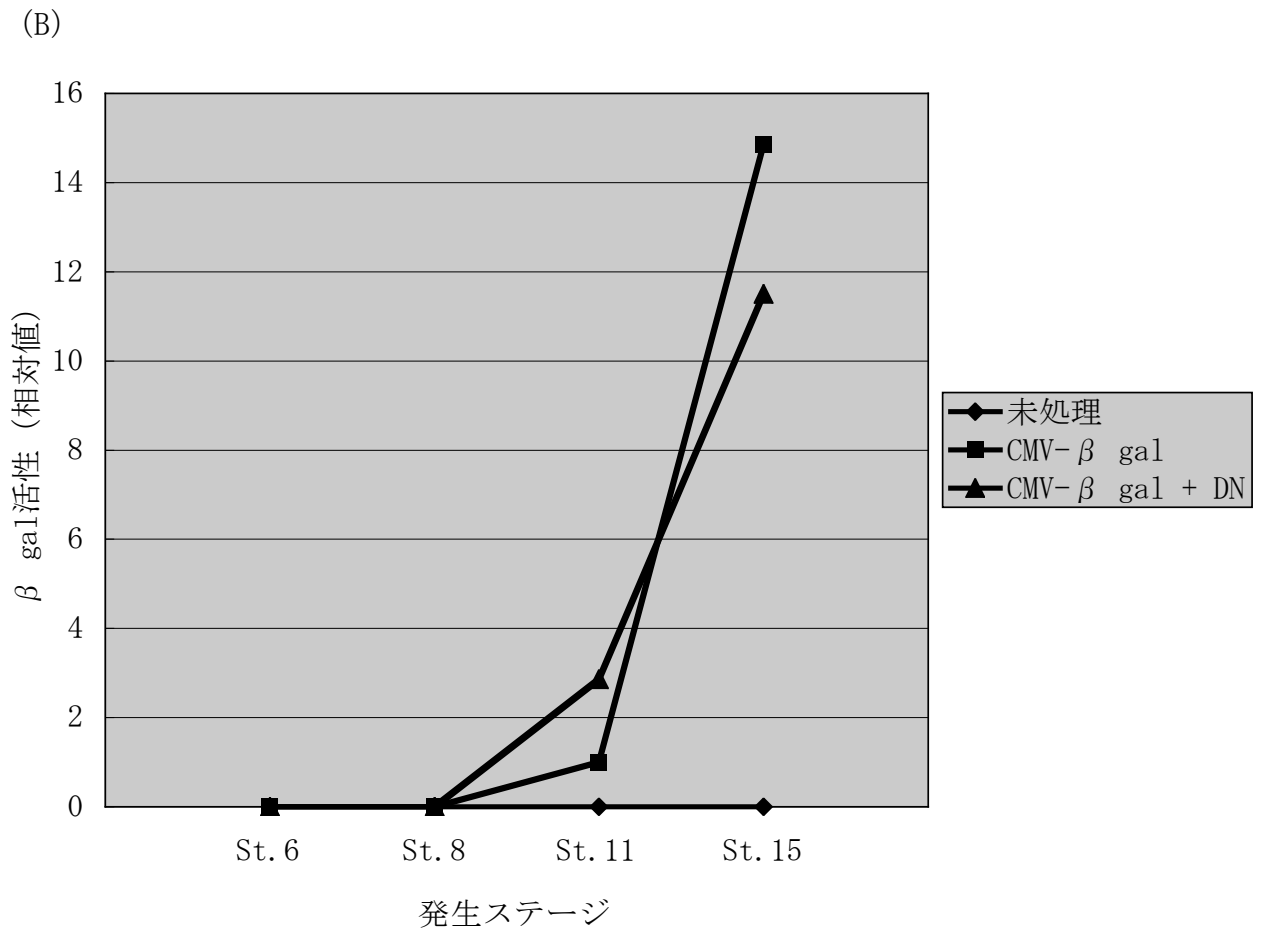


図3-2 (続き) 優性不能型E2F-1は胞胚期に上昇する内在性E2F活性を抑制する
 (B) 優性不能型E2Fをインジェクションしても β -galactosidase活性に影響がないことから、優性不能型E2Fによる内在性E2F活性の阻害は特異的な効果であることがわかる。1.25個の初期胚に相当するライセートをアッセイに用いた。グラフの値はレポーターのみをインジェクションした初期胚のSt. 11における β -gal活性に対する相対値を表す。

(図 3-3)。GST のインジェクションによつては発生を通じて、何の表現型も観察されなかった。このことから、大腸菌から精製した蛋白質を人為的に初期胚内に注入しても、その操作自体によつて初期胚に異常が生じることはないといえる。GST-DN E2F-1 のインジェクションによつては、発生が胞胚期 (~St. 9) に至るまでは何の表現型も観察されないが、胞胚期終了後、胚の表面の細胞が解離する発生異常を生じることがわかつた。そのまま初期胚を放置しても、発生を続けることはなかつた。

MBT 以前の、ゲノムからの転写活性がない環境においても、内在性 E2F は存在し、その DNA 結合活性も存在していたが (図 1)、その転写活性は検出できなかった (図 2)。また GST-DN E2F-1 のインジェクションによつて胞胚期までは何の異常も生じないことから (図 3-3)、MBT 以前の初期胚内に E2F は存在するが、少なくとも転写の活性化に関しては、何の機能も担っていないと考えられる。一方、内在性 E2F の転写活性は胞胚期において初めて検出され (図 2)、GST-DN E2F-1 のインジェクションによる効果は胞胚期終了後に観察されることから (図 3-3)、GST-DN E2F-1 のインジェクションによつて観察された発生異常は、胞胚期に上昇する内在性 E2F の転写活性を阻害したために生じた表現型であり、内在性 E2F の転写活性が、胞胚期後の正常な初期発生に必須であることが考えられる。

(3-4) 内在性 E2F 活性の阻害は母性 Cyclin E 蛋白質が分解する時期に影響しない

アフリカツメガエルの初期胚が MBT を迎えるのと同時に起こる現象として、MBT 以前の環境において大量に存在していた母性 Cyclin E 蛋白質の急激な分解がある (Howe et al. 1996, Hartley et al. 1997)。MBT 以前の初期胚の細胞は約 30 分に一周する非常に早い細胞周期をまわしている (Newport et al. 1982a, Masui et al. 1998)。このために初期胚は、MBT 前には多量の Cyclin E 蛋白質を必要とする一方で、MBT において細胞周期にギャップ期が加わり、細胞周期が長くなろうとするときには多量の Cyclin E 蛋白質が邪魔になり、急激に分解する必要があると考えられている (Howe et al. 1996, Hartley et al. 1997)。以上のように細胞周期が長くなることに対して、Cyclin E 蛋白質の分解は理にかなった現象である。このことから MBT、とくに MBT において生じる細胞周期変化のマーカーとして母性 Cyclin E 蛋白質の分解を捉えることができる。そこで、内在性 E2F の転写活性と MBT における細胞周期変化の関係を知るために、内在性 E2F の転写活性の阻害が母性 Cyclin E 蛋白質の分解に影響を与えるかを解析した (図 3-4)。一細胞期の初期胚に GST-DN E2F-1 を 40 ng インジェクションし、各発生ステージで回収した初期胚からライセートを作成した。α-

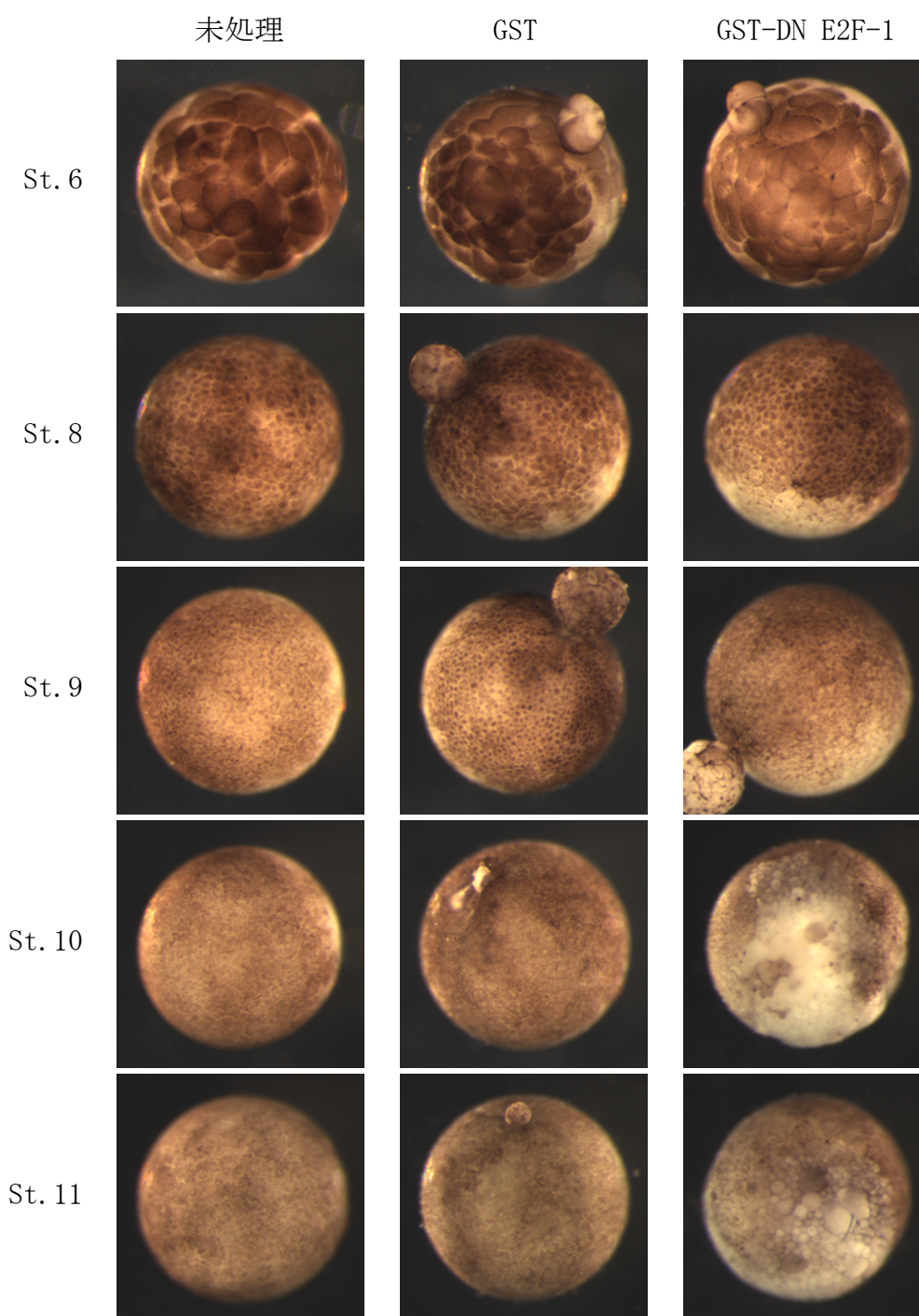


図3-3 優性不能型 E2F-1は胞胚期以後の初期発生を妨げる

二細胞期に至った初期胚の片半球にGST-DN E2F-1またはコントロールとしてGSTを20 ng (4 mg/ml蛋白質溶液を5 n1) インジェクションした。初期胚の発生が胞胚期に至るまではインジェクションによる影響は観察されないが、その後GST-DN E2F-1 をインジェクションした初期胚は表面の細胞が解離する異常を示す。

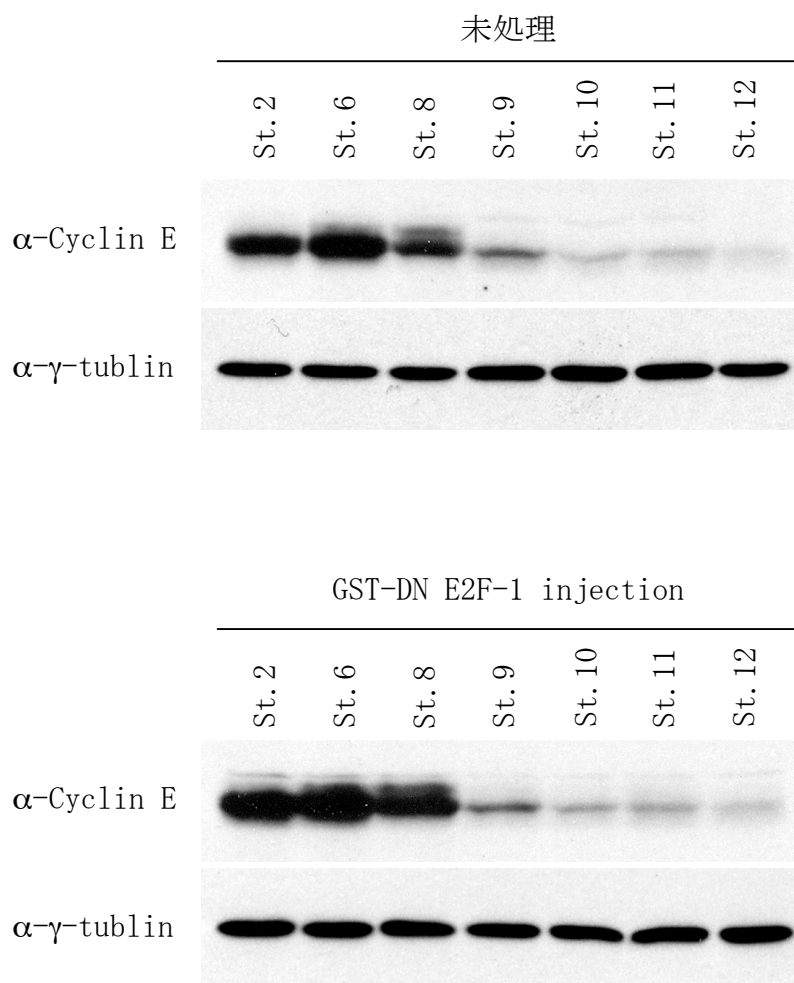


図3-4 内在性E2F活性の阻害は母性Cyclin E蛋白質が分解される時期に影響しない
 GST-DN E2F-1を一細胞期にインジェクションした初期胚、および未処理の初期胚を図に示した各ステージで回収し、ウェスタンブロットを行った。 α -Cyclin Eには1個相当の、 α - γ -tublinには0.5個相当の初期胚ライセートを用いた。結果、内在性E2F活性を阻害しても母性Cyclin E蛋白質が分解される時期に変化がないことがわかった。

xenopus Cyclin E 抗体 (妹尾 修士論文)、およびローディングコントロールを示すために用意した α - γ -tubulin 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。 α -*xenopus* Cyclin E 抗体を用いる場合には初期胚 1 個に相当するライセートを、 α - γ -tubulin 抗体を用いる場合には初期胚 0.5 個に相当するライセートを泳動した。結果、内在性 E2F の転写活性を阻害しても、母性 Cyclin E 蛋白質が分解される時期に変化がないことがわかった (図 3-4)。

(3-5) 内在性 E2F 活性の阻害により Tyr15 をリン酸化された Cdc2 の割合が増加する

母性 Cyclin E 蛋白質の分解と同様に、MBT と共に生じる分子レベルの現象として Cdc2 の 15 番目のチロシン (Tyr15) のリン酸化がある (Hartley et al. 1996, Shimuta et al. 2002)。Cdc2 は Tyr15 をリン酸化されると、そのキナーゼ活性が抑制される (Morgan 1995, Sherr and Roberts 1999)。哺乳類の培養細胞においては、このリン酸化は核に存在する Wee1 (Nurse 1990, 1997)、または細胞膜に結合している Myt1 によって生じるとされている (Morgan 1997)。アフリカツメガエル初期発生においては主に Wee1 によって生じることが報告されている (Nakajo et al. 2000, Okamoto et al. 2002)。MBT 以前の早い細胞周期では Cdc2 の高い活性が必要であり、MBT において細胞周期が長くなるためには、この活性が抑制される必要があると考えられる (Hartley et al. 1996, Shimuta et al. 2002)。以上のように、Cdc2 の Tyr15 のリン酸化が MBT において生じることは、細胞周期が長くなることに対して理にかなった現象といえる。よって母性 Cyclin E 蛋白質の分解と同様に、Cdc2 の Tyr15 のリン酸化も、MBT における細胞周期変化のマーカーとして捉えることができる。そこで、内在性 E2F の転写活性と MBT における細胞周期変化の関係を知るために、内在性 E2F の転写活性の阻害が、Cdc2 の Tyr15 がリン酸化される時期に影響を与えるかを解析した (図 3-5)。一細胞期の初期胚に GST-DN E2F-1 を 40 ng インジェクションし、各発生ステージで回収した初期胚からライセートを作成した。Cdc2 のリン酸化された Tyr15 を特異的に認識する α -Cdc2 phospho-Tyr15 抗体、および Cdc2 蛋白質の総量を調べるために用意した α -Cdc2 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。 α -Cdc2 phospho-Tyr15 抗体を用いる場合には初期胚 1 個に相当するライセートを、 α -Cdc2 抗体を用いる場合には初期胚 2 個に相当するライセートを泳動した。結果、内在性 E2F の転写活性を阻害しても、Cdc2 の Tyr15 がリン酸化される時期に変化は生じないことがわかったが、一方で Tyr15 がリン酸化された Cdc2 の割合が増加することがわかった。また GST-DN E2F-1 のインジェクションが Cdc2 蛋白質量に変化を与えることはなかった (図 3-5)。

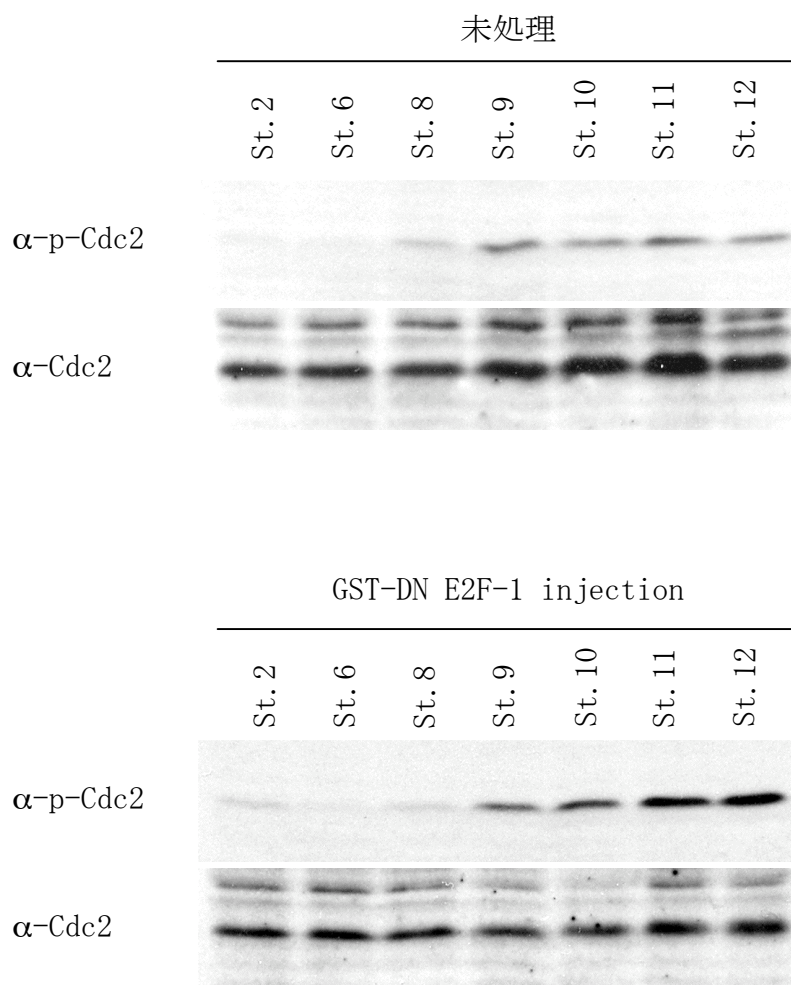


図3-5 内在性E2F活性の阻害によりTyr15をリン酸化されたCdc2の割合が増加する
 GST-DN E2F-1を一細胞期にインジェクションした初期胚、および未処理の初期胚を図に示した各ステージで回収し、ウェスタンブロットを行った。 α -p-Cdc2には1個相当の、 α -Cdc2には2個相当の初期胚ライセートを用いた。結果、Cdc2のTyr 15がリン酸化される時期に変化はないが、Tyr15をリン酸化されたCdc2の割合が増加することがわかった。また、Cdc2蛋白質の総量に変化はなかった。

(3-6) Tyr15 のリン酸化に伴い Cdc2 のキナーゼ活性は抑制される

Tyr15 がリン酸化された Cdc2 の割合が増加していることから、Cdc2 のキナーゼ活性が抑制されていることが予想された。そこで初期胚ライセートから p13Suc1 ビーズを用いて Cdc2 を回収し (妹尾 修士論文)、Histone H1 を基質として *in vitro* キナーゼアッセイを試みた。p13Suc1 は Cdc2、Cdk2 と特異的に結合するが、それら自身のキナーゼ活性を阻害しない。またそれらとサイクリンとの結合も阻害しない (Brizuela et al. 1987, Samiei et al. 1991, Bourne et al. 1996)。よって p13Suc1 によって沈降した Cdc2 はキナーゼ活性を有しており、キナーゼアッセイに用いることができる。しかし p13Suc1 ビーズによる沈降には、抗体を用いた免疫沈降と同等の特異性の高さは期待できないため、p13Suc1 によって沈降してきたキナーゼ活性が主に Cdc2 によるものであることを確かめる必要があった。そこで未成熟卵母細胞のライセートと未受精卵のライセートから p13Suc1 に相互作用する内在性キナーゼ活性を沈降し、キナーゼアッセイに用いた。結果、未成熟卵母細胞では基質である Histone H1 をリン酸化するキナーゼ活性が低く、逆に成熟卵母細胞では高かった (図 3-6)。アフリカツメガエルの未成熟卵母細胞は第一減数分裂前期 (Pro-I) で停止している。この時の Cdc2 の Tyr15 は高度にリン酸化されており、Cdc2 のキナーゼ活性は抑制されている (Ferrell et al. 1991, Nakajo et al. 2000)。一方、母体から産み落とされた成熟卵母細胞 (未受精卵) は第二減数分裂中期 (Meta-II) で停止している。この時期の Cdc2 は Mos/MAPK によって安定化、および活性化されており (Sagata et al. 1989, Sagata 1997)、また Mos によって Cyclin B の合成が促されているため (de Moor and Richter 1997)、高いキナーゼ活性を有している。実験結果はこれを反映したものであったことから、p13Suc1 によって沈降し、Histone H1 を基質としうるキナーゼ活性の大部分は Cdc2 によるものであると考えられる。一細胞期の初期胚に GST-DN E2F-1 を 40 ng インジェクションし、原腸胚期 (St. 10 と St. 12) において回収した。初期胚 5 個に相当するライセートをアッセイに用いた。結果、Cdc2 の Tyr15 のリン酸化によって Cdc2 のキナーゼ活性が抑制されていることがわかった (図 3-6)。

(3-7) 内在性 E2F 活性の阻害により初期胚は胞胚期終了後、細胞増殖を停止する

Cdc2 のキナーゼ活性が抑制されていることから、内在性 E2F 活性の阻害により、初期胚の細胞増殖に影響が生じていることを予想した。そこで、初期胚内のゲノム量を定量することで細胞増殖への影響を調べることにした。一細胞期の初期胚に 40 ng の GST-DN E2F-1 をインジェクションし、各発生ステージで初期胚を回収した。回収した初期胚からゲノムを精製し、これを鋳型にして定

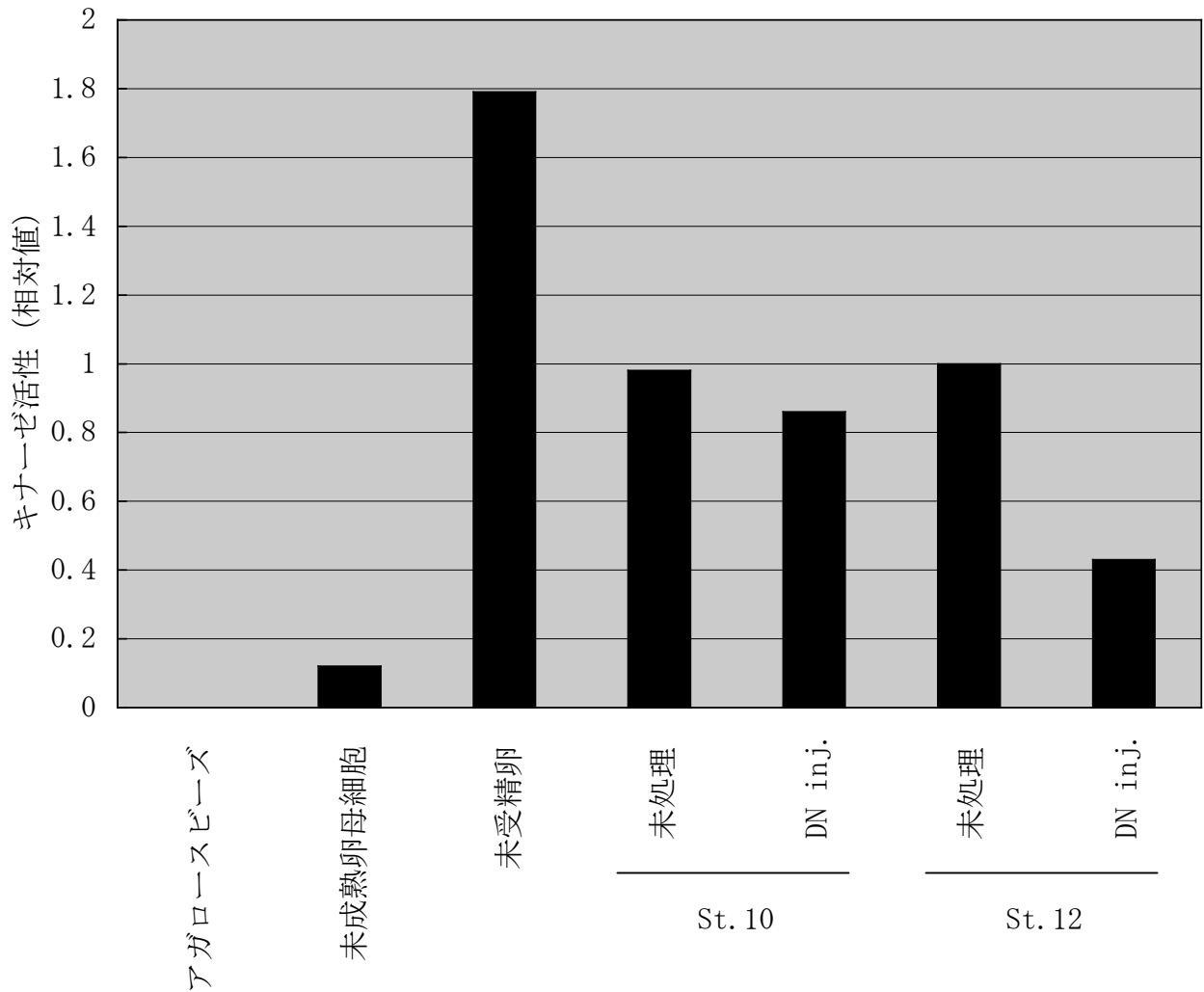


図3-6 Tyr15のリン酸化に伴いCdc2のキナーゼ活性は抑制される

p13Suc1アガロースビーズによって初期胚のCdc2を精製し、Histone H1を基質として*in vitro*キナーゼアッセイに用いた。優性不能型E2F-1のインジェクションによってCdc2のキナーゼ活性が抑制されていることがわかった。

量的な PCR を行った。プライマーには *xenopus* Cyclin D1 プロモーター内の 854 塩基を増幅するように設計したオリゴヌクレオチドを用いた（久保田 修士論文）。増幅された DNA 断片をアガロースゲル泳動し、EtBr で染色した後、デンシトメトリーを用いて定量した（図 3-7A、B）。結果、GST-DN E2F-1 をインジェクションした初期胚のゲノムは原腸胚期初期（St. 10）までは正常に増加するが、原腸胚期（St. 10~12）において増加しなくなることがわかった。また、内在性 E2F の活性が出現してからステージ 10 までの細胞増殖は、未処理の初期胚と比較して差がないことから、この間の細胞増殖に E2F の転写活性は必要ないと考えられる。

二細胞期の初期胚の片半球に GST-DN E2F-1 を 20 ng インジェクションし、原腸胚期中期（St. 11）において切片を作製し（図 3-7C）、ヘキストを用いて核を染色した。正常な半球とインジェクションした半球を比較すると、インジェクションした半球では核の数が明らかに少ないことがわかった（図 3-7D）。以上のことから、内在性 E2F の活性を阻害すると、初期胚の細胞は胞胚期終了後に細胞増殖を停止することがわかった。

(3-8) 増殖を停止した初期胚はアポトーシス様の表現型を示す

GST-DN E2F-1 をインジェクションした初期胚が示す、胚表面の細胞が解離する発生異常は（図 3-3）、MBT 後に初期胚に生じるアポトーシスの表現型に酷似している（Sible et al. 1997, Anderson et al. 1997, Stack et al. 1997）。そこで GST-DN E2F-1 のインジェクションにより生じる表現型とアポトーシスの関連を解析した。図 3-7D と同様に、片半球で細胞が解離している初期胚の切片を作製し、ヘキストで染色した後、共焦点顕微鏡を用いて観察した（図 3-8A）。結果、インジェクションした半球にある核の形は、歪で明らかに正常な半球にある核の形と異なっていることがわかった。また一細胞期に GST-DN E2F-1 を 40 ng インジェクションした初期胚を回収し、ゲノムを精製してアガロースゲル泳動したところ、アポトーシスの特徴の一つであるゲノムの断片化が生じていることがわかった（図 3-8B）。以上のことから、GST-DN E2F-1 のインジェクションによって起こる発生異常は、アポトーシスを反映して生じている可能性が高い。

(3-9) xE2F の DNA 結合ドメインのインジェクションによっても優性不能型 E2F-1 と同じ表現型が生じる

これまでの実験は、両生類であるアフリカツメガエルの初期胚に哺乳類であるヒトの E2F 蛋白質を用いて行ってきた。ヒトの E2F がアフリカツメガエルにおいて機能しうることは既に報告されているが（Akamatsu et al. 1998）、こ

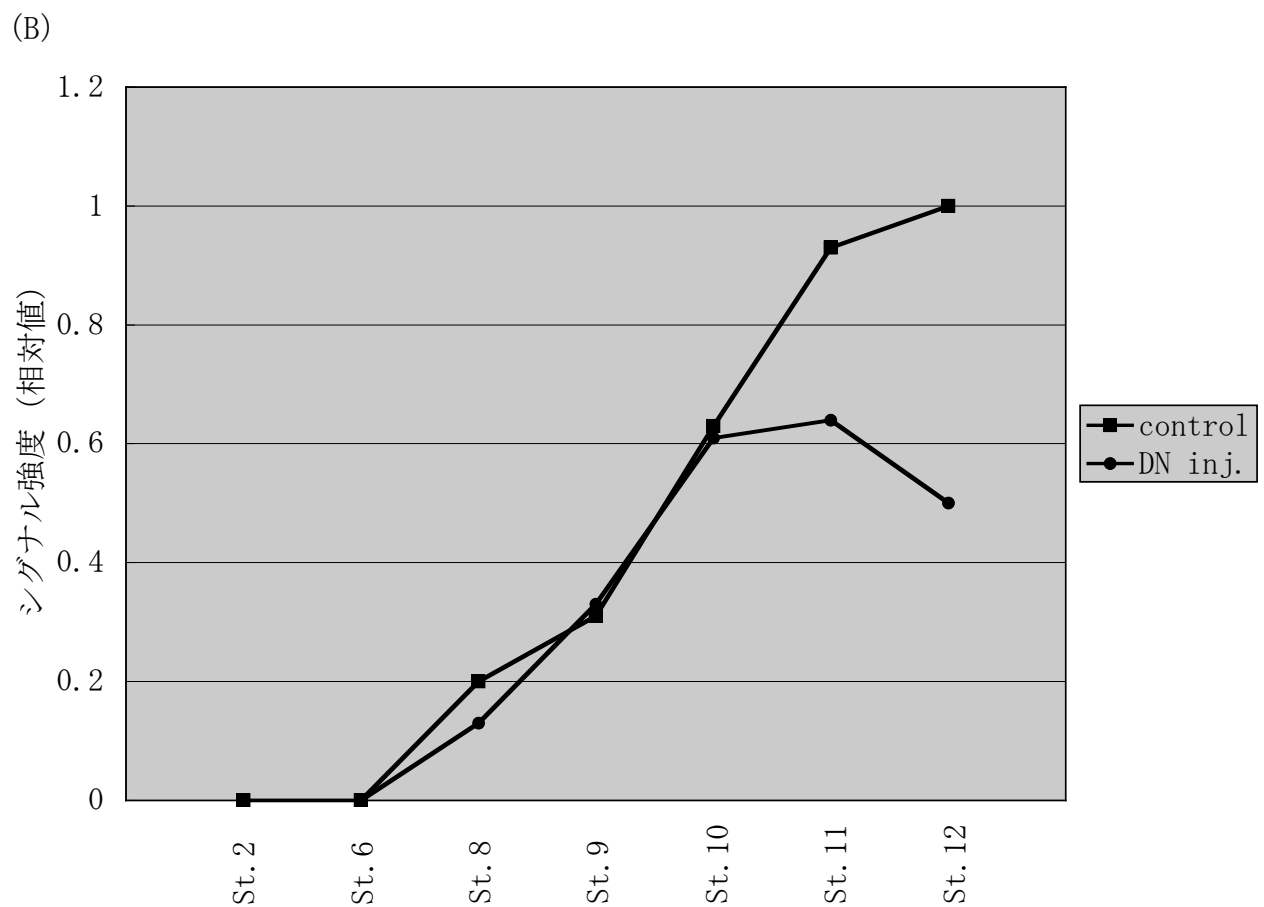
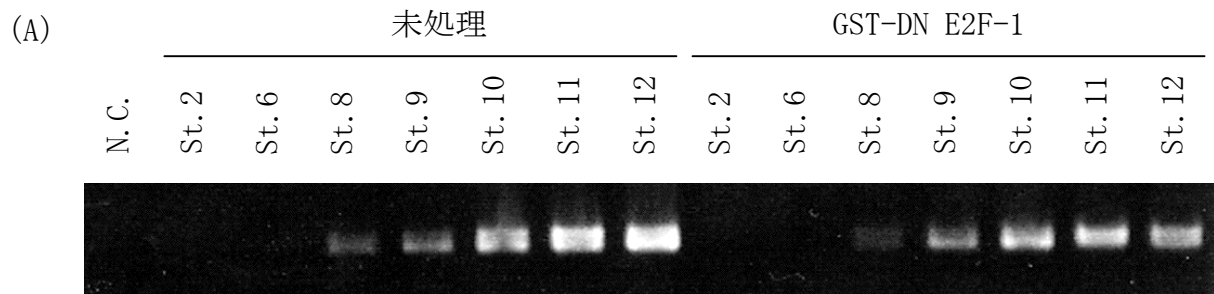
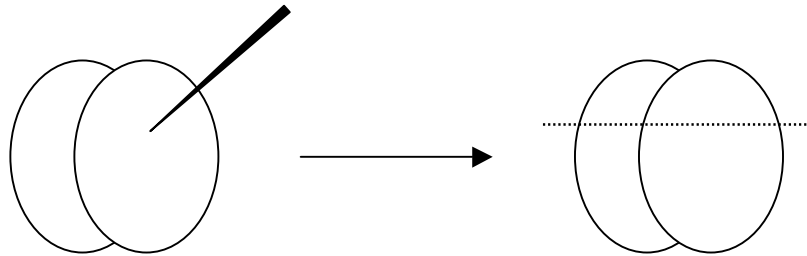


図3-7 内在性E2F活性の阻害により胞胚期終了後、初期胚は増殖を停止する

各ステージで回収した初期胚から精製したゲノムを鋳型にして、定量的なPCRを行った。(A) PCR産物を泳動し、EtBrで染色した像を示す。(B) (A) のシグナルをATTO densitographを用いて定量した。ステージ1 2における未処理の初期胚のシグナル強度に対する相対値をグラフ化した。

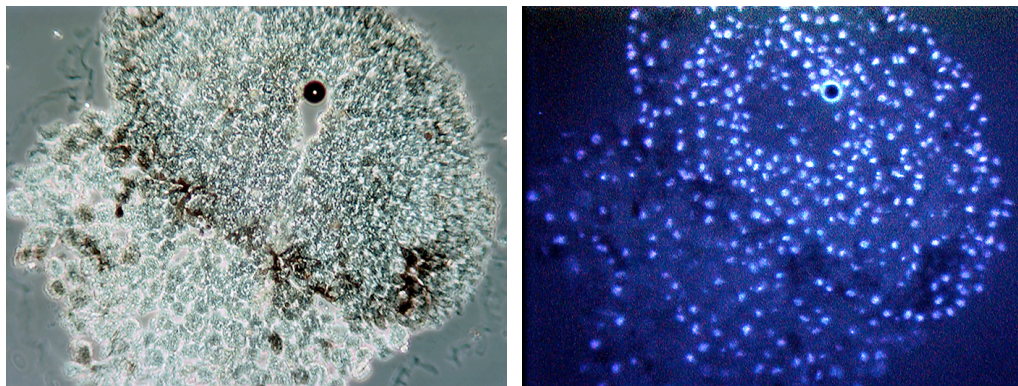
(C)



二細胞期の片半球に
インジェクション

St. 11において赤道面に
平行に切片を作成

(D)



P. C.

hoechst

図3-7 (続き) 内在性E2F活性の阻害により胞胚期終了後、初期胚は増殖を停止する

(C) 切片作成の概要を示す。(D) 作製した切片をヘキストで染色し蛍光顕微鏡で観察した。GST-DN E2F-1をインジェクションした半球(左斜め下半分)と未処理の半球(右斜め上半分)を比較すると、核の数に差があることがわかる。

れまで解析してきた発生異常が生物種の異なる蛋白質を用いたことによる人為的な要因によって生じたものである可能性を調べる必要があった。本研究を始めるにあたり、アフリカツメガエルの E2F は同定されていなかったが、2000 年にヒトの E2F-3 のホモログとして xE2F (*xenopus* E2F) が同定され、それをコードする mRNA の塩基配列が報告された (Suzuki et al. 2000)。この配列をもとに、xE2F の DNA 結合ドメインを唯一機能しうるドメインとして持つ変異体を GST 融合蛋白質 (GST-xE2F DB) として大腸菌で発現、精製し初期胚にインジェクションした (図 3-9A)。結果、GST-DN E2F-1 をインジェクションした場合と同様の発生異常が GST-xE2F DB のインジェクションによっても生じることがわかった (図 3-9B)。

(4) 野生型 E2F を用いた解析

(4-1) 野生型 E2F-1 は卵割の遅れを引き起こす

内在性 E2F の転写活性の挙動を調べるために行ったレポーターアッセイの結果から、その転写活性は胞胚期において初めて出現することがわかったが (図 2)、胞胚期には MBT があり、MBT では細胞周期が長くなることを考えると、この結果は意外である。なぜなら、培養細胞を用いた実験で、G0 期にある細胞に E2F を過剰発現すると S 期へと進行させることができることから明らかなように (Shan et al. 1994, Qin et al. 1994, Kowalik et al. 1995, Field et al. 1996, Philips et al. 1997, Hsieh et al. 1997, Arata et al. 2000)、E2F は細胞周期を回そうとする、正の制御因子だからである。細胞周期を正に制御する E2F の活性が MBT とほぼ時を同じくして出現する意義を解析するために、初期胚への E2F 活性の過剰導入を試みた。

ヒトの野生型 E2F-1 を GST 融合蛋白質として大腸菌で発現、精製した (図 4-1A)。二細胞期の初期胚の片半球に GST-WT E2F-1 を 5 ng インジェクションして初期胚を観察したところ、インジェクションした半球で卵割の遅れが生じることがわかった (図 4-1B)。また一細胞期の初期胚に GST-WT E2F-1 を 10 ng インジェクションし、回収後、ゲノムを精製してその量を調べたところ、インジェクションした初期胚のゲノム量は未処理の初期胚と比較して少ないことがわかった (図 4-1C)。以上から GST-WT E2F-1 には、MBT 以前の初期胚の細胞周期を長くする効果があると考えられる。また、インジェクションした GST-WT E2F-1 は少なくとも受精後 10.5 時間まで初期胚内に安定に存在することを確かめた (図 4-1D)。

アフリカツメガエルの初期胚一個の体積はおよそ 1 μ l で、哺乳類培養細胞の 10^6 個に相当する。GST-WT E2F-1 10 ng と培養細胞 (293, HeLa) の内在性 E2F 量を比較したところ、GST-WT E2F-1 10 ng は、およそ 10^5 個の培養細胞中に存

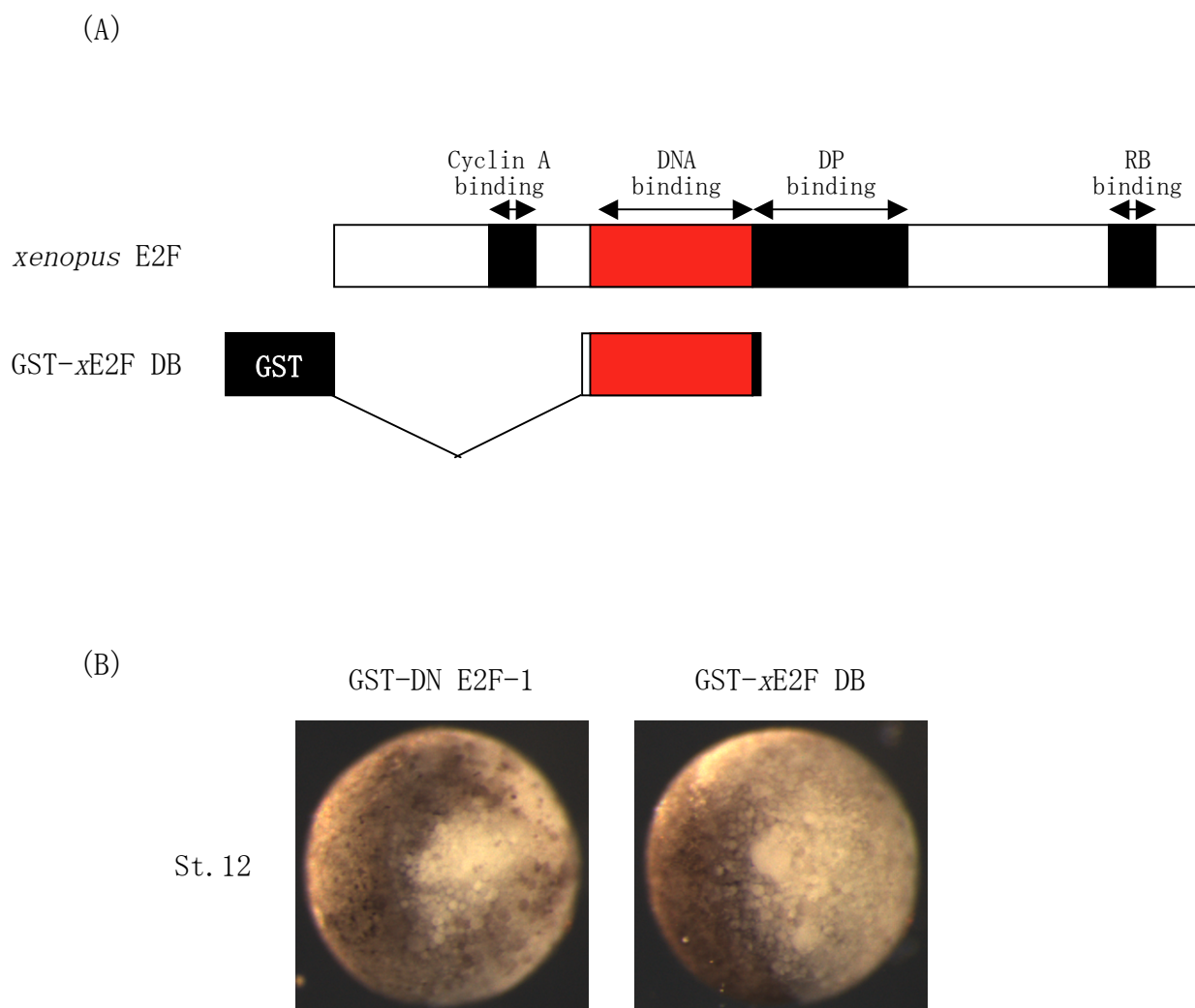


図3-9 *xenopus* E2FのDNA結合ドメインによっても優性不能型E2F-1と同じ表現型が生じる

(A) *xenopus* E2FとGST-xE2F DBの構造を示す。 GST-xE2F DBは機能しうるドメインとしてDNA結合ドメインのみを持つ。(B) 二細胞期の片半球にGST-DN E2F-1またはGST-xE2F DBを20 ngインジェクションした。胚表面の細胞が解離する発生異常がGST-xE2F DBのインジェクションによっても生じる。

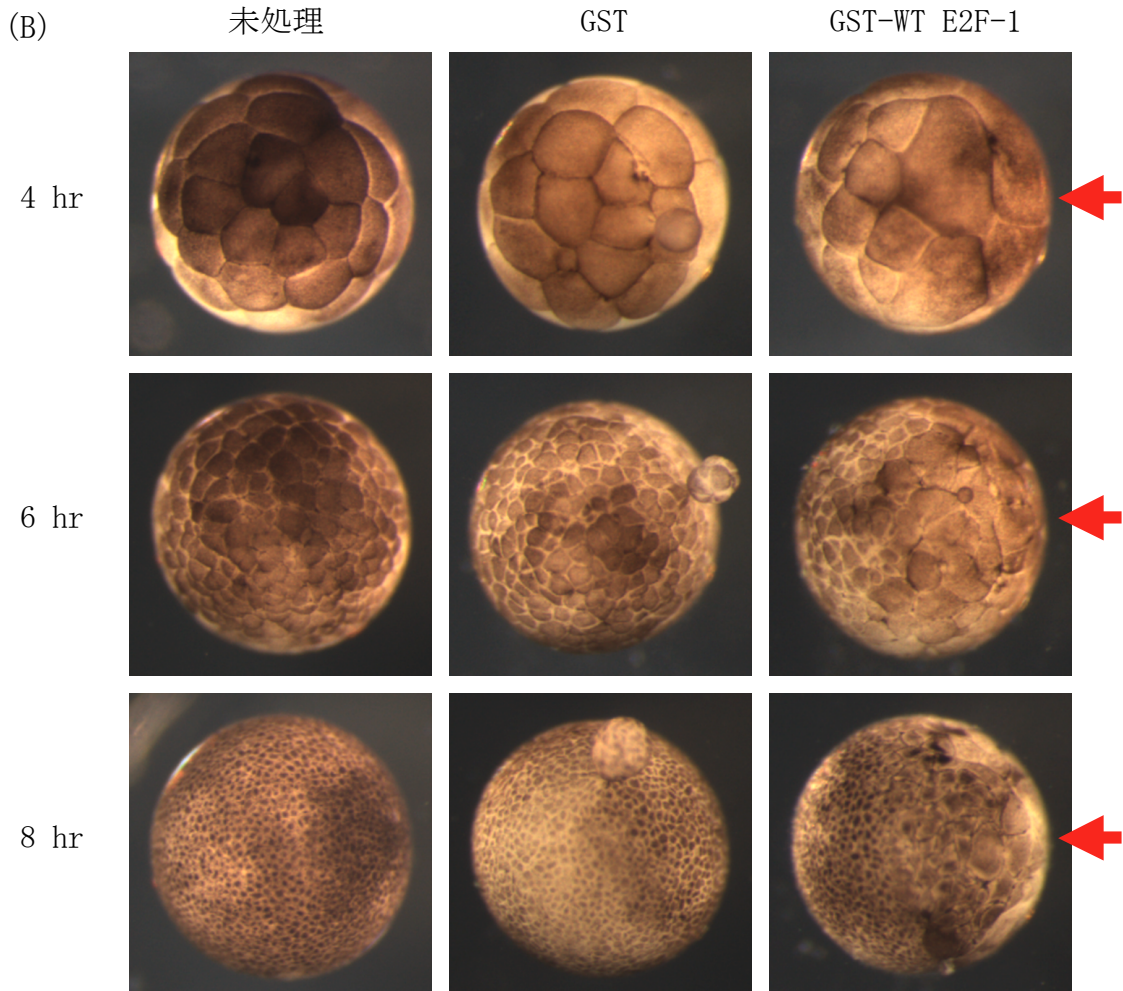
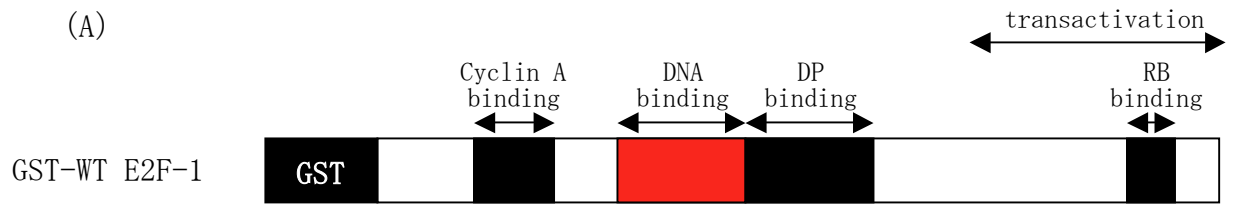
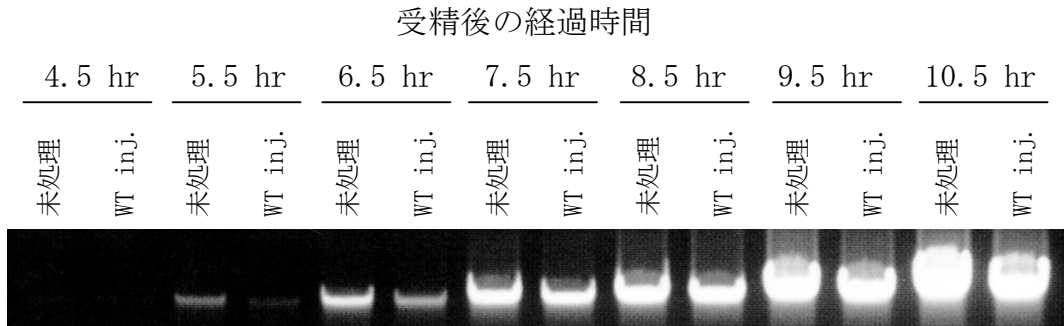


図4-1 野生型 E2F-1は卵割の遅れを引き起こす

(A) GST-WT E2F-1の構造を示す。(B) 二細胞期に至った初期胚の片半球に GST-WT E2F-1またはコントロールとしてGSTを5 ng (1 mg/ml蛋白質溶液を5 n1) インジェクションした。GST-WT E2F-1をインジェクションした片半球 (矢印で示した側の半球) で卵割の遅延が生じた。図の時間は、受精から経過した時間を示す。4 hrがSt.6に、6 hrがSt.8に、8 hrがSt.9に相当する。

(C)



(D)

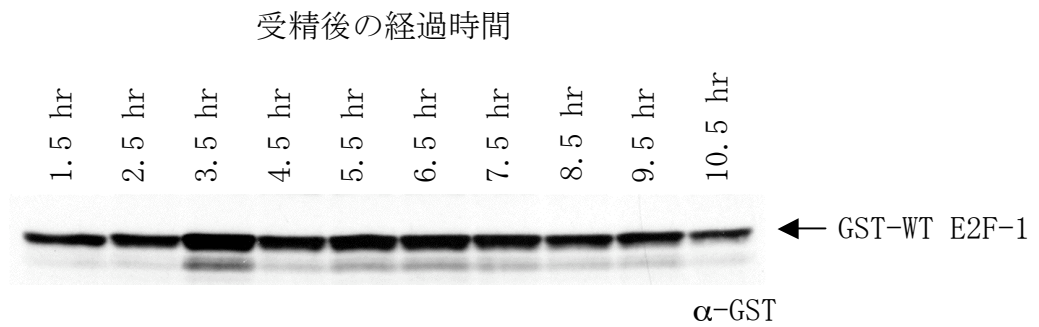


図4-1 (続き) 野生型 E2F-1は卵割の遅れを引き起こす

(C) 一細胞期にGST-WT E2F-1を10 ng (1 mg/ml蛋白質溶液を10 n1) インジェクションした。図に示した時間で回収し、ゲノムを精製した。未処理の初期胚と比較して、インジェクションした初期胚ではゲノム量が少ないことがわかる。

(D) 図に示した時間でインジェクションした初期胚を回収し、α-GST抗体を用いてウェスタンブロットを行った。インジェクションしたGST-WT E2F-1は初期胚内で安定に存在することがわかる。

在する E2F 量に相当した (データ省略)。よって初期胚にインジェクションした GST-WT E2F-1 の量は、 10^6 個の培養細胞に存在する E2F 量を超えるような大過剰量ではないことがわかった。

(4-2) 野生型 E2F-1 のインジェクションは母性 Cyclin E 蛋白質が分解する時期に影響しない

MBT における細胞周期変化のマーカーとして捉えることができる現象の一つである母性 Cyclin E 蛋白質の分解に対して、野生型 E2F-1 のインジェクションが与える影響を解析した。一細胞期の初期胚に GST-WT E2F-1 を 10 ng インジェクションし、回収後ライセートを作製して、 α -*xenopus* Cyclin E 抗体によるウェスタンブロットを行った (図 4-2)。GST-WT E2F-1 のインジェクションにより、母性 Cyclin E 蛋白質が分解する時期は変化しないことがわかった。GST-WT E2F-1 のインジェクションにより、卵割が遅くなっていることは明らかであるが (図 4-1)、母性 Cyclin E 蛋白質の状態に何の変化もないことから、初期胚の細胞周期は母性 Cyclin E 蛋白質の分解がなくても長くなり得ることがわかる。

(4-3) 野生型 E2F-1 のインジェクションにより Cdc2 がリン酸化される時期は遅くなる

MBT における細胞周期変化のマーカーとして捉えることができる現象の一つである Cdc2 の Tyr15 のリン酸化に対して、野生型 E2F-1 のインジェクションが与える影響を解析した。一細胞期の初期胚に GST-WT E2F-1 を 10 ng インジェクションし、回収後ライセートを作製して、 α -Cdc2 phospho-Tyr15 抗体によるウェスタンブロットを行った (図 4-3)。結果、GST-WT E2F-1 のインジェクションによって、Cdc2 の Tyr15 がリン酸化される時期が 30 分から 1 時間遅くなることがわかった。母性 Cyclin E 蛋白質が分解する時期は変化しない一方で、Cdc2 の Tyr15 がリン酸化される時期に影響があるのは意外であった。この点に関しては後で考察する。また、GST-WT E2F-1 のインジェクションにより、卵割が遅くなっていることは明らかであるが (図 4-1)、Cdc2 の Tyr15 のリン酸化状態に何の変化もないことから、初期胚の細胞周期は Cdc2 の Tyr15 のリン酸化がなくても長くなり得ることがわかる。

(4-4) 野生型 E2F-1 のインジェクションによる卵割の遅れは転写阻害剤によって緩和する

GST-WT E2F-1 のインジェクションによる卵割の遅れが、GST-WT E2F-1 の転写活性に依存した現象であるかを調べるために、転写阻害剤である α -アマニチ

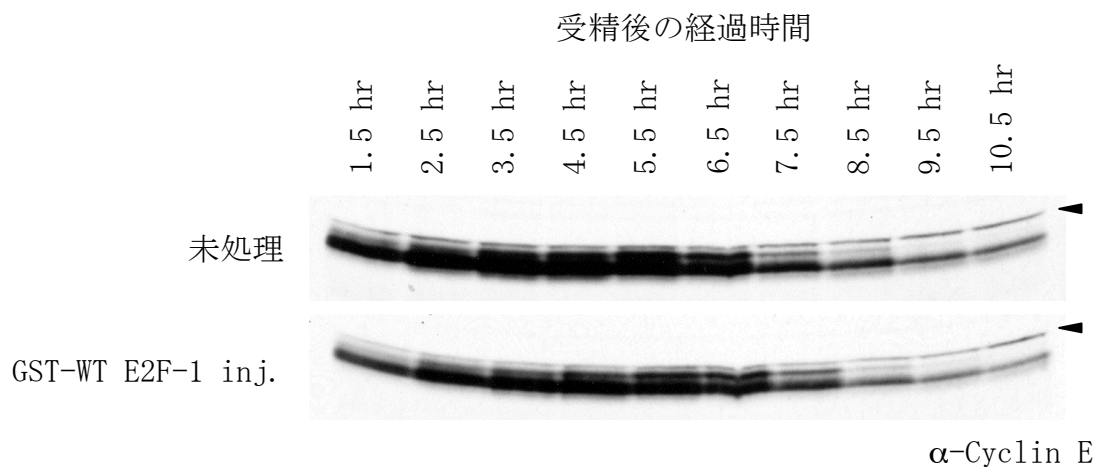


図4-2 野生型E2F-1のインジェクションは母性Cyclin E蛋白質が分解する時期に影響しない

一細胞期にGST-WT E2F-1を10 ngインジェクションした初期胚、および未処理の初期胚を図の時間に回収し、 α -Cyclin E抗体を用いてウェスタンブロットを行った。GST-WT E2F-1のインジェクションによりCyclin E蛋白質が分解する時期は変化しないことがわかった。図の矢印は非特異的なバンドを示す。

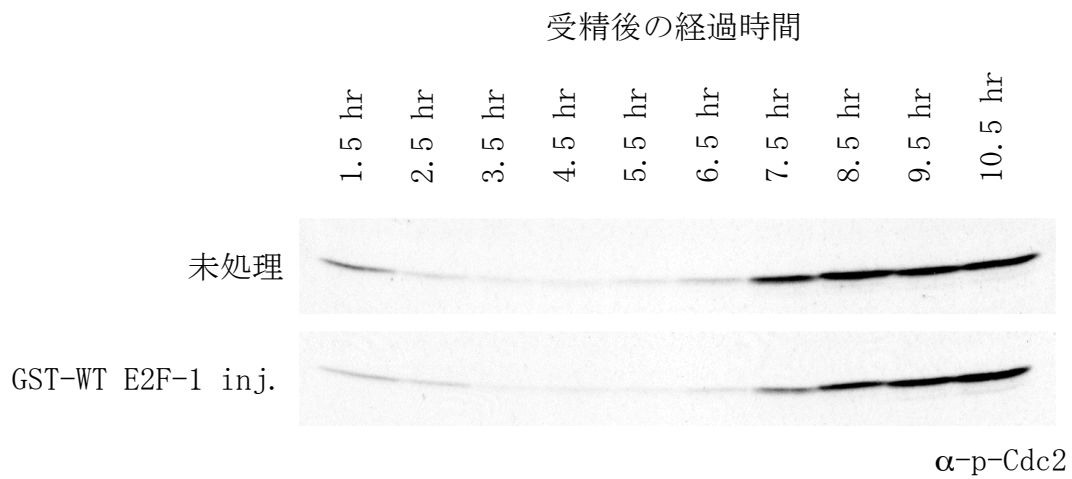


図4-3 野生型E2F-1によりCdc2がリン酸化される時期は遅くなる

一細胞期にGST-WT E2F-1を10 ngインジェクションした初期胚、および未処理の初期胚を図の時間に回収し、α-p-Cdc2抗体を用いてウェスタンブロットを行った。GST-WT E2F-1のインジェクションによりCdc2がリン酸化される時期は30分から1時間遅くなることがわかった。

ンを用いた。 α -アマニチンは真核生物の RNA ポリメラーゼの活性を阻害する二環性オクタペプチドで、キノコ的一种 *Amanita phalloides* より単離された生理活性物質である。RNA ポリメラーゼ I、II、III のうち、mRNA を合成する RNA ポリメラーゼ II の活性を最も強く阻害する。

二細胞期の初期胚の片半球に 5 ng の GST-WT E2F-1、25 ng の α -アマニチンをそれぞれ単独で、または共にインジェクションした (図 4-4A)。結果、 α -アマニチンを共にインジェクションすると、GST-WT E2F-1 による卵割の遅れが完全には解消されないものの、緩和されることがわかった。また α -アマニチン単独でのインジェクションによつては卵割に何の影響も観察されなかった。

一細胞期の初期胚に 2 ng、10 ng の GST-WT E2F-1 を単独で、または 50 ng の α -アマニチンと共にインジェクションし、受精後から 5.5 時間後に回収した。回収した初期胚からゲノムを精製しアガロースゲル泳動した (図 4-4B)。結果、 α -アマニチンのインジェクションによつてゲノム量の低下が緩和されることがわかった。

以上の結果から、GST-WT E2F-1 のインジェクションによつて卵割が遅れる原因は複数あり、そのうちのひとつに GST-WT E2F-1 の転写活性があると考えられる。また、レポーターアッセイによつて、GST-WT E2F-1 の転写活性を検出しようと試みたが、検出できなかった (データ省略)。この点に関しては後で考察する。

(4-5) 野生型 E2F-1 の転写活性化ドメインの欠損によつて卵割の遅れは緩和する

転写阻害剤 α -アマニチンを用いた実験の結果から、GST-WT E2F-1 の転写活性が、卵割の遅れを生じさせる原因の一つであることが考えられた。しかし、 α -アマニチンの転写阻害以外の非特異的な効果によつて卵割の遅れが緩和された可能性もある。そこで野生型 E2F-1 の転写活性化ドメインを欠損した変異体 (Phillips et al. 1999) を GST 融合蛋白質で発現、精製し、インジェクションに用いることにした (図 4-5A)。

一細胞期の初期胚に GST-WT E2F-1、または GST-TA(-) E2F-1 を 10 ng インジェクションし、受精から 5.5 時間後に回収した。回収した初期胚からゲノムを精製し、これを鋳型に定量的な PCR を行った。(図 4-5B)。結果、転写活性化ドメインの欠損によつて卵割の遅れは緩和されることがわかった。この結果からも卵割の遅れが生じる原因の一つに GST-WT E2F-1 の転写活性があることがわかった。

(4-6) 卵割が遅れた初期胚から精製した RNA のインジェクションによつても

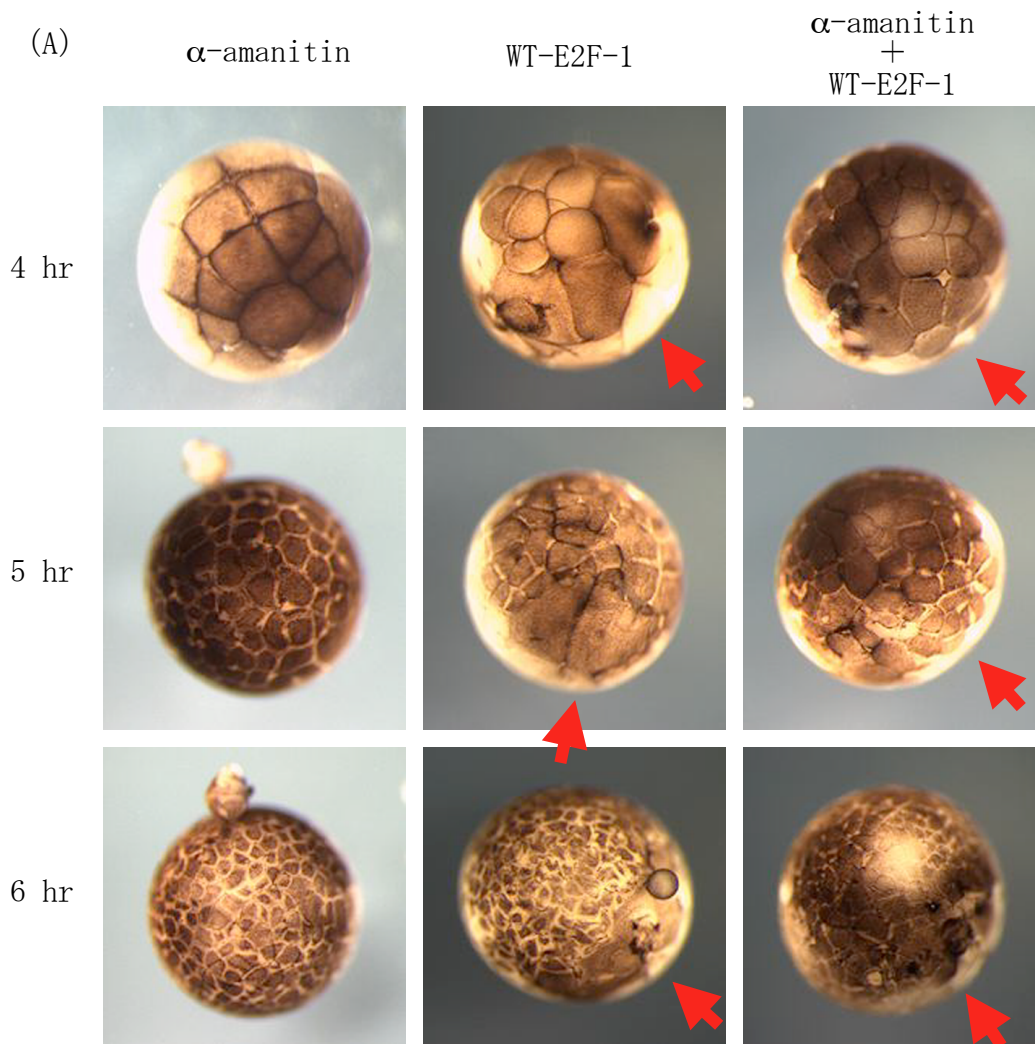


図4-4 野生型E2F-1のインジェクションによる卵割の遅れは転写阻害剤によって緩和する

(A) 2細胞期に至った初期胚の片半球に α -アマニチン (25 ng)、GST-WT E2F-1 (5 ng) をそれぞれ単独で、または共にインジェクションした。 α -アマニチン単独では初期胚に影響はなく、GST-WT E2F-1単独では卵割が遅延した。 α -アマニチンとGST-WT E2F-1を共にインジェクションすると、卵割の遅延が緩和することがわかった。インジェクションした半球を矢印で示す。

(B)

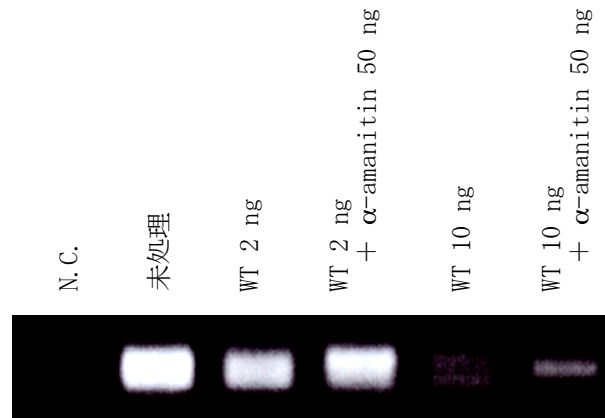


図4-4 (続き) 野生型E2F-1のインジェクションによる卵割の遅れは転写阻害剤によって緩和する

(B) GST-WT E2F-1を単独、またはα-アマニチンと共に一細胞期にインジェクションし、受精後5.5時間に初期胚を回収した。精製したゲノムを鋳型として定量的なPCRを行った。α-アマニチンの存在によってゲノム量が増加し、卵割の遅延が緩和することがわかった。

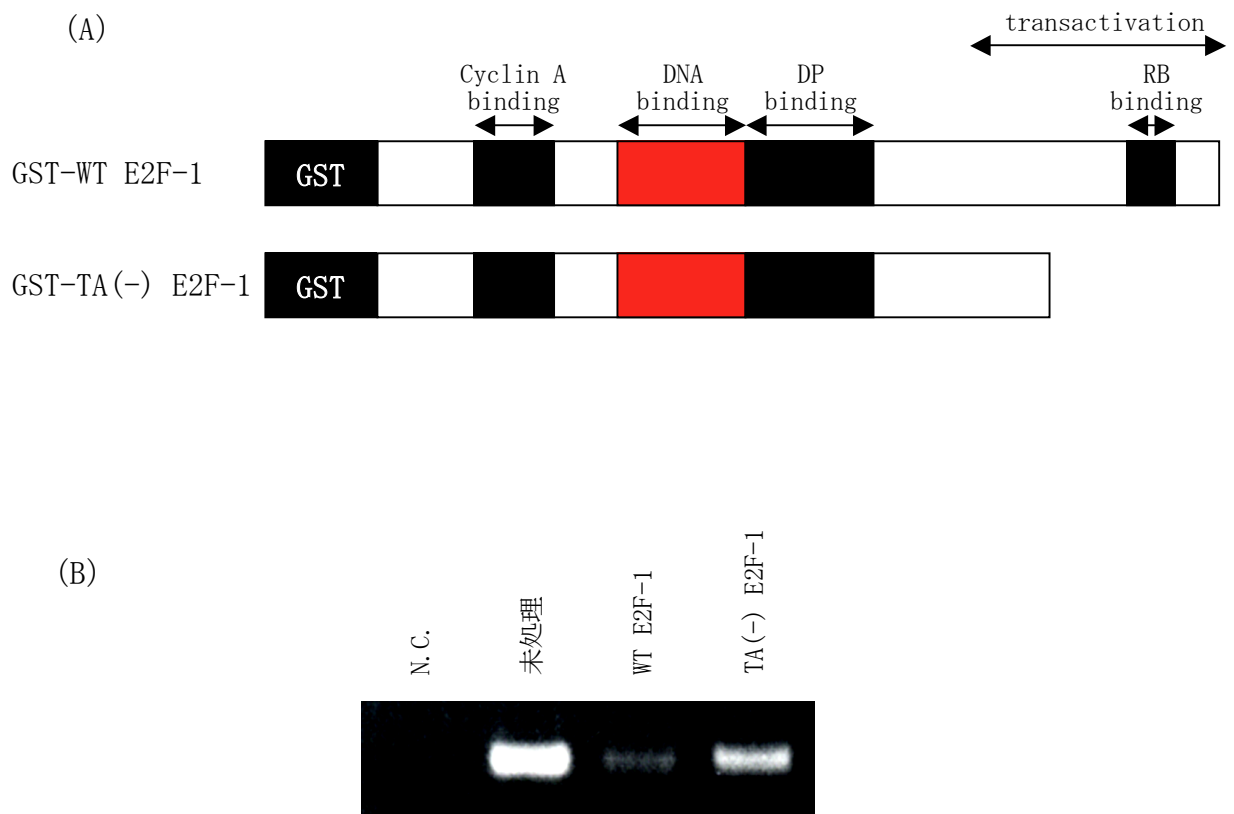


図4-5 野生型E2F-1の転写活性化ドメインの欠損によって卵割の遅延は緩和する

(A) GST-WT E2F-1と転写活性化ドメインを欠損した変異体であるGST-TA(-) E2F-1の構造。(B) 図に示した蛋白質を一細胞期に10 ngインジェクションし、受精後5.5時間 (St. 8に相当) に初期胚を回収した。精製したゲノムを鋳型に定量的なPCRを行った。転写活性化ドメインの欠損によってゲノム量が増加することがわかった。

ゲノム量の低下が生じる

転写阻害剤 α -アマニチン、GST-TA(-) E2F-1 を用いた実験の結果から GST-WT E2F-1 の転写活性が卵割の遅れを生じさせる原因の一つであることが強く示唆された。このことからインジェクションした GST-WT E2F-1 が初期胚内において何らかの因子を転写誘導し、その因子が卵割の遅れを生じさせている可能性が考えられる。そこで、GST-WT E2F-1 のインジェクションにより卵割が遅れた初期胚から RNA を精製し、精製した RNA を別の初期胚にインジェクションする実験を試みた。GST-WT E2F-1 によって何らかの因子の mRNA が転写誘導されているのであれば、精製した RNA はこの因子の mRNA を含んでいるはずであり、精製した RNA のインジェクションによっても卵割の遅れが生じるはずである。

一細胞期の初期胚に GST-WT E2F-1 を 10 ng インジェクションし、受精から 4.5 時間後に回収した。同じ時間に未処理の初期胚も回収した。また受精から 7.5 時間後に MBT 直後の未処理の初期胚を回収した。これらの初期胚から total RNA を精製し、一細胞期の初期胚に 80 ng ずつインジェクションした。初期胚を受精から 5.5 時間で回収し、ゲノムを精製してアガロースゲル泳動した (図 4-6)。結果、GST-WT E2F-1 のインジェクションにより卵割の遅れが生じた初期胚の RNA のインジェクションによっても、卵割の遅れが生じることがわかった。この結果から、GST-WT E2F-1 によって何らかの因子の mRNA が転写誘導され、この因子が卵割の遅れを生じさせていることが強く示唆された。ところで一般に total RNA 中に mRNA が占める割合は 0.5~2 %であるとされている。よってインジェクションに用いた 80 ng の total RNA 中には 0.4~1.6 ng の mRNA が存在していることになる。仮に 10^5 種類の mRNA が存在していると仮定すると、一種類あたり 4~16 fg 存在することになる。GST-WT E2F-1 によって転写誘導されている因子が何種類あるのかは不明であるが、非常に微量でも卵割の遅れを生じさせることができるようである。

また MBT 直後の未処理の初期胚の RNA にも卵割の遅れを生じさせる活性があることがわかった。内在性 E2F の転写活性は MBT とほぼ同時に現れることを考えると、GST-WT E2F-1 によって転写誘導される何らかの因子は、正常な初期発生において内在性 E2F の転写活性によって転写誘導され、MBT における細胞周期変化に関与している可能性が考えられ、この結果は非常に興味深い。

(4-7) 卵割の遅れを生じさせる効果は E2F に特異的である

卵割の遅れを生じさせる効果は E2F に特異的なものであるのか、または E2F 以外の転写因子でも生じるのかを調べるためにマウスの c-Jun を GST 融合蛋白質として大腸菌で発現、精製しインジェクションに用いた。c-Jun は E2F と同じく細胞増殖に深く関わる転写因子であり (Hilberg et al. 1993)、MBT 後の

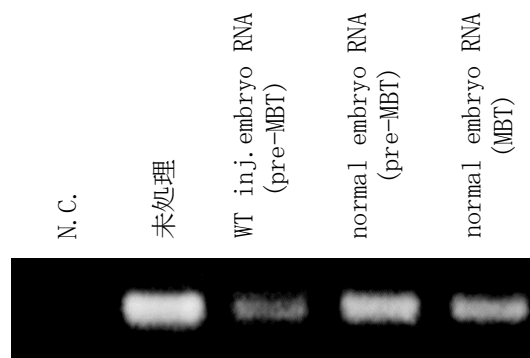


図4-6 卵割が遅延した初期胚から精製したRNAのインジェクションによってもゲノム量の低下が生じる

GST-WT E2F-1をインジェクションし、卵割が遅延した初期胚と未処理の初期胚を受精後4.5時間 (St. 7に相当する) で回収し、total RNAを精製した。また未処理の初期胚を受精後7.5時間 (MBT直後に相当) で回収し、total RNAを精製した。精製したtotal RNA 80 ng (4 mg/mlRNA溶液を20 nl) を一細胞期にインジェクションし、受精後5.5時間 (St. 8に相当) で回収した。回収した初期胚からゲノムを精製し、これを鋳型として定量的なPCRを行った。GST-WT E2F-1をインジェクションした初期胚のRNAによって、ゲノム量の低下が生じることがわかった。また、MBT直後の初期胚のRNAによってもゲノム量の低下が生じた。

初期発生において機能していることが報告されている (Dong et al. 1996)。

一細胞期の初期胚に GST-WT E2F-1、または GST-c-Jun を 10 ng インジェクションし、受精から 5.5 時間後に回収した。回収した初期胚からゲノムを精製し、アガロースゲル泳動した (図 4-7)。結果、GST-c-Jun のインジェクションによってはほとんど卵割の遅れが生じないことがわかった。よって、インジェクションによって卵割の遅れを生じさせる E2F の効果は、E2F に特異的なものであると予想される。

(4-8) 転写活性化ドメイン欠損変異体による卵割の遅れは転写に依存しない

E2F は転写活性化因子としてだけでなく、RB と結合した状態でプロモーター上の E2F 認識配列に結合し、転写抑制因子として機能することができる (Harbour et al. 2000b, Trimarchi et al. 2002)。転写活性化ドメインを欠損している GST-TA(-) E2F-1 のインジェクションによって、GST-WT E2F-1 より程度が弱いものの、卵割の遅れが生じていた (図 4-5B)。この効果は RB と複合体を形成し転写抑制因子として機能している E2F を阻害したために生じている可能性が考えられる。GST-TA(-) E2F-1 が転写抑制因子である RB-E2F 複合体をプロモーター上から外すことによって、抑制されていた因子が発現し、これが原因で卵割の遅れが生じているのなら、GST-TA(-) E2F-1 のインジェクションによって生じる卵割の遅れも α -アマニチンによって緩和されるはずである。

一細胞期の初期胚に GST-WT E2F-1、または GST-TA(-) E2F-1 をそれぞれ 10 ng 単独で、または α -アマニチン 50 ng と共にインジェクションした。受精から 5.5 時間後に初期胚を回収し、ゲノムを精製してアガロースゲル泳動した (図 4-8)。GST-WT E2F-1 による卵割の遅れは α -アマニチンによって緩和されたが、GST-TA(-) E2F-1 による卵割の遅れは変化しなかった。この結果から MBT 以前の初期胚において RB-E2F 複合体は転写抑制因子として機能していない可能性が高い。また GST-WT E2F-1 のインジェクションによって発現している何らかの因子は、単純に E2F の転写活性化因子としての機能に依存して発現していると考えられる。

(4-9) 野生型 E2F-1 のインジェクションは RB-E2F 複合体によって発現を抑制されている因子に影響しない

最近、ショウジョウバエの培養細胞を用いて転写抑制に働く RB-E2F 複合体を阻害した際、発現が上昇する因子を網羅的に調べた研究が報告された (Dimova et al. 2003)。GST-WT E2F-1 のインジェクションによってこれらの因子の発現に変化があるか解析した。xenopus D7 protein、vasa、septin の三種類に関して RT-PCR を行った。これらの因子は RB-E2F 複合体によって発現が抑制されて

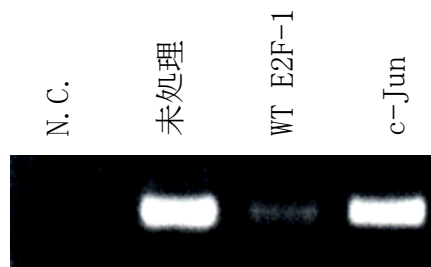


図4-7 卵割の遅れを生じさせる効果はE2Fに特異的である

GST-WT E2F-1、またはGST融合蛋白質として発現、精製したマウスc-Junを一細胞期に10 ngインジェクションし、受精後5.5時間 (St. 8に相当) に初期胚を回収した。精製したゲノムを鋳型に定量的なPCRを行った。E2Fと同じく細胞増殖に関わる転写因子であるc-Junのインジェクションによってはゲノム量の低下が生じなかった。

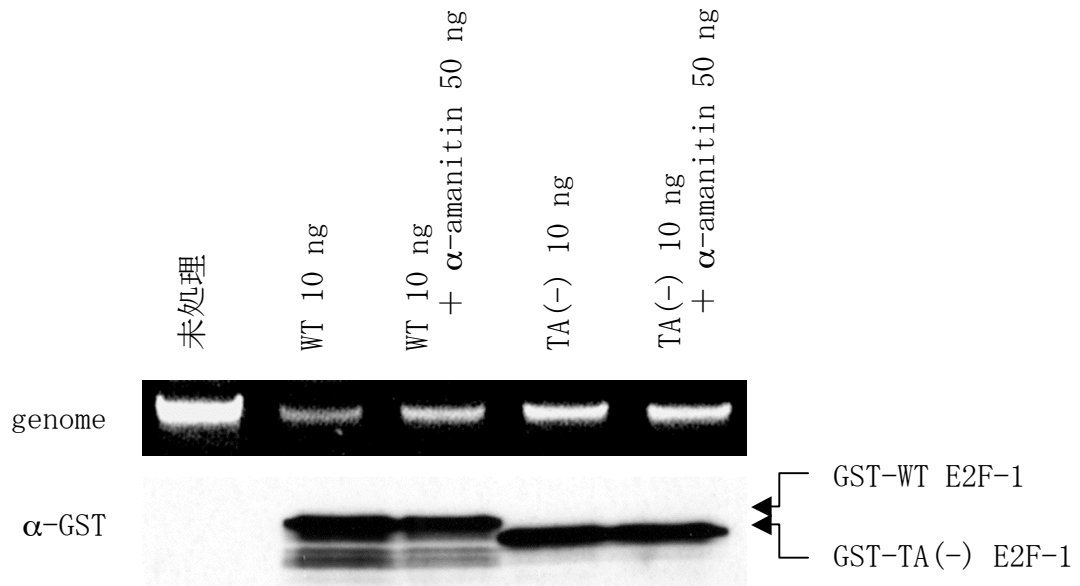


図4-8 転写活性化ドメイン欠損変異体による卵割の遅れは転写に依存しない
 図に示した蛋白質を単独で、またはα-アマニチンと共に一細胞期にインジェクションした。受精後5.5時間 (St. 8に相当) で初期胚を回収しゲノムを精製した。精製したゲノムをそのまま泳動した。TA(-)によるゲノム量の低下はα-アマニチンによって緩和しない。またほぼ同量の蛋白質がインジェクションされていることをα-GST抗体を用いたウェスタンブロットで確認した。

いる因子として報告されたアフリカツメガエルの相同因子である (Dimova et al. 2003, Smith et al. 1988, Mendoza et al. 2002, Komiyama et al. 1994)。

一細胞期の初期胚に GST-WT E2F-1 を 10 ng インジェクションし、受精から 5.5 時間後に回収した。回収した初期胚から RNA を精製し、これから cDNA を合成した。これを鋳型に定量的な PCR を行い、それぞれの発現を未処理の初期胚と比較した (図 4-9)。結果、GST-WT E2F-1 のインジェクションによって発現が上昇する因子は少なくとも調べた 3 種類の中にはなかった。図 4-8 の結果と共に、この結果からも GST-WT E2F-1 のインジェクションによって発現している何らかの因子は、単純に E2F の転写活性化因子としての機能に依存して発現していると考えられる。

(4-10) *xenopus* E2F のインジェクションによっても卵割の遅れが生じる

ここまでの実験は、ヒトの野生型 E2F を用いて行ってきたが、アフリカツメガエルの E2F によってもヒトの野生型 E2F と同じ表現型が生じるか、確かめる必要がある。そこで xE2F を GST 融合蛋白質として大腸菌で発現、精製し二細胞期の初期胚の片半球に 5 ng インジェクションした (図 4-10)。結果、GST-WT E2F-1 をインジェクションした場合と同様に、GST-xE2F をインジェクションした半球で卵割の遅れが生じることがわかった。これから、これまで解析してきた卵割の遅れが生物種の異なる蛋白質を用いたことによる人為的な要因によって生じたものではないことがわかった。

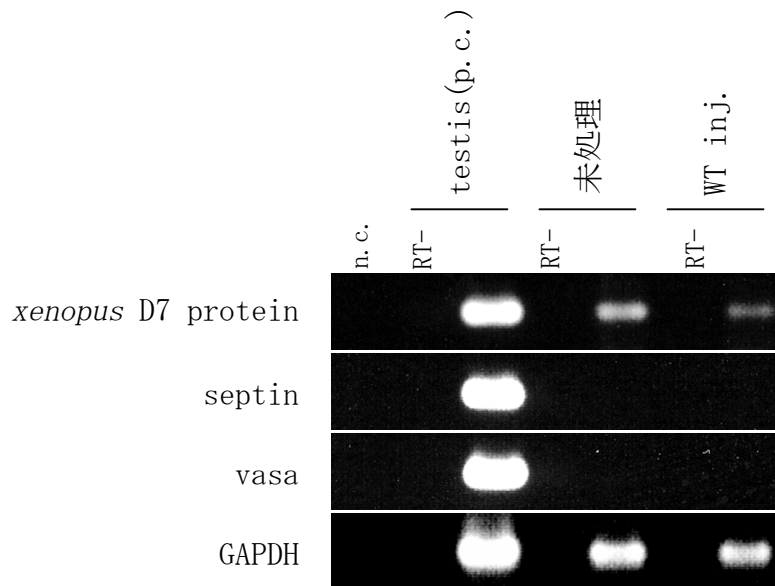


図4-9 野生型E2F-1のインジェクションはRB-E2F複合体によって発現を抑制されている因子に影響しない

GST-WT E2F-1をインジェクションした初期胚、および未処理の初期胚を受精後5.5時間 (St. 8に相当) で回収し、total RNAを精製した。これを鋳型にしてcDNAを合成し、E2F-RB複合体によって発現が抑制される因子3種と内部標準としてGAPDHに対してRT-PCRを行った。GST-WT E2F-1のインジェクションによってこれらの因子の発現に変化はなかった。精巣のRNAから合成したcDNAをPCRのポジティブコントロールとして用いた。

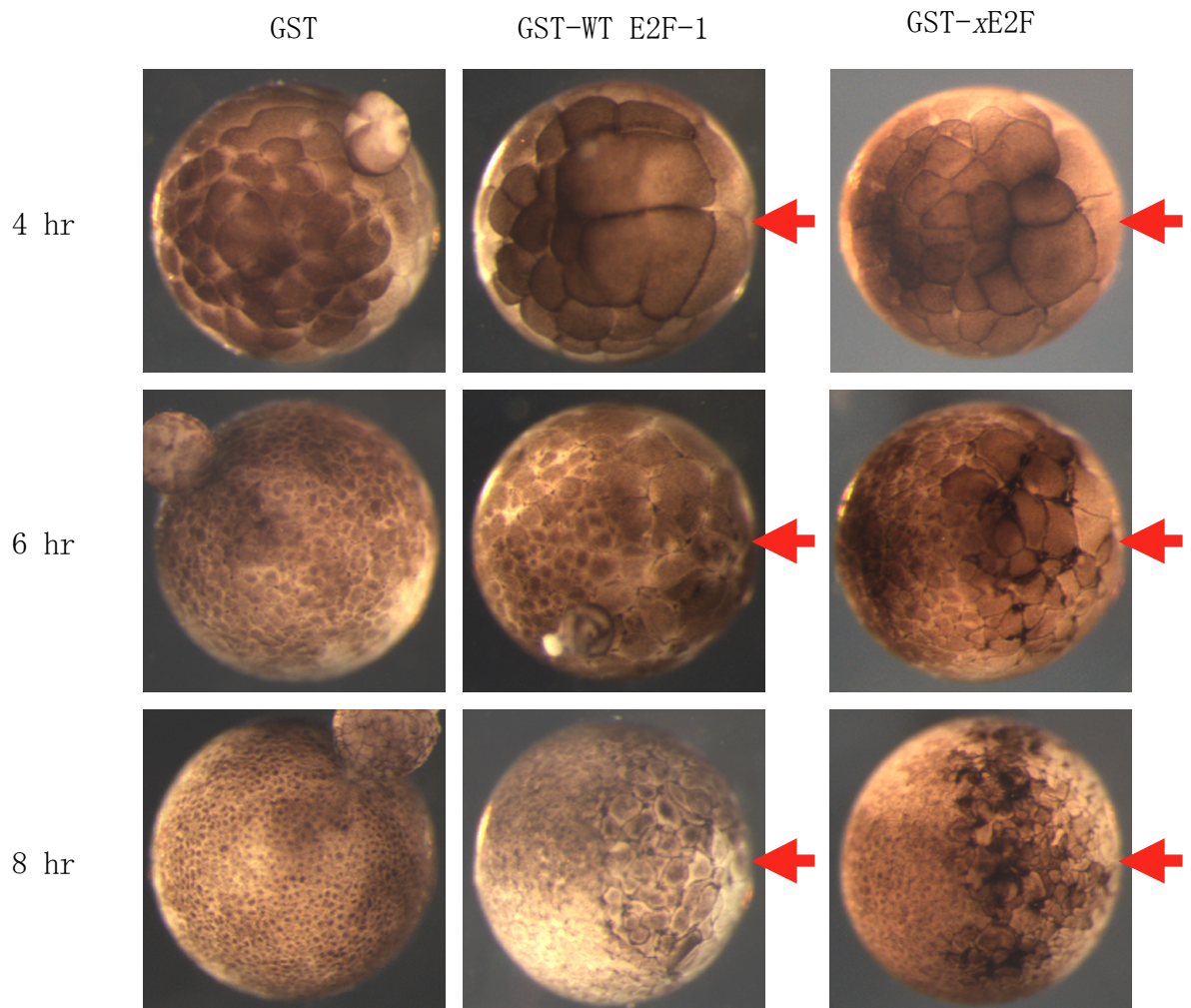


図4-10 GST-xE2Fのインジェクションによっても卵割の遅延が生じる

二細胞期の片半球にGST-WT E2F-1、GST融合蛋白質として精製したGST-xE2F、コントロールとしてGSTをそれぞれ5 ng (1 mg/ml蛋白質溶液を5 nl) インジェクションした。 GST-xE2Fによっても卵割の遅延が生じた。遅延が生じている半球を矢印で示す。図の時間は受精からの経過時間を示し、4 hrはSt. 6に、6 hrはSt. 8に、8 hrはSt. 9に相当する。

考察

(1) 内在性 E2F 活性と、その阻害により生じた発生異常の関係

優性不能型 E2F によって内在性 E2F 活性を阻害した結果、胞胚期終了後に発生異常が生じ、これがアポトーシス様の表現型であることがわかった (図 3-3、図 3-8)。アポトーシスであることを証明するためには若干解析結果が不足しているが、優性不能型 E2F の導入により生じた細胞解離の表現型は非常に有名で、その表現型のみでアポトーシスであると断じる傾向があるほどである (Sible et al. 1997, Anderson et al. 1997, Stack et al. 1997, Stancheva et al. 2001, Shimuta et al. 2002)。これに加えて、DNA の断片化が観察されたことから (図 3-8)、ほぼアポトーシスに間違いないと考えられる。よって MBT における内在性 E2F 活性は胞胚期後の正常な発生に必須で、その阻害によりアポトーシスが生じ、致死となることがわかった。

しかし、他の複数の転写因子の優性不能型変異体を用いたインジェクションによってもこの発生異常は生じた (データ省略)。よって、生じた発生異常およびアポトーシスが E2F 活性を阻害した際に生じる特異的な表現型ではないことがわかった。また、この発生異常は転写阻害剤である α -アマニチン、蛋白質合成阻害剤であるシクロヘキシミド、DNA 合成阻害剤であるアフイディコリン、MBT 以前の初期胚へのガンマ線照射等によっても生じることがわかっている (データ省略、Sible et al. 1997, Anderson et al. 1997)。これらの結果および報告から、この表現型およびアポトーシスは MBT 以前の環境において何らかの異常が生じると、初期胚の発生をとにかく MBT 後において停止させるメカニズムであると考えられる。

また、内在性 E2F の阻害によって Cdc2 の Tyr15 がリン酸化され、そのキナーゼ活性が抑制された (図 3-5、図 3-6)。それに伴って細胞増殖が抑制された (図 3-7)。これは MBT 以後に活性化するチェックポイント機構によって生じると考えられる (参考図 2、Shimuta et al. 2002)。一般にチェックポイント経路ではセンサー、トランスデューサー、エフェクターの順にシグナルが伝達するとされている (Zhou and Elledge 2000)。DNA 障害/複製チェックポイントでは Rad1/Rad9/Hus1 複合体や、Rad17 がセンサーとして機能すると考えられている。脊椎動物細胞におけるガンマ線照射による DNA 障害では主に ATM (ataxia telangiectasia mutated) と Chk2 がそれぞれトランスデューサー、エフェクターとして機能する。一方、アフイディコリンなどの DNA 合成阻害剤による DNA 複製チェックポイントでは ATR (ATM の類似キナーゼ) と Chk1 がそれぞれトランスデューサー、エフェクターとして機能する。アフリカツメガエルの MBT 後に活性化するチェックポイント機構のセンサーはまだ明らかになっていないが、

トランスデューサー、エフェクターとして ATR、Chk1 が機能することがわかっている (Shimuta et al. 2002)。Chk1 が、Cdc2 の Tyr15 のリン酸基に対してフォスファターゼとしてはたらく Cdc25A をリン酸化し、その分解を促すと、Tyr15 をリン酸化された Cdc2 が蓄積し、その活性が抑制される。図 3-5 で見られた Cdc2 の Tyr15 のリン酸化の亢進がこれにあたりと考えられる。

(2) MBT における細胞周期変化と E2F の関係

MBT において初期胚を形成する細胞の細胞周期はギャップ期を加えて長くなるようにする (Newport et al. 1982a, Masui et al. 1998)。その MBT とほぼ時を同じくして内在性 E2F の転写活性が生じることは不思議である (図 2)。なぜなら E2F は細胞周期を回そうとする正の制御因子だからである (Shan et al. 1994, Qin et al. 1994, Kowalik et al. 1995, Field et al. 1996, Philips et al. 1997, Hsieh et al. 1997, Arata et al. 2000)。MBT と同時に活性化する E2F の転写活性の生理的意義として、その一つに MBT における細胞周期変化への関与を予想した。

優性不能型 E2F によって胞胚期における内在性 E2F の転写活性を阻害しても (図 3-2)、MBT における細胞周期変化のマーカーとして捉えることのできる二つの現象のタイミング、すなわち母性 Cyclin E 蛋白質の分解のタイミング (Howe et al. 1996, Hartley et al. 1997)、Cdc2 の Tyr15 がリン酸化されるタイミング (Hartley et al. 1996, Shimuta et al. 2002) に変化はなかった (図 3-4、3-5)。また仮に胞胚期における E2F 活性が MBT における細胞周期の変化および伸長に必要であるのなら、E2F 活性の阻害によって、S 期と M 期のみからなる非常に早い細胞周期が余計に繰り返され、未処理の初期胚と比較した場合、細胞数が増え、ゲノム量は増加していることが予想される。しかし、そのような現象は生じていなかった (図 3-7)。以上から、胞胚期における内在性 E2F の活性は MBT における細胞周期変化に関与していないと結論して良さそうである。

しかし、MBT 以前の環境において、外来性 E2F 活性の初期胚への導入によって何らかの因子「X」が転写誘導され、卵割の速度が遅くなる、つまり細胞周期が伸長していることを考えると (図 4-1)、この結論は時期尚早であるといわざるを得ない。特に注目すべきは、外来性 E2F 活性の導入によって明らかに細胞周期が伸長しているにも関わらず、母性 Cyclin E 蛋白質の状態、および Cdc2 の Tyr15 のリン酸化状態に全く変化がない点である (図 4-2、4-3)。このことから、初期胚における細胞周期は母性 Cyclin E 蛋白質の分解や、Cdc2 の Tyr15 のリン酸化がなくても、長くなり得ることがわかる。また、少なくとも外来性 E2F には、因子「X」を介して、母性 Cyclin E 蛋白質の分解や Cdc2 の Tyr15 のリン酸化に関係なく細胞周期を伸長させる活性があることがわかる。さらに、

正常に発生する初期胚が MBT を迎えた直後に回収し、精製した RNA 中には MBT 以前の卵割を遅らせる活性があった (図 4-6)。この活性の正体が、内在性 E2F 活性によって転写誘導された因子「X」である可能性は十分に考えられる。

ではなぜ、優性不能型 E2F の導入によって細胞周期変化を阻害することができないのであろうか？一つの答えとして、E2F 活性の有無にかかわらず、母性 Cyclin E 蛋白質の分解と Cdc2 の Tyr15 のリン酸化、さらには未知の細胞周期を長くするメカニズムが存在するために、例えばゲノム量を定量した場合、あるべきはずの差を検出できないことが考えられる。外来性 E2F の導入によって生じる卵割の遅れは 1 時間弱であり、卵割数に換算すれば二回弱である。この遅れは、Cyclin E/Cdk2 のキナーゼ活性を阻害した場合に生じる卵割の遅れや、Chk1 のキナーゼ活性を過剰導入し、Cdc2 の Tyr15 のリン酸化を誘導した場合に生じる卵割の遅れに比べてはるかに小さい (Hartley et al. 1997, Kappas et al. 2000, Shimuta et al. 2002)。さらに外来性 E2F の導入によって生じる卵割の遅れは、その転写活性に依存して転写誘導された因子「X」による効果と、転写活性に依存しない効果 (E2F の DNA 結合活性に依存した効果であると考えられる。これについては後で述べる。) をあわせたものである (図 4-8)。純粋に因子「X」によって生じる遅れはさらに小さい (図 4-4、図 4-8)。よって MBT において、母性 Cyclin E 蛋白質の分解や Cdc2 の Tyr15 のリン酸化などの細胞周期を長くしようとする強い活性に、優性不能型 E2F によって因子「X」の発現が抑制され、細胞周期が短いままできようとする効果が埋もれてしまっている可能性は十分に考えられる。別の答えとして、因子「X」が E2F だけではなく、ほかの転写因子の制御下にもあることが考えられる。MBT は接合体ゲノムからの転写が活性化する時期であり、E2F を含む様々な転写因子が MBT 直後に機能し得る (Newport et al. 1982b, Hilberg et al. 1993, Lemaitre et al. 1995)。過剰な E2F 活性が因子「X」の発現誘導には十分であるが、E2F 活性の阻害が因子「X」の発現抑制に不十分である可能性は十分に考えられる。

外来性 E2F 活性によって母性 Cyclin E 蛋白質の分解のタイミングには変化がなかったが (図 4-2)、Cdc2 の Tyr15 がリン酸化される時期には 30 分から 1 時間の遅れが生じた (図 4-3)。このことは、母性 Cyclin E 蛋白質の分解と、Cdc2 の Tyr15 のリン酸化が独立した現象であることを示唆していると考えられる。MBT における母性 Cyclin E 蛋白質の分解、または MBT における Cdc2 の Tyr15 のリン酸化は多くの研究者に興味深い現象として受け止められ、多くの解析結果が報告されているが、これらを総合的に判断しても、この考え方は正しいようである。初期胚が MBT を迎える時期を決定づける分子メカニズムとして、「滴定モデル」が一般的に認められている (Newport et al. 1982b、序論参照)。Cdc2 の Tyr15 がリン酸化される分子メカニズムは、このモデルに従うようである

(Shimuta et al. 2002)。実際に、図 4-3 で見られたリン酸化の遅れも、外来性 E2F 活性の導入によって生じたゲノム量の低下によく対応している。一方で、母性 Cyclin E 蛋白質が分解される時期を決定するメカニズムは全く不明であり、少なくとも「滴定モデル」に従わないことは明らかである (Howe and Newport 1996, Hartley et al. 1997)。よって正常な初期発生の MBT において、全く同時に起こり、細胞周期変化に貢献する二つの分子メカニズムがお互いに無関係であることから、これら二つに全く影響しない、第三、第四のメカニズムが存在したとしても全く不思議ではない。本研究の結果から、MBT の細胞周期変化に関わる、これら新規のメカニズムの一つが E2F の転写活性に依存した因子「X」の機能であると考えられる (図 5)。

(3) MBT 以前の転写を抑制するメカニズムと E2F の関係

アフリカツメガエルの初期発生において、接合体ゲノムからの転写は MBT において活性化される (Newport et al. 1982b)。MBT 以前の転写抑制は、ゲノムのメチル化 (Stancheva and Meehan 2000, Stancheva et al. 2001)、またはクロマチン構造の凝縮 (Vassetzky et al. 2000) によって保たれているとの報告がある。Stancheva らは、アフリカツメガエルのメチルトランスフェラーゼである xDnmt1 (*Xenopus* DNA methyltransferase 1) のアンチセンス RNA を初期胚にインジェクションすることで、正常な初期胚では MBT 後に発現する中胚葉マーカーである *Xbra*、*Cerberus*、*Otx2* 等の遺伝子の発現が MBT 以前に生じることを示した (Stancheva and Meehan 2000)。Vassetzky らは RNA ポリメラーゼ I によって転写される遺伝子の代表として rRNA、RNA ポリメラーゼ II では *c-myc*、RNA ポリメラーゼ III では 5S RNA を選択し、そのいずれの遺伝子も MBT 後に核マトリックスに停泊し、転写を盛んに受ける状態になることを報告した。いずれもゲノム側に生じるメカニズムで、これによれば、あらゆる転写因子による転写活性を抑制することができ、理にかなったメカニズムである。しかし、本研究では外来性 E2F 活性によって MBT 以前の環境において転写が生じうることを明らかにした (図 4-4)。ゲノム側に一様に転写を受け付けないような修飾が存在するのであれば、単純に転写因子を初期胚に導入しただけでは転写が起こるはずがない。よって MBT 以前の初期胚に存在する転写抑制は上記のメカニズムだけでは完全に説明できないことになる。

また、外来性 E2F 活性によって MBT 以前の環境において転写が生じうることを転写阻害剤を用いた実験によって明らかにしたが、この転写活性をレポーターアッセイによって検出することはできなかった (データ省略)。このことはインジェクションしたレポータープラスミドが初期胚内でゲノムと同様に転写を受け付けないような状態に修飾されたためと考えられる。実際、Prioleau ら

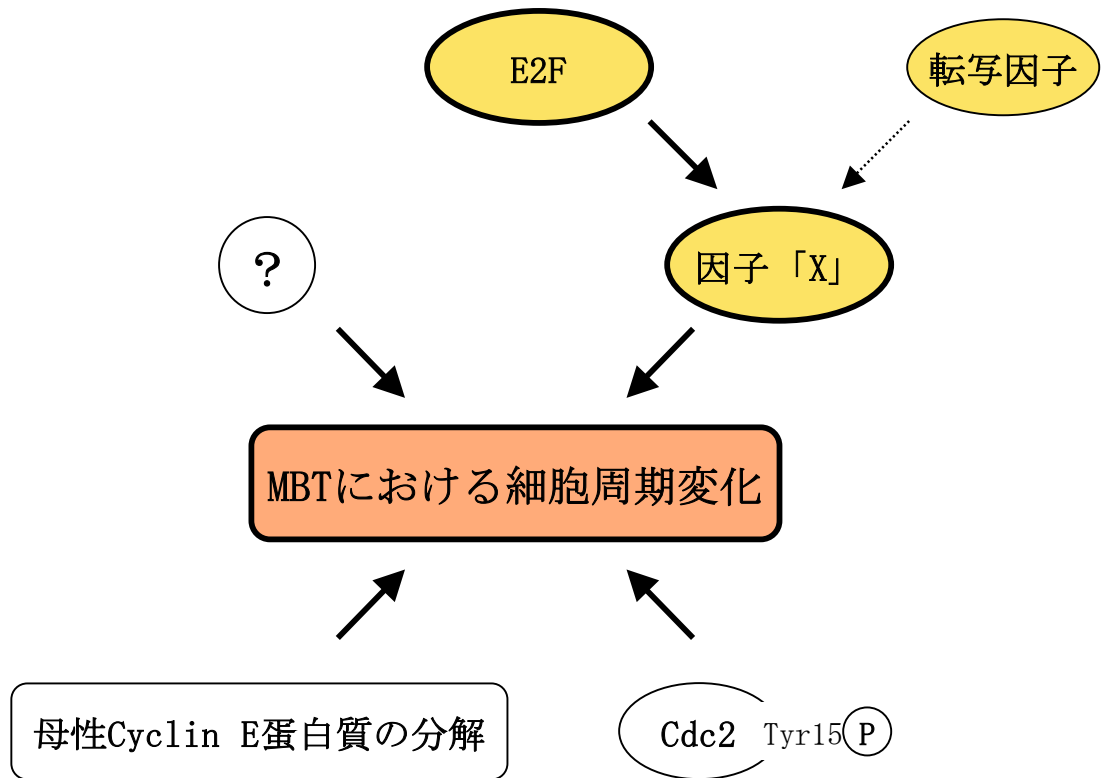


図5 MBTにおける細胞周期変化（モデル図）

MBTにおける細胞周期変化には、複数の分子メカニズムがそれぞれ独立に関与していると考えられる。E2Fはその標的因子「X」の転写誘導を介して細胞周期変化に関与する。また標的因子「X」はE2F以外の転写因子による制御も受ける可能性がある。

は初期胚にインジェクションしたプラスミドからの転写がゲノムと同様に抑制されることを報告している (Prioleau et al. 1994)。また彼らはあらかじめプラスミドと TBP (TATA box binding protein) をインキュベートしてから初期胚にインジェクションすることでプラスミドからの転写を検出できることを報告している (Prioleau et al. 1994)。このことから、MBT 以前のゲノムは物理的に転写因子との相互作用を受け付けなくなるような修飾を受けており、この修飾はゲノムが複製された直後にゲノムに与えられていると考えられる。

以上のことをあわせて考えると、ゲノム上に転写を受け付けられない修飾があることは間違いないが、それはゲノム全体に一様に、完全に存在するものではなく、少なくとも一部のプロモーターは転写因子が相互作用できる状態にあり、その下流の遺伝子は転写因子がプロモーターに存在することによって、または元々、RNA ポリメラーゼが走れる状態にあることが予想される。因子「X」の遺伝子、またその上流のプロモーターに存在する E2F 認識部位はこの状態にある可能性が非常に高い。一方で c-Jun の認識部位が存在するプロモーターは、c-Jun が相互作用できない状態であるのであろう (図 4-7)。また最近、転写因子である β -Catenin/Tcf が MBT 以前に機能していることが報告されたが (Yang et al. 2002)、このことからゲノム上にある転写抑制のための修飾は完全なものではないという可能性は十分に示唆的である。

ではなぜ、内在性 E2F は相互作用が可能なプロモーターに対して機能しないのであろうか？内在性 E2F が MBT 以前にも存在していることはゲルシフトアッセイの結果から明らかであるし (図 1)、機能していないことは優性不能型 E2F を用いた実験の結果から明らかである (図 3-3、仮に内在性 E2F が因子「X」の発現に機能しているのであれば、優性不能型 E2F の導入によって野生型 E2F とは逆の表現型、つまり卵割の促進が観察されるはずである)。よって内在性 E2F は MBT 以前の初期胚内において、その活性を抑制されている可能性が高い。このメカニズムは興味深く、今後の研究によっての解明が待たれる。なお、考察を与えるべき点として、内在性 E2F の転写活性の挙動を調べるために行ったレポーターアッセイの結果がある (図 2)。上記のように、プラスミドにも転写抑制の修飾が与えられる可能性が高いため、この結果から MBT 以前において内在性 E2F の転写活性が存在しないことは証明できない。しかし MBT 以前においては E2F 自身の活性が抑制されていると考えられるため、また優性不能型 E2F によって MBT 以前に表現型が観察されないことから、内在性 E2F の転写活性は図 2 が示す挙動をとると考えられる。

また、E2F はその活性の阻害因子である RB 蛋白質ファミリーと結合したままで E2F 認識配列と相互作用することが可能で、この場合には RB に結合している因子群によって転写抑制複合体として機能することができる (Weintraub et

al. 1992, Hsiao et al. 1994, Johnson et al. 1994, Neuman et al. 1994, Adnane et al. 1995, Bremner et al. 1995, Sellers et al. 1995, Weintraub et al. 1995, Chow et al. 1996a, Chow et al. 1996b, Ferreira et al. 1998, Dyson 1998, Meloni et al. 1999, Zhang et al. 1999, Harbour et al. 2000b, Trimarchi and Lees 2002, Dimova et al. 2003)。この RB-E2F 複合体が MBT 以前の転写抑制に関与していることを予想したが、これを示唆する実験結果を得ることはなかった (図 4-8、図 4-9)。よって MBT 以前の転写抑制はゲノム側に存在する修飾にその大部分を依存しており、RB-E2F 複合体は関与していないことが予想されるが、この結論はこの点に注目した詳細な解析がなされた後に下されるべきであろう。しかし、少なくとも因子「X」のプロモーターに対しては RB-E2F 複合体は転写抑制に機能していないようである (図 4-8)。また転写活性化ドメインを欠損した変異体では卵割の遅れが生じ、優性不能型 E2F では生じないことに矛盾があるが、これは DNA 結合活性の差によって生じていると考えられる。この二つの変異体の構造上の差は二量体化ドメインの有無であり、転写活性化ドメインを欠損した変異体は DP と結合することができ、その DNA 結合活性は優性不能型 E2F に比べて格段に強い。実際、優性不能型 E2F を過剰量 (初期胚 1 個あたり 80 ng) インジェクションしたところ、卵割の遅れがわずかに生じた (データ省略)。またこの遅れは DNA に結合できなくなる点変異を持った優性不能型 E2F を同量インジェクションした場合には生じなかった (データ省略)。一方、転写活性化ドメインを欠損した変異体による遅れは DP-1 のインジェクションによって緩和されることはなかった (データ省略)。おそらく転写活性化ドメインを欠損した変異体、または過剰量の優性不能型 E2F は DNA に結合することによって高速に行われる DNA 複製の邪魔をしてしまい、よって卵割の遅れが生じていると思われる。

(4) E2F ファミリーのノックアウトマウス解析結果との比較

本研究から、E2F はアフリカツメガエルの個体発生 of 極めて早い時期にも、発生および細胞増殖に必須の役割を担っていることがわかった。このことはアフリカツメガエル以外の生物種、とくに哺乳類においてもあてはまるのであろうか? E2F は体細胞におけるその機能の重要性から、多くの研究者の注目を集め、すでにノックアウトマウスが多種類作成されている。これらの解析結果と照らし合わせて考察したい。

現在までに 6 種類の E2F 中で、E2F-1~5 の単独ノックアウトマウスが作成されている (Field et al. 1996, Yamasaki et al. 1996, Lindeman et al. 1998, Humbert et al. 2000, Rempel et al. 2000, Murga et al. 2001)。これらのマウスはいずれも生まれる。さらに E2F-1&2、E2F-1&3、E2F-2&3、E2F-4&5 の

組み合わせで二重ノックアウトマウスが作成されている (Gaubatz et al. 2000, Zhu et al. 2001, Wu et al. 2001, Cloud et al. 2002)。これらのなかで、E2F-1^{-/-}&3^{-/-}、E2F-2^{-/-}&3^{-/-}、E2F-4^{-/-}&5^{-/-}マウスは胎生致死となるが、アフリカツメガエルの胞胚期に相当するような発生の極めて初期に致死となることはない。一方で DP-1 のノックアウトマウスは早い発生段階で致死となる (Kohn et al. 2003)。E2F は DP と二量体を形成して DNA に結合し、転写因子として機能するが、おそらく DP-1 のノックアウトにより、大部分の E2F 活性が阻害されたことによる強い表現型であると考えられる (Kohn et al. 2003)。DP-1^{-/-}の初期胚は、胚盤胞において内部細胞塊を取り囲むように存在する栄養外胚葉の胚体外外胚葉や栄養外層巨大細胞への発生 (extra-embryonic development) が阻害されるために致死となる。よって DP-1^{-/-}初期胚はマウス初期発生において極めて早い時期に致死となり、マウスにおいても個体の初期発生において E2F 活性が重要な機能を担っていることがわかる。

ただし、マウス初期胚における栄養外胚葉は将来、胎盤を形成する細胞群であるが、体外発生するアフリカツメガエルにこれは存在しない。またアフリカツメガエルでは MBT は胞胚期に存在するが、マウスでは MBT 様の現象が二細胞期に存在するとされている。これらのことから、マウスの胚盤胞における死と、アフリカツメガエルの胞胚期後の死が同等であるかはわからない。さらにマウスの MBT において E2F が重要な機能を担っていたとしても、ノックアウトによってこの阻害に起因した表現型は観察されないかもしれない。ノックアウトマウスといえども、その親であるヘテロマウスから、母性因子として E2F ファミリーの mRNA、蛋白質を持ち込む可能性はあるはずである。特にマウスでは二細胞期に MBT 様の現象が存在するのだから、持ち込んだ mRNA、蛋白質が分解されずに残り、機能することは十分に考えられる。このように考えると、マウスにおける逆遺伝学的な手法は、マウス MBT の解析には不適切であるといえる。よってアフリカツメガエルを用いて得られた知見が、ノックアウトマウスの解析結果と一致していなかったとしても何ら不思議ではない。アフリカツメガエルで得られた結果を哺乳類に還元したいのは確かであるが、MBT に対しての解析は実験材料がアフリカツメガエルであることの利点を生かし、まずアフリカツメガエル MBT の概要を理解すべきであると考えられる。

(5) 最後に

外来性 E2F によって、またおそらく MBT において内在性 E2F によって転写誘導される因子「X」の単離、同定、およびその機能解析が最重要課題である。これによって、MBT における細胞周期変化のメカニズムの大部分が、さらに転写因子 E2F の新たな機能が明らかになると考える。実際に、卵割の遅れが生じ

た初期胚の cDNA ライブラリーを *in vitro* mRNA 合成が可能なベクターを用いて作成し、卵割の遅れを指標とした sib selection を試みたが、因子「X」の単離には残念ながら至らなかった。また因子「X」のプロモーター解析により、MBT 以前の初期胚における転写抑制のメカニズムにも重要な知見が与えられるはずである。

また初期発生において細胞周期変化の時期、および接合体ゲノムからの転写開始の時期が MBT として明確に定義されているのは、アフリカツメガエル（および実験対象に用いられる他の両生類）とショウジョウバエのみであるが、同様の機構はマウスでは二細胞期、ウシ、ヒツジでは八細胞期に存在すると考えられている。よって、アフリカツメガエルの MBT における細胞周期変化の解析から得られる知見は、アフリカツメガエルのみならず、哺乳類における細胞周期変化のメカニズムを考察するのに貢献すると考える。

参考文献

- Adnane, J., Shao, Z., and Robbins, P. D. The retinoblastoma susceptibility gene product represses transcription when directly bound to the promoter. *J. Biol. Chem.* **270** (1995): 8837-8843.
- Akamatsu, E., Tanaka, T., and Kato, J.-y. Transcription factor E2F and Cyclin E-Cdk2 complex cooperate to induce chromosomal DNA replication in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **273** (1998): 16494-16500.
- Amaya, E., Kroll, K. L. A method for generating transgenic frog embryos. *Methods Mol. Biol.* **97** (1999): 393-414.
- Anderson, J. A., Lewellyn, A. L., and Maller, J. L. Ionizing radiation induces apoptosis and elevates Cyclin A1-Cdk2 activity before but not after the midblastula transition in *Xenopus*. *Mol. Biol. Cell* **8** (1997): 1195-1206.
- Arata, Y., Fujita, M., Ohtani, K., Kijima, S., and Kato, J.-y. Cdk2-dependent and -independent pathways in E2F-mediated S phase induction. *J. Biol. Chem.* **275** (2000): 6337-6345.
- Bates, S., Phillips, A. C., Clark, P. A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R. L., and Vousden, K. H. p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* **395** (1998): 124-125.
- Blomberg, I., and Hoffmann, I. Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G1/S transition and leads to premature activation of Cyclin E- and Cyclin A-dependent kinases. *Mol. Cell Biol.* **19** (1999): 6183-6194.
- Bourne, Y., Watson, M. H., Hickey, M. J., Holmes, W., Rocque, W., Reed, S. I. and Tainer, J. A. Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle regulatory protein CksHs1. *Cell* **84** (1996): 863-874.
- Brehm, A., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J., and Kouzarides, T. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* **391** (1998): 597-601.
- Bremner, R., Cohen, B. L., Sopta, M., Hamel, P. A., Ingles, C. J., Gallie, B. L., and Phillips, R. A. Direct transcriptional repression by pRB and its reversal by specific cyclins. *Mol. Cell Biol.* **15** (1995): 3256-3265.
- Brizuela, L., Draetta, G. and Beach, D. p13suc1 acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34cdc2 protein kinase. *EMBO J.* **6** (1987): 3507-3514

- Bush, A., Mateyak, M., Dugan, K., Obaya, A., Adachi, S., Sedivy, J., and Cole, M. *c-myc* null cells misregulate *cad* and *gadd45* but not other proposed *c-Myc* targets. *Genes and Dev.* **12** (1998): 3797-3802.
- Chellappan, S. P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J. M., and Nevins, J.R. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* **65** (1991): 1053-1061.
- Chen, P. L., Scully, P., Shew, J. Y., Wang, J. Y., and Lee, W. H. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* **58** (1989): 1193-1198.
- Chow, K. N., and Dean, D. C. Domain A and B in the Rb pocket interact to form a transcriptional repressor motif. *Mol. Cell Biol.* **16** (1996a): 4862-4868.
- Chow, K. N., Starostik, P., and Dean, D. C. The Rb family contains a conserved cyclin-dependent-kinase-regulated transcriptional repressor motif. *Mol. Cell Biol.* **16** (1996b): 7173-7181.
- Clarke, A. R., Maandag, E. R., van Roon, M., van der Lugt, N. M., van der Valk, M., Hooper, M. L., Berns, A., and te Riele, H. Requirement for a functional *Rb-1* gene in murine development. *Nature* **359** (1992): 328-330.
- Cloud, J. E., Rogers, C., Reza, T. L., Ziebold, U., Stone, J. R., Picard, H. P., Caron, A. M., Bronson, R. T. and Lees, J. A. Mutant mouse models reveal the relative role of E2F1 and E2F3 in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **22** (2002): 2663-2672.
- Clute, P., and Masui, Y. Microtubule dependence of chromosome cycles in *Xenopus laevis* blastomeres under the influence of a DNA synthesis inhibitor, aphidicolin. *Dev. Biol.* **185** (1997): 1-13.
- DeGregori, J., Leone, G., Miron, A., Jakoi, L., and Nevins, J. R. Distinct roles for e2f proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (1997): 7245-7250.
- de Moor, C. H. and Richter, J. D. The Mos pathway regulates cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *Mol. Cell. Biol.* **17** (1997): 6419-6426.
- de Nooij, J. C., Letendre, M. A., Hariharan, I. K. A cyclin-dependent kinase inhibitor, Dacapo, is necessary for timely exit from the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis. *Cell* **87** (1996): 1237-1247.
- Dimova, D. K., Stevaux, O., Frolov, M. V. and Dyson, N. J. Cell cycle-

- dependent and cell cycle-independent control of transcription by the *Drosophila* E2F/RB pathway. *Genes and Dev.* **17** (2003): 2308-2320.
- Dje, M. K., Mazabraud, A., Viel, A., le Maire, M., Denis, H., Crawford, E., and Brown, D. D. Three genes under different developmental control encode elongation factor 1- α in *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res.* **18** (12) (1990): 3489-3493.
- Dobrowolski, S. F., Stacey, D. W., Harter, M. L., Stine, J. T. and Hiebert, S. W. An E2F dominant negative mutant blocks E1A induced cell cycle progression. *Oncogene* **9** (1994): 2605-2612.
- Dong, Z., Xu, R.H., Kim, J., Suzuki, A., Ueno, N., Sredni, D., Colburn, N.H., and Kung, H. AP-1/jun is required for early *Xenopus* development and mediates mesoderm induction by fibroblast growth factor but not by activin. *J. Biol. Chem.* **271** (17) (1996): 9942-9946.
- Dunaief, J. L., Strober, B. E., Guha, S., Khavari, P. A., Alin, K., Luban, J., Begemann, M., Crabtree, G. R., and Goff, S. P. The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell* **79** (1994): 119-130.
- Dunphy, W. G., and Kumagai, A. The *cdc25* protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell* **67** (1991): 189-196.
- Dyson, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes and Dev.* **12** (1998): 2245-2262.
- Edgar, B. A., and Datar, S. A. Zygotic degradation of two maternal *Cdc 25* mRNAs terminates *Drosophila's* early cell cycle program. *Genes and Dev.* **10** (1996): 1966-1977.
- Ferreira, R., Magnaghi-Jaulin, L., Robin, P., Harel-Bellan, A., and Trouche, D. The three members of the pocket proteins family share the ability to repress E2F activity through recruitment of a histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (1998): 10493-10498.
- Ferrell, J. E., Wu, M., Gerhart, J. C. and Martin, G. S. Cell-cycle tyrosine phosphorylation of p34^{Cdc2} and a microtubule-associated protein-kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs. *Mol. Cell. Biol.* **11** (1991): 1965-1971.
- Field, S. J., Tsai, F.-Y., Kuo, F., Zubiaga, A. M., William, J., Kaeli, G., Livingston, D. M., Orkin, S. H. and Greenberg, M. E. E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* **85** (1996): 549-561.

- Flemington, E. K., Speck, S. H., and Kaelin, W. G., Jr. E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (1993): 6914-6918.
- Furnari, B., Rhind, N., and Russell, P. Cdc25 mitotic inducer targeted by Chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science* **277** (1997): 1495-1497.
- Galaktionov, K., and Beach, D. Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatase by B-type Cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins. *Cell* **67** (1991): 1181-1194.
- Galaktionov, K., Chen, X., and Beach, D. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of *c-myc*. *Nature* **382** (1996): 511-517.
- Galaktionov, K., Jesus, C., and Beach, D. Raf1 interaction with Cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation. *Genes and Dev.* **9** (1995): 1046-1058.
- Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. F., and Kirschner, M.H. cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell* **67** (1991): 197-211.
- Gaubatz, S., Lindeman, G. J., Ishida, S., Jakoi, Laszlo., Nevins, J. R., Livingston, D. M. and Rempel, R. E. E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Mol. Cell* **6** (2000): 729-735.
- Geng, Y., Whoriskey, W., Park, M. Y., Bronson, R. T., Medema, R. H., Li, T., Weinberg, R. A., and Sicinski, P. Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin of cyclin E. *Cell* **97** (1999): 767-777.
- Girling, R., Bandara, L. R., Ormondroyd, E., Lam, E. W.-F., Kotecha, S., Mohun, T., and La Thangue, N. B. Molecular characterization of *Xenopus laevis* DP proteins. *Mol. Biol. Cell* **5** (1994): 1081-1092.
- Gu, Y., Rosenblatt, J., and Morgan, D. O. Cell cycle regulation of CDK2 Activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *EMBO J.* **11** (1992): 3995-4005.
- Guadagno, T. M., Newport, J. W. Cdk2 kinase is required for entry into mitosis as a positive regulator of Cdc2-cyclin B kinase activity. *Cell* **84** (1996): 73-82.
- Harbour, J. W., and Dean, D. C. Rb function in cell-cycle regulation and

- Apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **2** (2000a): E65-E67.
- Harbour, J. W., and Dean, D. C. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes and Dev.* **14** (2000b): 2393-2409.
- Harbour, J. W., Luo, R. X., Dei Sante, A., Postigo, A. A., and Dean, D. C. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interaction that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* **98** (1999): 859-869.
- Hartley, R. S., Rempel, R. E. and Maller, J. L. *In vivo* regulation of the early embryonic cell cycle in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **173** (1996): 408-419.
- Hartley, R. S., Sible, J. C., Lewellyn, A. L., and Maller, J. L. A role for Cyclin E/Cdk2 in the timing of the midblastula transition in *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* **188** (1997): 312-321.
- Helin, K., Harlow, E., and Fattaey, A. Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol. Cell Biol.* **13** (1993): 6501-6508.
- Hensley, C., and Gautier, J. Programmed cell death during *Xenopus* development: a spatio-temporal analysis. *Dev. Biol.* **203** (1998): 36-48.
- Hilberg, F., Aguzzi, A., Howells, N., Wagner, E. F. c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* **365** (1993): 179-181.
- Hinchcliffe, E. H., Miller, F. J., Cham, M., Khodjakov, A., Sluder, G. Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase. *Science* **283** (1998): 851-854.
- Hinds, P. W., Mitnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S. I., and Weinberg, R. A. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* **70** (1992): 993-1006.
- Hoffman, B., and Liebermann, D. A. The proto-oncogene *c-myc* and apoptosis. *Oncogene* **17** (1998): 3351-3357.
- Hoffmann, I., Draetta, G., and Karsenti, E. Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO J.* **13** (1994): 4302-4310.
- Howe, J. A., Howell, M., Hunt, T., Newport, J.W. Identification of a developmental timer regulating the stability of embryonic cyclin A and a new somatic A-type cyclin at gastrulation. *Genes and Dev.* **9** (1995): 1164-1176.

- Howe, J. A., and Newport, J. W. A developmental timer regulates degradation of cyclin E1 at the midblastula transition during *Xenopus* embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996): 2060-2064.
- Hsiao, K. M., McMahon, S. L., and Farhham, P. J. Multiple DNA elements are required for the growth regulation of the mouse E2F-1 promoter. *Genes and Dev.* **13** (1994): 1526-1537.
- Hsieh, J. K., Fredersdorf, S., Kouzarides, T., Martin, K., and Lu, X. E2F1-induced apoptosis requires DNA binding but not transactivation and is inhibited by the retinoblastoma protein through direct interaction. *Genes and Dev.* **11** (1997): 1840-1852.
- Humbert, P. O., Verona, R., Trimarchi, J. M., Rogers, C., Dandapani, S. and Lees, J. A. *E2f3* is critical for normal cellular proliferation. *Genes and Dev.* **14** (2000): 690-703.
- Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E. M., Bronson, R. T., Goodell, M. A., and Weinberg, R. A. Effect of an Rb mutation in the mouse. *Nature* **359** (1992): 295-300.
- Jinno, S., Suto, K., Nagata, A., Igarashi, M., Kanaoka, Y., Nojima, H., and Okayama, H. Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO J.* **13** (1994): 1549-1556.
- Johnson, D. G., Ohtani, K., and Nevins, J. R. Autoregulatory control of E2F1 expression in response to positive and negative regulators of cell cycle progression. *Genes and Dev.* **13** (1994): 1515-1525.
- Kappas, N. C., Savage, P., Chen, K. C., Walls, A. T., and Sible, J. C. Diss-
ection of the XChk1 signaling pathway in *Xenopus laevis* embryos. *Mol. Biol. Cell* **11** (2000): 3101-3108.
- Krek, W., Xu, G., and Livingston, D. M. Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint. *Cell* **83** (1995): 1149-1158.
- Krek, W., Ewen, M. E., Shirodkar, S., Arany, Z., Kaelin Jr, W. G., and Livingston, D. M. Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound Cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* **78** (1994): 161-172.
- Kerkhoff, E., and Rapp, U. R. Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene* **17** (1998): 1457-1462.
- Kim, S. H., Li, C., and Maller, J. L. A maternal form of the phosphatase Cdc25A regulates early embryonic cell cycles in *Xenopus laevis*. *Dev.*

- Biol.* **212** (1999): 381-391.
- Komiya, T., Itoh, K., Ikenishi, K., Furusawa, M. Isolation and characterization of a novel gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **162** (1994): 354-363.
- Kohn, M. J., Bronson, R. T., Harlow, E., Dyson, N. J., Yamasaki, L. Dp1 is required for extra-embryonic development. *Development* **7** (2003): 1295-1305.
- Kovesdi, R. R., and Nevins, J. R. Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell* **45** (1986): 219-228.
- Kowalik, T. F., DeGregori, J., KSchwartz, J. and Nevins, J. R. E2F-1 overexpression in quiescent fibroblasts leads to induction of cellular DNA synthesis and apoptosis. *J. Virol.* **69** (1995): 2491-2500.
- Krieg, P. A., Varnum, S. M., Wormington, W. M., and Melton, D. A. The mRNA encoding elongation factor-1 alpha (EF-1 alpha) is a major transcript at the midblastula transition in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **133** (1989): 93-100.
- Kroll, K. L., Amaya, E. Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* **122** (1996): 3173-3183.
- Kumagai, A., and Dunphy, W. G. Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. *Genes and Dev.* **13** (1999): 1067-1072.
- Lane, M. E., Sauer, K., Wallace, K., Jan, Y. N., Lehner, C. F., Vaessin, H. A cyclin-dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell* **87** (1996): 1225-1235.
- Lee, E. Y., Chang, C. Y., Hu, N., Wang, Y. C., Lai, C. C., Herrup, K., Lee, W. H., and Bradley, A. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* **359** (1992): 288-294.
- Lee, J.-O., Russo, A. A., and Pavletich, N. P. Structure of the retinoblastoma tumor-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature* **391** (1998): 859-865.
- Lindeman, G. J., Gagnino, L., Gaubatz, S., Xu, Y., Bronson, R. T., Warren, H. B. and Livingston, D. M. A specific, nonproliferative role for E2F-

- 5 in choroid plexus function revealed by gene targeting. *Gene and Dev.* **12** (1998): 1092-1098.
- Lundberg, A. S., and Weinberg, R. A. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-Cdk complexes. *Mol. Cell Biol.* **18** (1998): 753-761.
- Luo, R. X., Postigo, A. A., and Dean, D. C. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* **92** (1998): 463-473.
- Macleod, K. F., Hu, Y., and Jacks, T. Loss of Rb activates both p53-dependent and independent cell death pathway in the developing mouse nervous system. *EMBO J.* **15** (1996): 6178-6188.
- Magnaghi, J. L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le, V. J., Troalen, F., Trouche, D., and Harel, B. A. Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* **391** (1998): 601-605.
- Masui, Y., and Wang, P. Cell cycle transition in early embryonic development of *Xenopus laevis*. *Biol. Cell* **90** (1998): 537-548.
- Matsuoka, S., Huang, M., and Elledge, S. J. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* **282** (1998): 1893-1897.
- Matsushime, H., Ewen, M. F., Strm, D. K., Kato, J., Hanks, S. K., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. Identification and properties of an atypical catalytic subunits (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian type G1 cyclins. *Cell* **71** (1992): 323-334.
- Meloni, A. R., Smith, E. J., and Nevins, J. R. A mechanism for Rb/p130-mediated transcription repression involving recruitment of the CtBP corepressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (1999): 9574-9579.
- Mendoza, M., Hyman, A. A., Glotzer, M. GTP binding induces filament assembly of a recombinant septin. *Curr. Biol.* **12** (2002): 1858-1863.
- Minshull, J., Golsteyn, R., Hill, C. S., Hunt, T. The A- and B-type cyclin associated cdc2 kinases in *Xenopus* turn on and off at different times in the cell cycle. *EMBO J.* **9** (1990): 2865-2875.
- Morgan, D. O. Principles of CDK regulation. *Nature* **374** (1995): 131-134.
- Morgan, D. O. Cyclin-dependent kinase: Engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13** (1997): 261-291.
- Morgenbesser, S. D., Williams, B. O., Jacks, T., and Depinho, R. A. p53-

- dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature* **371** (1994): 72-74.
- Morkel, M., Wenkel, J., Bannister, A. J., Kouzarides, T., and Hagemeyer, (A) An E2F-like repressor of transcription. *Nature* **390** (1997): 567-568.
- Murakami, M. S. and Vande woude, G. F. Analysis of the early embryonic cell cycles of *Xenopus*; regulation of cell cycle length by Xe-weel and Mos. *Development* **125** (1998): 237-248.
- Murga, M., Fernandez-Capetillo, O., Field, S. J., Moreno, B., Borlado, L. R., Fujiwara, Y., Balomenos, D., Vicario, A., Carrera, A. C., Orkin, S. H., Greenberg, M. E. and Zubiaga, A. M. Mutation of E2F2 in mice cause enhanced T lymphocyte proliferation, leading to the development of autoimmunity. *Immunity* **15** (2001): 959-970.
- Nakajo, N., Yoshitome, S., Iwashita, J., Iida, M., Uto, K., Ueno, S., Okamoto, K. and Sagata, N. Absence of Weel ensure the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes. *Genes Dev.* **14** (2000): 328-338.
- Neuman, E., Flemington, E. K., Sellers, W. R., and Kaelin, Jr., W. G. Transcription of the E2F-1 gene is rendered cell cycle dependent by E2F DNA-binding sites within its promoter. *Mol. Cell Biol.* **14** (1994): 6607-6615.
- Nevins, J. R. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* **258** (1992): 424-429.
- Newport, J., and Dasso, M. On the coupling between DNA replication And mitosis. *J. Cell Sci. Suppl.* **12** (1989): 149-160.
- Newport, J., and Kirschner, M. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. Characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell* **30** (1982a): 675-686.
- Newport, J., and Kirschner, M. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription. *Cell* **30** (1982b): 687-696.
- Nieuwkoop, P. D. and Faber, J. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). North-Holland Publishing Company, Amsterdam (1956).
- Nurse, P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344** (1990): 503-508.
- Nurse, P. Checkpoint pathways come of age. *Cell* **91** (1997): 865-867.
- Obaya, A. J., Mateyak, M. K., and Sedivy, J. M. Mysterious liaisons: the

- relationship between c-Myc and the cell cycle. *Oncogene* **18** (1999): 2934-2941.
- Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D. M., Nakatani, Y. A complex with Chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* **296** (2002): 1132-1136.
- Okamoto, K., Nakajo, N. and Sagata, N. The existence of two distinct Wee1 isoforms in *Xenopus*: implications for the developmental regulation of the cell cycle. *EMBO J.* **21** (2002): 2472-2484.
- Okazaki, K., Hayashida, K., Iwashita, J., Harano, M., Furuno, N., and Sagata, N. Isolation of a cDNA encoding the *Xenopus* homologue of mammalian Cdc25A that can induce meiotic maturation of oocytes. *Gene* **178** (1996): 111-114.
- Pan, H., and Griep, A. E. Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development. *Genes and Dev.* **9** (1995): 2157-2169.
- Phillips, A. C., Bates, S., Ryan, K. M., Helin, K., and Vousden, K. H. Induction of DNA synthesis and apoptosis are separable functions of E2F-1. *Genes and Dev.* **11** (1997): 1853-1863.
- Phillips, A. C., Ernst, M. K., Bates, S., Rice, N. R., and Vousden, K. H. E2F-1 potentiates cell death by blocking anti-apoptotic signaling pathways. *Mol. Cell* **4** (1999): 771-781.
- Philpott, A., and Friend, S. H. E2F and its developmental regulation in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell Biol.* **14** (1994): 5000-5009.
- Pomerantz, J., Schreiber, A. N., Liegeois, N. J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H. W., et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with Mdm2 and neutralizes Mdm2's inhibition of p53. *Cell* **92** (1998): 713-723.
- Prioleau, M. N., Huet, J., Sentenac, A., Mechali, M. Competition between chromatin and transcription complex assembly regulates gene expression during early development. *Cell* **77** (1994): 439-449.
- Qin, X. D., Livingston, D. M., Kaelin Jr, W. G. and Adams, P. D. Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **8** (1994): 1092-1098.
- Rempel, R. E., Saenz-Robles, M. T., Storms, R., Morham, S., Ishida, S., Engel, A., Jakoi, L., Melhem, M. F., Pipas, J. M., Smith, C. and Nevins, J. R. Loss of E2F4 activity leads to abnormal development of multiple

- cellular lineages. *Mol. Cell* **6** (2000): 293-306.
- Ross, J. F., Liu, X., and Dynlacht, B. D. Mechanism of transcriptional repression of E2F by the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Mol. Cell* **3** (1999): 195-205.
- Sagata, N., Watanabe, N., Vande Woude, G. F., Ikawa, Y. The c-mos proto-oncogene product is acytostaatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* **342** (1989): 512-518.
- Sagata, N. What does Mos do in oocytes and somatic cells ? *Bioessays* **19** (1997): 13-21.
- Sadhu, K., Reed, S. I., Richardson, H., and Russell, P. Human homolog of fission yeast *cdc25* mitotic inducer is predominantly expressed in G2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** (1990): 5139-5143.
- Samiei, M., Daya-Makin, M., Clark-Lewis, I. and Pelech, S. Platelet-activating factor and thrombin-induced stimulation of p34cdc2-cyclin histone H1 kinase activity in Platelets. *J. Biol. Chem.* **266** (1991): 14889-14892.
- Sardet, C., Vidal, M., Cobrinik, D., Geng, Y., Onufryk, C., Chen, A., and Weinberg, R. A. E2F-4 and E2F-5, two members of the E2F family, are expressed in the early phase of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (1995): 2403-2407.
- Sellers, W. R., Rodgers, J. W., and Kaelin, Jr., W. G. A potent transrepression domain in the retinoblastoma protein induces a cell cycle arrest when bound to E2F sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (1995): 11544-11548.
- Shan, B., Zhu, X., Chen, P. L., Durfee, T., Yang, Y., Sharp, D., and Lee, W.H. Molecular cloning of cellular genes encoding retinoblastoma-associated proteins: identification of a gene with properties of the transcription factor E2F. *Mol. Cell Biol.* **12** (1992): 5620-5631.
- Shan, B. and Lee, W. H. Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **14** (1994): 8166-8173.
- Sherr, C. J. Cancer cell cycles. *Science* **274** (1996): 1672-1677.
- Sherr, C. J. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes and Dev.* **12** (1998): 2984-2991.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes and Dev.* **13** (1999): 1501-1512.

- Shimuta, K., Nakajo, N., Uto, K., Hayano, Y., Okazaki, K., Sagata, N. Chk1 is activated transiently and targets Cdc25A for degradation at the *Xenopus* midblastula transition. *EMBO J.* **21** (2002): 3694-3703.
- Shou, W., Dunphy, W. G. Cell cycle control by *Xenopus* p28Kix1, a developmentally regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Mol. Cell. Biol.* **7** (1996): 457-469.
- Sible, J. C., Anderson, J. A., Lewellyn, A. L., and Maller, J. L. Zygotic transcription is required to block a maternal program of apoptosis in *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* **189** (1997): 335-346.
- Singh, P., Coe, J., and Hong, W. A role for retinoblastoma protein in potentiating transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *Nature* **374** (1995): 562-565.
- Smith, R. C., Dworkin, M. B., Dworkin-Rastl, E. Destruction of a translationally controlled mRNA in *Xenopus* oocyte delays progesterone-induced maturation. *Genes and Dev.* **10** (1988): 1296-1306.
- Stack, J. H., and Newport, J. W. Developmentally regulated activation of apoptosis early in *Xenopus* gastrulation results in cyclin A degradation during interphase of the cell cycle. *Development* **124** (1997): 3185-3195.
- Stancheva, I., and Meehan, R. R. Transient depletion of xDnmt1 leads to premature gene activation in *Xenopus* embryos. *Genes and Dev.* **14** (2000): 313-327.
- Stancheva, I., Hensey, C. and Meehan, R. R. Loss of maintenance methyltransferase, xDnmt1, induces apoptosis in *Xenopus* embryos. *EMBO J.* **20** (2001): 1963-1973.
- Steele, R. E., Unger, T. F., Mardis, M. J., and Fero, J. B. The two *Xenopus laevis* SRC genes are co-expressed and each produces functional pp60src. *J. Biol. Chem.* **264** (1989): 10649-10653.
- Suzuki, A., and Hemmati-Brivanlou, A. *Xenopus* embryonic E2F is required for the formation of ventral and posterior cell fates during early embryogenesis. *Mol. Cell* **5** (2000): 217-229.
- Trimarchi, J. M., Fairchild, B., Verona, R., Moberg, K., Andon, N., and Lees, J. A. E2F-6, a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (1998): 2850-2855.
- Trimarchi, J. M. and Lee, J. A. Sibling rivalry in the E2F family. *Nature*

- reviews* **3** (2002): 11-20.
- Uto, K., Nakajo, N., Sagata, N. Two structural variants of Nek2 kinase, termed Nek2A and Nek2B, are differentially expressed in *Xenopus* tissues and development. *Dev. Biol.* **208** (1999): 456-464.
- Vassetzky, Y., Hair, A., and Mechali, M. Rearrangement of chromatin Domains during development in *Xenopus*. *Genes and Dev.* **14** (2000): 1541-1552.
- Vigo, E., Muller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M. C., and Helin, K. CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol. Cell Biol.* **19** (1999): 6379-6395.
- Weinberg, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81** (1995): 323-330.
- Weintraub, S. J., Prater, C. A., and Dean, D. C. Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* **358** (1992): 259-261.
- Weintraub, S. J., Chow, K. N., Luo, R. X., Zhang, S. H., He, S., and Dean, D. C. Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature* **375** (1995): 812-815.
- Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, H. I., Sang, L., Chong, G. T., Nuckolls, F., Giangrande, P., Wright, F. A., Field, S. J., Greenberg, M. E., Orkin, S., Nevins, J. R., Robinson, M. L. and Leone, G. The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* **414** (2001): 457-462.
- Yang, J., Winkler, K., Yoshida, M., and Kornbluth, S. Maintenance of G2 arrest in the *Xenopus* oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import. *EMBO J.* **18** (1999): 2174-2183.
- Yang, J., Tan, C., Darken, R. S., Wilson, P. A. and Klein, P. S. β -Catenin/Tcf-regulated transcription prior to the midblastula transition. *Development* **129** (2002): 5743-5752.
- Zhang, H. S., Gavin, M., Dahiya, A., Postigo, A. A., Ma, D., Luo, R. X., Harbour, J. W., and Dean, D. C. Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* **101** (2000): 79-89.
- Zhang, H. S., Postigo, A. A., and Dean, D. C. Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by

- p16INK4a, TGF β , and contact inhibition. *Cell* **97** (1999): 53-61.
- Zhang, Y., Xiong, Y., and Yarbrough, W. G. ARF promotes Mdm2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* **92** (1998): 725-734.
- Zhou, B. B. and Elledge S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408** (2000): 433-439.
- Zhu, J. W., Field, S. J., Gore, L., Thompson, M., Yang, H., Fujiwara, Y., Cardiff, R. D., Greenberg, M., Orkin, S. H. and Degregori, J. E2F1 and E2F2 determine thresholds for antigen-induced T-cell proliferation and suppress tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* **21** (2001): 8547-8564.
- 久保田真 トランスジェニックフロッグを用いたサイクリンD1発現制御機の解析 修士論文 (2001)
- 妹尾徳恵 アフリカツメガエル初期発生過程におけるサイクリンEの安定化機構の解析 修士論文 (2001)
- 中條信成、宇都克裕、大江智也、岡本健吾、佐方功幸 母性因子と胚性因子による細胞周期制御 実験医学 vol.18 No.7 (増刊) (2000): 210-215

謝辞

動物分子遺伝学講座の加藤順也教授、加藤規子助手、友田紀一郎助手の皆様
に感謝致します。

細胞増殖学講座の竹家達夫教授、石田教弘助手、与語圭一郎助手の皆様
に感謝致します。

東京工業大学生命理工学研究科の喜多村直美教授、駒田雅之助教授、伝田公
紀助手、田中利明助手の皆様
に感謝致します。

奈良先端科学技術大学院大学、安田國雄副学長に感謝致します。

2004年1月 小野達也