

## 論文審査の結果の要旨

氏名 原 賢太郎

本論文は、マウス初期胚を用いて、受精後に開始される胚性遺伝子の発現 (Embryonic gene activation; EGA) を調節するメカニズムを明らかにすることを目的としたものである。全体は3章からなり、第1章では受精後の cyclin A2 の合成、およびそれに伴う cdk2 の活性化が EGA に関与するという点について、第2章では cyclin A2/cdk2 の基質としての pRb のリン酸化状態について、第3章では pRb のリン酸化に伴うヒストンのアセチル化の変化について述べられている。

第1章では、まず受精後に cyclin A2 の核内局在が起こることを確認し、それがポリ A 鎖の伸張を抑制することにより阻害されることを明らかにした。すなわち cyclin A2 は受精前に蓄積された母性 mRNA の転写後調節により、受精後に特異的に発現することが示された。次いで、cyclin A2 との結合により活性化される cdk2 の活性を阻害剤により抑制すると、転写活性の低下すなわち EGA の抑制が見られた。さらに、cyclin A2 の合成をその siRNA で特異的に阻害することにより、EGA が抑制された。このとき DNA 合成の抑制は見られなかった。したがって、cyclin A2/cdk2 は DNA 複製非依存的に、受精後の遺伝子発現を調節することが明らかとなった。

第2章では、cyclin A2/cdk2 が EGA を調節するメカニズムとして、cdk2 の基質の1つである転写因子 pRb のリン酸化状態に注目した実験結果が示されている。cyclin A2/cdk2 によってリン酸化されやすいとされる Thr356、Ser249/Thr252、Ser807/Ser811 は、マウス1細胞期胚において、いずれも転写開始前の媒精後6時間から、転写開始後の媒精後12時間にかけてそのリン酸化レベルが増加していた。さらに、増加したリン酸化レベルは、cdk2 の阻害剤によって抑制された。特に Thr356 については、外来 cyclin A2/cdk2 蛋白質の注入によってそのリン酸化レベルが増加した。さらに、siRNA を用いて cyclin A2 蛋白質の合成を阻害した1細胞期胚においては、Thr356 のリン酸化レベルが抑制された。以上の結果から、pRb の Thr356 は cyclin A2/cdk2 蛋白質によってリン酸化されていることが明らかとなり、cdk2 による pRb のリン酸化によって1細胞期胚の転写開始が制御されていることが示唆された。

第3章では、cyclin A2/cdk2 によりリン酸化された pRb2 が遺伝子発現を活性化

するメカニズムとして次のようなモデルを構築しこれを証明する実験を行った。まず pRb がリン酸化されることでヒストン脱アセチル化酵素が遺伝子プロモーター領域から乖離し、これによってヒストンのアセチル化が上昇し遺伝子発現が活性化される、というものである。免疫染色の結果、H3(Lys9)、H3(Lys14)、H4(Lys5)、そして H4(Lys12)のアセチル化レベルは、いずれも転写開始前の媒精後 6 時間から、転写開始後の媒精後 12 時間にかけて増加することが明らかとなった。しかし、Ros 処理をした 1 細胞期胚では、H3(Lys9)のアセチル化レベルにおいてのみ、その減少が確認された。この結果は cdk2 による pRb のリン酸化が HDAC の解離を引き起こし、それが H3(Lys9)のアセチル化レベルを増加させたことを示唆している。この cdk2 の働きにおいて cyclin A2/cdk2 が関与していることを裏付けるために、1 細胞期胚に外来 cyclin A2/cdk2 蛋白質を注入してみたところ、H3(Lys9)のアセチル化レベルがやや増加した。しかしながら、siRNA を用いて cyclin A2 の翻訳を阻害した 1 細胞期胚においては H3(Lys9)のアセチル化レベルが抑制されなかった。以上より、1 細胞期胚の転写開始に備えて、cdk2 により H3(Lys9)がアセチル化が誘導され、転写開始許容状態が形成される事は示唆されるが、その過程には cyclin A2 以外の cyclin ファミリーが関与しているものと考えられる。

これらの結果から、マウス 1 細胞期胚における転写開始には、母性由来の mRNA から新規に合成された cyclin A2 が cdk2 を活性化することが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに cyclin A2/cdk2 が pRb のリン酸化およびヒストンのアセチル化を介して遺伝子発現を調節する機構が示唆された。この様に本研究は、受精によって新しい生命が誕生した後、最初に行われる遺伝子発現について、それを調節するメカニズムの解明に大きく寄与するものであると考えられる。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。