

(別紙2)

## 審査の結果の要旨

申請者 松橋 珠子

着床期になると、胚はそれまでの内在的にプログラム化された遺伝子発現から、外部シグナルに依存した遺伝子発現へとその制御機構を切り替える。卵巣からのエストロゲン ( $E_2$ ) 分泌がない環境下では、胚は着床直前で発生を停滞し休眠状態に至る。しかし母体に  $E_2$  を投与すると、胚は再び発生を開始する。これは  $E_2$  に由来する外部シグナルが着床期以降の胚発生に必須であることを意味する。しかし、このような胚の休眠化と活性化が起こるメカニズムは全くわかっていない。そこで本研究では、着床期胚の発生調節機構を明らかにするために、妊娠マウスの卵巣除去と母体への  $E_2$  投与によって人為的に胚の休眠状態と活性化状態を誘導できる着床遅延モデルを用い、特に胚の細胞増殖能と遺伝子発現制御機構に着目した実験を行った。

まず、着床期胚の胚発生における  $E_2$  の作用を調べた。交配後 3.5 日目に卵巣除去を行い  $E_2$  の作用を阻害して胚の細胞増殖を調べた結果、交配後 5 日目まで等比級数的に細胞数が増加し、その後は細胞増殖が停止することがわかった。この休眠胚に対し  $E_2$  を作用させて細胞の DNA 合成活性を調べたところ、休眠胚では活性はほとんど検出されなかったのに対し、 $E_2$  投与後 16 時間後には胚のおよそ 30% の細胞で DNA の合成、すなわち S 期への進行が検出された。一方、M 期にある細胞の割合は増加せず、休眠胚は G1 期で細胞周期を停止していることが示唆された。胚の総転写活性は、休眠胚では交配後 4 日目より有意に低下し、活性化胚では休眠胚より有意に上昇した。以上より  $E_2$  の作用が無い場合、胚は総転写活性を低下させ細胞周期を G1 期で停止すること、 $E_2$  の作用を受けると総転写活性が上昇し、細胞周期の進行を開始することが明らかとなった。

次に、胚の細胞増殖および遺伝子発現の制御機構に対する  $E_2$  の作用を明らかにするため、細胞周期の制御に関わる因子の発現と、遺伝子発現を制御するエピジェネティックな修飾の変化を明らかにすることを試みた。休眠胚は G1 期で細胞周期を停止することから、G1 期の進行を制御する因子に着目した。その結果、着床期の胚ではサイクリン D1 の発現が開始し、 $E_2$  がこれを誘導することが示された。休眠胚では G1 期サイクリン発現は低下し、p21 の発現は上昇していた。活性化胚では、G1 期サイクリンの発現が上昇し p21 の発現は低下した。これより、胚の細胞増殖調節機構は着床期に変換し、 $E_2$  は変換後の細胞周期進行を開始させる役割を担っていることが示唆された。

また、ヒストンH3及びH4のアセチル化修飾とメチル化修飾、そしてヒストン変異体の置換に着目して、交配後4日目の胚および休眠胚と活性化胚でE<sub>2</sub>の作用に関連する修飾の探索を試みた。その結果、多くの修飾は活性化に伴う胚の総転写活性の変化に関わらず、明確な修飾量の変化を示さなかったが、ヒストンH3 Lysine 9 (H3K9)のジメチル化修飾とH3.1の変異体であるH3.3への置換量は総転写活性に相関した変化を示した。H3K9のジメチル化修飾は休眠胚のICMで高く、着床期胚の発生進行に関わる遺伝子の発現を抑制していること、H3.3は交配後4日目胚および活性化胚で核小体に強く検出され、rRNA合成促進による活性化胚の翻訳効率増加に関与していることが示唆された。

さらに本研究では、胚培養系を用い因子添加の有無による*in vitro*休眠化・活性化胚作製系の確立を試みた。胚活性化の指標として着床能獲得の指標に用いられるoutgrowth現象を用いた。因子無添加の場合、胚は胚盤胞までは正常に発生したが、受精後4日目の透明帯から脱出後はoutgrowth現象を起こさず、胚発生を停止して休眠化状態となった。受精後5日目にEGF、E<sub>2</sub>、4-OH-E<sub>2</sub>を単独あるいは2種類添加した場合、胚のoutgrowth現象は見いだせなかったが、FBSを添加した場合にはoutgrowth現象が観察され、活性化状態となった。しかし、これらの*in vitro*休眠・活性化胚では一部の遺伝子発現とヒストン修飾が*in vivo*の休眠・活性化胚と異なっており、outgrowthを指標として再現した今回の*in vitro*モデルは、*in vivo*の遺伝子発現制御機構や細胞周期制御機構を完全には再現していないことが明らかとなった。

本研究から、胚は着床期に遺伝子発現のメカニズムを大きく転換し、E<sub>2</sub>由来の外因性シグナルは転換期以降の遺伝子発現や細胞周期進行に重要な役割を担っていることが明らかとなった。以上の成果は、学術上、応用上貢献するところが少なくない。審査委員一同は、本論分が博士(獣医学)の学位論文として価値あるものと認めた。