

論文審査の結果の要旨

氏名 秋山 智彦

本論文は、マウスの卵形成および受精後の初期胚発生におけるヒストン H3 変異体の動態解析を行うことで、受精前後における遺伝子発現リプログラミングの調節機構の解明を試みたものである。特に遺伝子発現のリプログラミングを、受精前後の分化全能性の獲得、受精後の初期発生期における未分化性の維持および未分化から分化への進行という2つの現象に分け、それらを制御する分子メカニズムの解明を試みた。全体は2章からなり、以下のような内容となっている。

第1章では、受精前後における分化全能性の獲得機構について調べた結果を記した。その内容は以下の通りである。マウスの卵巣より成長卵を回収し、Flag-H3.3 mRNAを細胞質にマイクロインジェクションしてから抗 Flag 抗体で免疫染色したところ、翻訳された Flag-H3.3 が核内に移行していることを確認した。そこで、この卵を培養し第2減数分裂中期に達した後に *in vitro* で受精させた。その結果、未受精卵の染色体上に局在していた Flag-H3.3 は受精直後に形成された雌性前核からグローバルに消去されていることが明らかとなった。さらに *in vivo* の卵成長過程で形成されるゲノム上の H3.3 の置換を確認するために、転写が活発に行われている卵成長期に Flag-H3.3 を発現するトランスジェニックマウスの作製を試みた。トランスジェンとしては、卵成長期に特異的に発現する *Zp3* プロモーターの下流に Flag-H3.3 をつなげたものを用いた。このトランスジェニックマウスから卵を採取し解析した結果、卵成長期に発現して核に組み込まれた Flag-H3.3 は成長卵にも維持されていることがわかった。さらに、mRNA マイクロインジェクションの結果と同様に、受精前までにクロマチンを構成していた H3.3 は受精後に雌性前核から抜けていくことが明らかとなった。以上の結果から、遺伝子発現の cell memory として機能する H3.3 が受精後にゲノムワイドに消去され、そのことが遺伝子発現プログラムの初期化機構に関与していることが強く示唆された。

第2章では、受精後の初期発生期における未分化性の維持および未分化から分化への進行を調節するメカニズムについて調べた。初期胚では発生が進行するにしたがって、未分化な状態から分化した状態へと変化する。その変化にクロマチン構造が関与している可能性があるため、初期胚におけるヒストン H3 変異体の核内局

在をクロマチン形態の観点から調べた。クロマチンの形態は、不活性化された領域が多く存在する密に凝集したクロマチンであるヘテロクロマチンと、活性化した遺伝子領域が多く存在する緩んだクロマチンであるユークロマチンとに大別される。本実験では未分化な状態である 2 細胞期胚と、分化が起こっている状態の胚盤胞期胚を比較した。クロマチン形態の区別は DNA 染色によってヘテロクロマチン領域が濃く染色されるので明瞭に見分けることができる。その結果、Flag-H3.1 は前述したように 2 細胞期までには核に局在せず、どのクロマチン領域にも局在しなかった。ところが胚盤胞期になると Flag-H3.1 はユークロマチンおよびヘテロクロマチン領域にシグナルが観察された。Flag-H3.2 は 2 細胞期と胚盤胞期のどちらの時期も両方のクロマチン領域に局在していた。また Flag-H3.3 は 2 細胞期ではユークロマチンおよびヘテロクロマチン領域の両方に検出されたが、胚盤胞期ではユークロマチン領域に多く局在しており、ヘテロクロマチン領域にはほとんど局在が見られなかった。近年、H3.3 は遺伝子の活性化にかかわるヒストン修飾がなされ、いわゆる「ゆるんだ」状態のクロマチン構造を作り、逆に H3.1 は遺伝子の不活性化にかかわる修飾を受けて凝集したクロマチン構造を作るという報告がなされている。したがって、発生初期には H3.3 がゲノム上のどの領域にも存在することで可塑性を持つ、すべてのゲノム領域で「ゆるんだ」クロマチン構造を形成していると考えられる。さらに、発生が進行するにつれて H3.1 が新たにゲノムに組み込まれていき、その一方で H3.3 がヘテロクロマチン領域から消失していくというダイナミックなヒストン変異体置換がゲノム領域のサイレンシングに関与していることが示唆された。

以上のように、本論文は、これまでまったく明らかにされていなかった受精前後における遺伝子発現リプログラミングの調節機構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。