

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 遠藤 壘

ヒストン H3・H4 は DNA の高次構造であるヌクレオソームのコアヒストン構成単位である。その N 末端には様々な化学修飾を受けるヒストンテールが存在し、この部位のアセチル化はクロマチン構造の変化や遺伝子発現の制御への関与が示唆されている。

近年マウス卵において、減数分裂開始前(GV 期) のクロマチンではヒストンが高度にアセチル化されているが、減数分裂開始後の第二減数分裂中期(M2)までにクロマチン全体で脱アセチル化されることが報告された。この現象は体細胞にはみられないため、体細胞で維持されていた“細胞記憶”の消去による全能性の再獲得や、卵特異的な染色体の形成に働く可能性などが示唆されている。この卵特異的脱アセチル化は減数分裂の進行に伴い厳密に制御されていると想像されるが、現在まで、この制御機構は全く不明である。本研究は、減数分裂の進行が緩やかなブタ卵を用い、卵特異的な脱アセチル化制御機構の解明を目的としたものである。

第 1 章では、アセチル化状態の変化を免疫染色法により詳細に調べ、GV 期のアセチル化状態は、核膜消失後まで維持されるが、第一減数分裂中期(M1)で脱アセチル化されることを示した。さらに第一減数分裂後期・終期(AT1)では、クロマチンは一時的にアセチル化され、M2 で再び脱アセチル化されることを示した。この結果から、卵特異的な脱アセチル化は M1 で起こるが、その後分裂ステージごとに劇的に変動しており、卵の細胞周期によって厳密な制御を受けている可能性を示唆した。

第 2 章では細胞周期制御因子である M 期促進因子(MPF)の活性変動が、第 1 章で示したアセチル化レベルの変化とよく相関していることから、この脱アセチル化が MPF 活性によって制御されている可能性を検討した。脱アセチル化は核膜消失後に起こることから、MPF 活性とは無関係にクロマチンが核外因子と接触することで引き起こされる可能性も考えられたため、ブタ GV 期卵の核膜を顕微操作により人為的に破壊し、脱アセチル化が起こるかを解析した。その結果、核膜を破壊した GV 期卵は、MPF が活性化していないにもかかわらず、本来 M1 期で起こるはずの脱アセチル化が観察された。これにより、卵特異的な脱アセチル化は MPF 活性に制御されるのではなく、核膜さえ消失すれば起こること、さらに GV 期の核外に存在する因子が、卵特異的な脱アセチル化に重要であることを示唆した。

マウス GV 期卵の核内にはヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)が存在し、これが卵特異的な脱アセチル化に関与すると考えられている。ではなぜ GV 期の核内に HDAC が存在するにもかかわらず、核膜消失後に脱アセチル化が起こるのか。第 3 章ではこの疑問の解明に取り組んだ。まず核外に HDAC 活性化因子が存在する可能性を考え卵の HDAC 活性変化を測定したが、GV 期の卵には既に高 HDAC 活性が存在し、核膜消失前後で変化しないことを示した。次に、核と細胞質を顕微操作により分離し、GV 期の核外には核内と同程度の高 HDAC 活性が存在し、この核外 HDAC は核内 HDAC とは異なるクラスに属することを示した。この結果から卵特異的な脱アセチル化に核内ではなく核外 HDAC が関与している可能性が考えられた。そこで、GV 期卵の核を除去して細胞質のみとし、これに体細胞核を注入したところ、体細胞クロマチンは核膜消失に伴い、クロマチン全体で脱アセチル化が誘起された。以上より、核内 HDAC は卵特異的な脱アセチル化に必要なく、核外 HDAC が重要であることを初めて明らかにした。

第 4 章では卵特異的な脱アセチル化とヒストン交換反応の関連性について検討を加えた。H4 の N 末端から 20 番目までのアミノ酸残基を欠失させた変異型 H4 を GV 期卵の細胞質に発現させた結果、この変異体 H4 は卵クロマチンに取り込まれることから、GV 期の遊離ヒストンの取り込みには、ヒストンアセチル化、さらにヒストンテールは関与しないことを示した。またこの時のヒストンアセチル化レベルを測定し GV 期におけるヒストン交換はクロマチンのごく一部分でしか起こらないことを示唆した。一方、核膜消失後のブタ M2 卵の細胞質中に *in vitro* で精製した H4-タンパク質を顕微注入し、核膜消失後の M2 のクロマチンではヒストン交換はほとんど起こらず、核膜消失後のクロマチン全体の脱アセチル化は、ヒストン交換反応では起こりえないことを示唆した。

以上、本研究は哺乳類卵の減数分裂過程におけるヒストンアセチル化の制御機構の一端を明らかにした初めての報告であり、発生生物学分野における学術的な面のみならず、近年のバイオテクノロジーに対する応用面においても貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。