

# 論文審査の結果の要旨

氏名 井上 梓

本論文は、マウスの成長卵に特異的に存在する核小体様構造体 (Nucleolus-like body、以下 NLB と略す) 形成のメカニズムとその機能の解明を試みたものである。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、NLB 形成のメカニズムを明らかにするために、まず NLB の構成タンパク質の同定を試みた。成長卵から顕微操作を用いて NLB を単離し、SDS-PAGE で展開後、主なバンドを切り出し MALDI-TOFMS を用いて質量分析をおこなった結果、Nucleoplasmin 2 (NPM2) が同定された。NPM2 以外のバンドはほとんど検出されなかったことから、NPM2 は NLB の主要タンパク質であることが示唆された。さらに NPM2 が NLB の構成タンパク質であることを、イムノブロットングおよび GFP 融合タンパク質を用いて確認した。次に NPM2 が NLB に局在する機構を調べるために、NPM2 配列内部に NLB 移行に関与するモチーフが存在する可能性を検証した。NPM2 の各ドメインの欠失変異体を作製し、それらの NLB 局在能を調べたところ、核移行シグナル (NLS) の他にリジン残基に富む C 末端の 16 個のアミノ酸 (K-rich motif) が NLB 局在に必須であることがわかった。さらに NLB 形成への NPM2 の関与を調べるため、はじめに卵成長過程における NPM2 の発現量の変化とその細胞内局在をそれぞれ SDS-PAGE および GFP-Npm2 mRNA の顕微注入により調べた。その結果、NPM2 タンパク質は核小体に局在し卵成長過程で大きく増加することがわかった。また、弱変性条件下での SDS-PAGE では 150 kDa 以上の分子量に検出されることから、NPM2 は卵内で重合体として存在していることが示唆された。このことから、卵成長過程における NLB 形成の過程で、NPM2 が核小体に重合体として集積することが示唆された。続いて RNAi を用いて NPM2 をノックダウンしたときの NLB 形成を調べた。NLB が構築される前の成長過程の卵に NPM2 に対する siRNA を顕微注入した後、体外成長系を用いて成長を完了するまで 12 日間培養した。その結果、コントロールの siRNA を導入した卵では成長後に NLB が正常に形成された一方で、NPM2 発現抑制卵では NLB が有意に小さくなった。この結果から、NPM2 は NLB 構築に必須であることがわかった。

第2章では、NLB の機能解析を試みた。まず、顕微操作により作製した NLB 除去卵の表現型を解析した。体外成熟後、第二減数分裂中期 (MII 期) に到達した NLB 除去卵を受精させたところ、雌性前核は正常に形成された一方で、雄性前核のクロマチン脱凝集遅延が観察された。そのような胚では 1 細胞 M 期において雄性ゲノムが異常に凝集した染色体構造を生じ、その後 2 細胞期以降徐々に卵割を停止することがわかった。精子内部のクロマチンは非常に凝集しており、受精後の前核形成時にその凝集は解かれる (脱凝集する)。NLB 除去卵の表現型から、成熟過程で細胞質に拡散した NLB 構成因子が卵細胞質に入り込んだ精子のクロマチン脱凝集に関与することが考えられた。NLB の主要

な構成タンパク質である NPM2 が精子クロマチン脱凝集に関与するかどうか調べるために、NLB 除去卵に NPM2 の mRNA を顕微注入したところ、雄性前核のクロマチン脱凝集異常が回復した。そして *in vitro* で合成し精製した NPM2 タンパク質を精子とインキュベートすると、精子のクロマチンが脱凝集することがわかった。さらに、NPM2 ノックアウトマウス由来の受精卵を調べたところ、雄性前核のクロマチン脱凝集が遅延していることが確認された。以上の結果から、初期発生過程における NLB の役割として、成熟中に細胞質に拡散した NLB 構成因子の NPM2 が受精後の精子クロマチンの脱凝集を促進することで正常な雄性前核の形成に貢献することが明らかになった。最後に、NPM2 が成長卵において NLB に局在する意義を調べるために、K-rich motif を欠損した変異 NPM2 (NPM2  $\Delta$  K) が NLB に局在できずに核質に留まることを利用して、NPM2  $\Delta$  K mRNA を siNpm2 と同時に顕微注入することで、内因性の NPM2 を NPM2  $\Delta$  K で置き換えた。その結果、他の実験群および siNpm2 と同時に野生型 NPM2 mRNA を顕微注入したコントロール群では 78-98%の卵が正常に成長を完了した一方で、核質に NPM2  $\Delta$  K が発現した卵は 32%しか成長できなかった。このことから、卵成長時に NPM2 が核質に局在してはいけないことが示唆された。成長卵における NLB の機能として、精子クロマチンリモデリング活性を持つ NPM2 が母性クロマチンに作用してしまうことを防ぐために NPM2 を隔離しておくという役割を持っ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 NLB の形成メカニズムとその機能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。