

論文審査の結果の要旨

氏名 Nashun Buhe
那順 布和

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 H2A 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、そして受精後の着床前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つのステップから成る現象と考え、それを制御する分子メカニズムの解明を試みた。全体は3章からなり、以下のような内容となっている。

第1章では、受精前の卵成熟期および着床前初期発生期におけるヒストン H2A の核内局在の変化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。まず、特異抗体により H2A、H2A.Z、H2A.X の核内局在をマウスの卵巣より回収した成長卵について調べたところ、いずれも核内に局在が見られた。これらの H2A 変異体のいずれもが卵成熟期においても染色体上から失われることはなかった。しかし、受精後、H2A.Z は核内から急激に消失し、H2A の核内局在量も大きく減少した。その後の初期発生期において、これらの核内局在量は低下したままであったが、胚盤胞期に増加し始めた。一方、H2A.X の核内局在量は受精後に逆に増加し、桑実胚期から減少し始めた。また、Flag タグの付いた H2A、H2A.Z のトランスジェニックマウスを作成して、受精前後および初期発生期における各局在の変化を調べたところ、特異抗体での結果と同様のものが得られた。さらに、核内への H2A 変異体の取り込みについて調べるため、Flag-H2A 変異体の mRNA を成長卵の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-H2A 変異体が核内に移行していることが確認できた。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-H2A.Z および macroH2A は受精後に形成された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。また、H2A の核内局在量も減少していた。一方、H2A.X は逆に増加していた。初期発生期の核内取り込み量についても、特異抗体およびトランスジェニックマウスで得られた結果と同様の傾向を見ることができた。以上の結果から、遺伝子発現の cell memory として機能する H2A.Z とヘテロクロマチン形成を促進し遺伝子のサイレンシングに関わっている macroH2A 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。さらに、初期発生過程で分化が始まる胚盤胞期以前に H2A 変異体のうちの大部分を H2A.X が占めることが、この時期の全能性維持に関わっているという可能性が示された。

第2章では、体細胞核移植胚での全能性獲得機構への H2A 変異体の関与を調べた。

体細胞核を除去した未受精卵に移植することにより、分化した体細胞核がリプログラミングされ、全能性を獲得することが知られている。この核移植胚での H2A 変異体の動態を調べるため、まず Flag-H2A 変異体の遺伝子を導入した胚性幹細胞を作成し、その染色体を未受精卵に移植し、Flag-H2A 変異体の核内からの消失を調べた。その結果、H2A.Z は核内から急激に消失し、H2A の核内局在量も大きく減少した。一方、H2A.X の減少は見られなかった。次に、Flag-H2A 変異体の mRNA を除核した未受精卵の細胞質にマイクロインジェクションしてから、wild タイプの胚性幹細胞の染色体を移植したところ、H2A.Z の核内への取り込みはまったく見られなかった。また、H2A の取り込みもわずかであったが、H2A.X については豊富な取り込みが見られた。これらの結果は、受精卵で得られた結果と同様のものであり、H2A 変異体の核内局在の変化がリプログラミングに参与することを示唆している。

第3章では、各 H2A 変異体の核局在の違いを調節するメカニズムとその機能について調べた。まず、各変異体のアミノ酸配列を比較すると C 末端の配列が変異体ごとに大きく異なることから、この部分の配列にターゲットを絞って実験を行った。H2A.X から C 末端の 23 アミノ酸 (C23) を取り除いたところ、受精後における H2A.X の核内への取り込みが見られなくなった。次に、C23 を H2A、H2A.Z および macroH2A の C 末端に付加したところ、いずれもが受精後に核内に取り込まれるようになった。したがって、この領域が受精後における H2A.X 特異的な取り込みに関与していることが示された。また、C23 を付加した H2A.Z および macroH2A を発現した初期胚の発生を調べたところ、有意な発生の遅延が見られた。このことから、受精後に H2A.Z および macroH2A がクロマチンに存在しないことが、全能性を持った初期胚の発生に必要であ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。