

論文審査の結果の要旨

氏名 大我政敏

本論文は、マウスの初期胚発生期におけるヒストン H3K79 ジメチル化 (H3K79me2) の動態およびその触媒酵素である Dot1L のメチル化調節を解析することで、受精後における分化全能性の獲得およびその維持機構の解明を試みたものである。すなわち、体細胞において分化した状態を維持する”cell memory”と呼ばれる機構に着目し、そのマーカーの1つである H3K79me2 について、初期胚が全能性を獲得・維持する際にどのような動態を示し、その調節がどのようになされているかを明らかにすることが本研究の主題である。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、H3K79me2 と Dot1L の受精前後および初期発生期における動態を調べた結果を記した。各ステージの卵および初期胚について免疫染色法にて解析を行った結果、成長期卵および成長卵では H3K79me2 が高レベルであるのに対して、1細胞期胚、2細胞期胚では低レベルであることが明らかとなった。続く4細胞期胚では H3K79me2 がやや増加し、胚盤胞期胚では再び高レベルとなっていることが確認された。Dot1L は成長期卵、成長卵および1細胞期胚では、豊富に核に存在していたが、2細胞期胚では殆ど検出されなかった。4細胞期以降では再び Dot1L は核に局在が認められた。以上より、1および2細胞期胚では H3K79me2 がほとんど存在しないため、分化状態が維持されないのではないかと考察した。

第2章では、1、2細胞期胚における H3K79me2 の制御機構および2細胞期胚での H3K79me2 の機能解析をおこなった。まず、1細胞期胚において H3K79me2 が低いレベルにあることには、H3K79 のメチル化に必要とされる ubH2B が関わっているのではないかと考え、受精前後における ubH2B の動態を、免疫染色法により解析した。その結果、1細胞期胚では、ubH2B が低いレベルに抑えられていることが明らかとなった。このことによって、1細胞期胚では Dot1L が核内に存在しているにも関わらず Dot1L によるメチル化反応が起こらなくなり、その結果 H3K79me2 が低いレベルに維持されていると考察した。体細胞において、H3K79me2 は Dot1L の核局在制御によって調節されることが報告されている。そこで、2細胞期胚で H3K79me2 が低いレベルにあることに、Dot1L の核局制御機構が関与しているかどうかを検証するために、Flag-tag を付与した Dot1L の mRNA を1細胞期胚に顕微注入し、Flag-Dot1L を発現させた。そしてその核への局在を抗 Flag 抗体による免疫染色法で解析した結果、1細胞期胚では Flag-Dot1L の核への局在が確認されたが、2細胞期胚では認められなかった。以上の結果より、2細胞期で H3K79me2 が低いレベルにある原因は、この時期に Dot1L の核局在が起こら

ないためであると考えられた。次いで、Dot1L の 2 細胞期胚特異的な核局在の制御機構を調べるために、Dot1L 内部の核局在シグナル (NLS) および核排出ドメイン (NED) に着目した。これらのドメインを取り除いた Dot1L 変異体をコードする mRNA を作成し、これを初期胚に顕微注入することで、これらのドメインが Dot1L の核局在にどのような様相に貢献しているのかを調べた。その結果、これまでに報告されている NED1 以外に核排出に関与するドメインを新たに発見し (NED2)、これら 2 つのドメインが協調して、2 細胞期特異的な核排出 (細胞質局在) を調節していることを明らかにした。以上の結果より、2 細胞期胚において Dot1L が核外排出されることで、H3K79me2 が低いレベルに維持されていることが考えられた。もしこの仮説が正しければ、Dot1L を人為的に核内へ局在させることで、2 細胞期胚においても H3K79me2 が起こるはずである。この仮説を検証するために、核内局在する Dot1L 変異体を 2 細胞期胚に発現させたところ、H3K79me2 の増加が見られた。そしてその際、2 細胞期胚以降の卵割が起こらず、発生が停止した。以上の結果より、2 細胞期胚では Dot1L の核外排出機構により、H3K79me2 が低レベルで維持され、それが、2 細胞期胚以降の発生に重要であることが示された。

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初期発生期における分化洗脳性の獲得及び維持機構の解明に大きく寄与するものであると考えられる。

なお、本論文第 2 章は、影山俊一郎、井上梓、秋山智彦、永田昌男、青木不学との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (生命科学) の学位を授与できると認める。

以上 1993 字