

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	鈴木 伸之介
論文題目	Studies on the developmental potential and epigenetic modifications of mouse oocytes and preimplantation embryos (マウス卵母細胞および初期胚におけるエピジェネティック修飾と発生能に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>受精前後の遺伝子発現の制御ネットワークは複雑であり、その解明は発生生物学のみならず、再生医療や不妊治療への応用においても非常に重要な課題である。近年、グローバルな遺伝子発現の制御機構として知られるエピジェネティック修飾に注目が集まっており、ほ乳類においても受精前の卵母細胞と受精後の胚ではエピジェネティック修飾は劇的に変化している。さらに、遺伝子発現を活性化するエピジェネティック修飾の 1 つである、ヒストン H3 の 4 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K4me3) を誘導する酵素 MLL2 が、正常な卵母細胞の成熟や初期胚の発生において必要不可欠であることが報告されている。また、受精後に発現を開始する多くの遺伝子の転写開始点近傍が H3K4me3 の修飾を受けていることも報告されている。しかし、受精前後におけるエピジェネティック修飾の分子機構はほとんど分かっていない。そこで、本研究では、H3K4 をメチル化する酵素である SMDY3 や H3K4me3 と結合するクロマチンリモデリング因子である ING3 あるいは CHD1 に着目して、受精前の減数分裂期および受精後の初期発生過程における役割について検討した。</p> <p>まず、クロマチンリモデリング因子 ING3 のマウス卵母細胞での役割を明らかにした。卵核胞期の卵母細胞に <i>Ing3</i> をターゲットとする siRNA を顕微注入し <i>Ing3</i> 抑制卵母細胞を得た。これらの卵母細胞を第二減数分裂期の卵母細胞まで成熟させた結果、<i>Ing3</i> 抑制区では染色体の移動が正常に起こらず、体細胞分裂のように対称分裂をする卵母細胞の割合が有意に増加した。そこで、染色体移動に重要とされる細胞質の極性について検討したところ、<i>Ing3</i> 抑制卵母細胞では細胞質の極性が生じていないことが明らかとなった。</p> <p>ついで、H3K4のメチル化酵素であるSMYD3およびH3K4me3と結合するクロマチンリモデリング因子であるCHD1のマウス初期胚での役割を明らかにすることを試みた。受精直後に、RNA干渉法を用いて<i>Smyd3</i>あるいは<i>Chd1</i>の発現を抑制すると、受精後から5.5日後までは胚に形態的な異常は認められないが、胚体を構成する主要部分の細胞増殖が抑制され、その分化多能性も消失した。そこで、多能性マーカー遺伝子である<i>Oct4</i>と<i>Oct4</i>と拮抗して発現している<i>Cdx2</i>の発現量について検討した。その結果、<i>Smyd3</i>抑制胚および<i>Chd1</i>抑制胚は、<i>Oct4</i>と<i>Cdx2</i>の発現が上昇する時期からそれぞれの発現が制御されていることが明らかとなった。これらの結果から、CHD1と SMYD3は、初期胚の最初の細胞分化に必須な<i>Oct4</i>と<i>Cdx2</i>の発現の開始と発現維持に関与することによって、胚の正常性を維持していることが示唆された。ついで、CHD1の<i>Oct4</i>や<i>Cdx2</i>の転写制御機構について解析した。近年マウス初期胚において、転写因子のHMGPIとKLF5が、時期特異的に、また細胞種特異的に <i>Oct4</i>と<i>Cdx2</i>の発現を制御していることが知られるようになった。そこで、<i>Chd1</i>抑制胚における<i>Hmgpi</i>と<i>Klf5</i>の発現量を解析した。その結果、<i>Chd1</i>抑制胚では<i>Hmgpi</i>の発現が有意に抑制されていた。一方、<i>Klf5</i>の発現はその発現が上昇する時期から8細胞期まで抑制されていたが、桑実期胚以降は抑制が認められなかった。以上のことから、CHD1は初期胚において<i>Hmgpi</i>と<i>Klf5</i>の発現の開始と<i>Hmgpi</i>の発現維持に関与していることが示唆された。そこで、<i>Hmgpi</i> mRNAを<i>Chd1</i>抑制胚に顕微注入し、<i>Oct4</i>と<i>Cdx2</i>の</p>			

発現量の変化を確認するとともに、体外での胚細胞の伸長実験と胚移植によって胚の正常性について検討した。その結果、*Hmgpi* mRNAの注入によって、*Oct4*および*Cdx2*の発現量、胚発生のいずれにおいても対照区である正常胚と同程度まで回復した。以上の結果から、**CHD1**は8細胞期において*Hmgpi*と*Klf5*の発現を調節することによって、*Oct4*と*Cdx2*の発現を制御すること、また、桑実期以降では、**HMGPI**が胎仔の主要部分を構成する内部細胞塊（**ICM**）の細胞において*Oct4*の発現を制御し、栄養外胚葉（**TE**）となる外側の細胞では、**HMGPI**が*Cdx2*の発現を制御していることが示唆された。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。
論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 words で作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

受精前後の遺伝子発現制御は、受精卵が正常に発生する基盤を作る上で非常に重要であり、それにとまなうイベントとして、受精直前の減数分裂、受精直後の胚ゲノムの遺伝子転写の活性化、着床に先立つ胚体と胚体外(栄養外胚葉)細胞への細胞分化をあげることができる。これらのイベントの制御ネットワークは未だ不明な点が多いが、遺伝子発現制御領域のエピジェネティック修飾が主要な要因となっていると想定される。本研究では、クロマチンリモデリングで重要な役割を果たしているヒストンH3の4番目のリジン残基のトリメチル化(H3K4me3)に着目して、受精前後の遺伝子発現の制御機構に及ぼす影響について検討した。評価される点は、以下の3点にまとめることができる。

1. 卵母細胞の減数分裂期において、H3K4me3と結合するING3の役割をRNA干渉法により検討した。*Ing3*抑制卵母細胞では、減数分裂時の細胞分裂が正常に起こらなかった。ING3は、H4K12のアセチル化レベルに影響を及ぼし、mTORを介して受精直前の減数分裂を制御していることを明らかにした。

2. 受精後の胚発生初期に、H3K4me3と結合するリモデリング因子であるCDH1をRNA干渉法により抑制すると、胚体あるいは胚体外の細胞の分化に、それぞれ重要な役割を果たしている*Oct4*と*Cdx2*の発現が低下し、結果的に胎仔の形態形成に異常が起こっていた。同様なことは、H3K4のメチル化に関与する*Smyd3*の抑制によっても認められたことから、H3K4me3が関与する遺伝子発現制御機構が初期胚の細胞分化において重要な作用を果たしていることが示唆された。

3. 胚体と栄養外胚葉形成に関わる*Oct4*と*Cdx2*の制御機構についてさらに検討した。その結果、*Oct4*と*Cdx2*の発現制御には、転写因子HMGPIが深く関わっており、CDH1は*Hmgpi*の発現に時期特異的・組織特異的に影響を及ぼし、結果的に、初期胚の細胞分化に関与する*Oct4*と*Cdx2*の発現時期と活性化に大きな影響を及ぼしていることを明らかにした。

以上のように、本論文は、マウス初期胚の胚ゲノムにおけるヒストンH3K4のトリメチル化とクロマチンのリモデリングによるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構が、正常な胚発生を進める上で不可欠な減数分裂や細胞分化に決定的な役割を果たしていることを示したものであり、家畜増殖学、家畜育種学、生殖医学および発生生物学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成27年2月6日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降(学位授与日から3ヶ月以内)