

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	山本 琢人
論文題目	母性因子と胚性因子によるマウス胚性ゲノムの活性化機構の解明		
(論文内容の要旨)			
<p>ほ乳動物の卵母細胞は成長中に母親のゲノムに由来する転写・翻訳産物（母性因子）を蓄積し、転写を停止した状態で受精が起こる。受精後には母性因子の分解が徐々に起き、父母のゲノムの組み合わせで新たに形成された胚自身のゲノムからの転写・翻訳産物が新規に作られ、胚性因子として機能する。ほ乳動物では着床前発生の特定の時期に胚性因子を作り出す胚性ゲノムの活性化（zygotic genome activation、ZGA）が起こり、ZGAは初期胚発生に必要不可欠である。しかし、母性因子、胚性因子の中には初期胚発生への寄与が未知のものが多く含まれる。本研究では母性因子と胚性因子に着目し、ZGAを含むマウス初期胚発生の新たな機構解明を目的とした。</p> <p>第1章では、本研究の学術的背景および目的を提示している。まず、ほ乳動物の卵母細胞における卵核胞（germinal vesicle、GV）という卵母細胞特有の核の形成、GV期卵母細胞での母性因子の蓄積、受精を含む初期胚発生における母性因子の必須性について概説した後、従来の母性因子の機能解析法の欠点を述べ、加えてヒストンバリエーションの受精への関与について言及している。次に、マウスにおけるZGAの進行とその時期、ZGAを直接制御している遺伝子の候補として<i>Myc</i>が注目されていることを述べている。また、ZGAによって発現するが初期胚発生への寄与が不明である遺伝子として<i>Pwp1</i>について解説し、本研究ではヒストンバリエーション、<i>Myc</i>、<i>Pwp1</i>の機能解析による、ほ乳動物の初期胚発生の新たなメカニズムの解明が目的であることを述べている。</p> <p>第2章では、母性因子の機能解析を、従来の遺伝子組換えマウスの作製やsiRNAの顕微注入によるノックダウン法と比較して、より簡易に行うことを意図し、マウスGV期卵母細胞へ、周囲を覆う卵丘細胞を除去することなくエレクトロポレーションによってsiRNAを導入し、遺伝子をノックダウンする新たな手法を開発した。卵丘細胞の付着状態による胚発生への影響や、電気刺激条件の検討をへて開発した本手法により、母性因子であるヒストンH3のバリエーションH3.3の雄性前核への取り込みが、受精後の2細胞期への移行に不可欠であることを明らかにした。</p> <p>第3章では、従来パスウェイ解析の結果等からZGAを制御している遺伝子の候補として示唆されてきたMYC転写因子について、マウス初期胚における機能阻害を、アンチセンスオリゴと低分子阻害剤のそれぞれで行い発生への影響を検証した。その結果、MYCの特異的阻害による胚発生の停止時期は2細胞期であり、既報の1細胞期とは異なることを明らかにした。また、ZGAにはマイナーおよびメジャーの2段階があるが、胚発生が影響を受ける低分子阻害剤の処理時期は、マイナーZGAではなくメジャーZGAの時期であった。さらに、低分子阻害剤処理胚に対する網羅的な遺伝子発現解析の結果、MYC阻害の影響は、マイナーZGA関連遺伝子よりもメジャーZGA関連遺伝子に対してより顕著だった。これらの結果から、MYCはマイナーZGAよりもむしろメジャーZGAにおける転写や翻訳を制御していることを明らかにした。</p> <p>第4章では、第3章でMYCが発現制御する遺伝子に含まれることが明らかになったが、初期胚発生への寄与が不明な胚性因子として<i>Pwp1</i>に着目し、その発現パターンを</p>			

調べるとともに、機能阻害実験における発生観察、細胞分化関連転写共役因子YAPの局在解析および網羅的遺伝子発現解析により、マウス初期胚発生における*Pwp1*の役割を検証した。その結果、2細胞期から核に局在し、胚盤胞期胚では内部細胞塊に選択的に局在するというPWP1タンパク質の特徴的な発現パターンが明らかとなり、機能阻害により、桑実胚以降の発生が抑制されること、本来存在するYAPの核局在の胚細胞間での差が消失すること、および本来ZGA期を含む初期分割期に発現する遺伝子の異所性発現が桑実胚期に起こることを示した。これらの結果から、*Pwp1*はMYCが制御するメジャーZGAによって発現することでその後のZGA遺伝子の発現を抑制し、細胞分化が適切に行われるよう制御していることが示唆された。

第5章は、第4章までに述べた一連の研究によって、母性因子として卵母細胞内に蓄積されたヒストンH3.3転写産物が翻訳され受精後に雄性前核へ取り込まれることが2細胞期への発生に必須であり、転写因子MYCによるメジャーZGAの活性化が4細胞期への発生に必須であり、さらにメジャーZGAにより発現する胚性因子*Pwp1*が初期胚の分化を制御しているという、母性因子と胚性因子による新たな初期胚発生に関する知見が得られたことを総括し、本成果は、初期胚発生の制御や機構解明を通じて、家畜の生産効率の向上や生殖医療に貢献することが期待されると結んでいる。

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)

ほ乳動物の初期胚発生機構の解明は、家畜等の資源動物やヒトにおける生殖補助技術の発展や安全性の確保に結び付くため重要な研究課題である。初期胚発生は、卵母細胞の形成中に蓄積される母性因子と胚性ゲノムの活性化 (ZGA) 以降に転写・翻訳される胚性因子によって駆動されるが、母性因子および胚性因子の中には初期胚発生への寄与が未知のものが多く含まれる。本研究では母性因子としてのヒストンH3のバリエーションH3.3、ZGA関連転写因子としてのMYC、胚性因子としての*Pwp1*についての機能解析を行い、マウス初期胚における新たな発生制御機構を明らかにした。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. ほ乳動物における母性因子の解析方法として従来用いられてきた遺伝子組換えマウスの作製やsiRNAのGV期卵母細胞への顕微注入に比べ、格段に労力の少ないGV期卵母細胞へのエレクトロポレーションを用いたsiRNA導入による遺伝子ノックダウン法を、卵丘細胞の付着状態による胚発生への影響や電気刺激条件を精査して開発し、同手法を用いて、母性因子ヒストンH3.3の初期胚発生における必須性を明らかにした。

2. マウス初期胚におけるMYC転写因子の機能阻害を、低分子阻害剤の処理濃度や処理時間の詳細な検討に、アンチセンスオリゴによる遺伝子特異的阻害を組み合わせ、さらに遺伝子発現の網羅的解析の結果を統合することにより、MYCが制御しているZGAの正確な時期および初期胚発生への同転写因子の寄与についての臨界期を特定した。

3. 胚性因子*Pwp1*が、MYCが制御するZGAによって発現すること、細胞分化関連転写共役因子YAPの局在制御に関与すること、初期胚発生における遺伝子発現の適時制御に寄与することを明らかにした。

以上のように、本論文は、母性因子および胚性因子によるマウス初期胚発生を制御する新たな分子機構を明らかにしたものであり、生殖生物学、発生工学、応用動物科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、令和6年1月24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。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

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)