

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	出口 勝彰
論文題目	マウス生殖細胞におけるH3K9メチル化機構および機能の解析		
（論文内容の要旨） 多細胞生物における生殖細胞は、体細胞と異なり個体自体の維持に必須ではないが、次世代に自らの遺伝情報を伝達する働きを持っており種の維持に必須の細胞である。生殖細胞の研究は、基礎生物学のみならず医学や畜産学といったより応用的な分野の研究にも重要なテーマである。 本研究では、マウスの生殖細胞においてヒストンメチル化状態を網羅的に調べ、生殖細胞に特徴的なヒストンメチル化状態を見出した。特に、転写を抑制するヒストンメチル化マークの一つであるヒストンH3の9番目のリジンにメチル基が2個付加される状態（H3K9me2）が胚性期の雄性生殖細胞で著しく低下していた。低H3K9me2状態の原因を調べるために胚性期雄性生殖細胞におけるヒストンメチル化酵素のG9aおよびGLPの発現状態を調べた。その結果、G9aは検出できたにもかかわらずGLPは確認できなかった。さらなる詳細な解析から、興味深いことに、この時期の胚性期雄性生殖細胞ではGLP mRNAは周りの体細胞と同等に転写されていることがわかった。つまり、この時期の雄生殖細胞においては、GLPの発現は転写後に制御される可能性が示唆された。そこで、GLP mRNAの転写後制御機構を解明するためにmiRNA経路、生殖細胞特異的small RNA経路、ユビキチンプロテアソーム経路、生殖細胞特異的RNA結合因子Nanos2経路の関与について検討した。各制御機構に関連した遺伝子を欠損させたマウスを使用した結果、Nanos2欠損マウスの胚性期雄性生殖細胞においてはGLPのタンパク質の存在が回復していることがわかった。次にGLPの遺伝子発現を外来性のプロモーター制御下で行わせることで、このGLPの転写後抑制を回避できないか、もしそれが可能であれば、その結果胚性期雄性生殖細胞でのH3K9me2の上昇を誘導できないか、トランスジェニックマウスを作成して検討した。その結果、外来性Flag-GLPを発現させるトランスジェニックマウスでは、GLPの発現が胚性期雄性生殖細胞で上昇していること、さらにH3K9me2も上昇させることに成功した。しかしながら、この雄マウスにおいては、生殖細胞は正常に発生し、妊性も有することがわかった。 本研究により、胚性期雄性生殖細胞では、ヒストンメチル化酵素を転写後に制御することでヒストンメチル化状態を調節する機構が存在することが明らかとなった。			

(論文審査の結果の要旨)

ほ乳類の生殖細胞は、その初期発生の過程と出生後の分化の過程でクロマチンの構造が大きく変化することが分かっている。しかし、性決定後から出生前の生殖細胞におけるクロマチン構造の変化に関しては不明な点が多い。申請者はこの点に着目し、免疫組織学的方法によって、ヒストンH3の9番目のリジンにメチル基が2個付加される状態(H3K9me2)が胚性期の雄性生殖細胞では低く、雌性生殖細胞では高く保たれていることを見いだした。H3K9me2の責任酵素はG9a/GLP複合体であることが申請者の所属する研究室のこれまでの研究によって明らかにされている。

今回、申請者は、胚性期雄性生殖細胞でH3K9me2の低メチル化がどのようにして誘導されているのか、その責任酵素であるG9a/GLP複合体のmRNA、タンパク質の発現に着目して解析を行った。

まずG9a、GLPタンパク質の発現を調べた結果、胚性期雄性生殖細胞でGLPの発現が認められないことを発見した。したがってこの細胞ではG9a/GLP複合体による機能的なH3K9メチル化酵素作り出せない状況であることが分かった。このことが本細胞におけるH3K9me2の低下の原因であると考えられた。さらに申請者は本細胞におけるGLPのmRNAの発現を調べた結果、体細胞と同等かそれ以上の高いレベルで発現していることを見いだした。よってGLPタンパク質が著しく低いことの原因は、転写後の制御によると結論づけた。様々な転写後制御メカニズムの関与を遺伝学的に検討した結果、生殖細胞特異的RNA結合因子Nanos2経路がGLPの翻訳制御に関与していることが示唆された。

申請者はさらに、GLPの遺伝子発現を回復させることで、胚性期雄性生殖細胞でのH3K9me2の上昇を誘導する試みも行った。その結果、Flag-GLPを外来的に発現させるトランスジェニックマウスでは、GLPの発現が胚性期雄性生殖細胞で上昇していること、さらにH3K9me2も上昇させることに成功した。H3K9me2の上昇による生殖細胞の分化異常は観察できなかったため、胚性期雄性生殖細胞でH3K9me2が低いことの生物学的意義の解明は今後に残された課題である。

今回の研究により明らかになったことは、哺乳類の胎生期生殖細胞におけるヒストン修飾の雌雄差がどのように作られるのか、及びその意義を理解する上で意味のある成果であり、この分野の研究の進展に貢献した、と評価できる。よって、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。さらに、平成25年1月29日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行なった結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、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