

氏名(本籍)	こばやかわ さとる 小早川 智 (大阪府)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第4306号		
学位授与年月日	平成19年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Dynamic Changes in Nuclear Organizations during ES Cell Differentiation and Early Mouse Embryonic Development (ES細胞の分化過程, 及び, マウスの発生過程における核内構造の動態解析に関する研究)		
主査	筑波大学教授 (連携大学院)	理学博士	阿部 訓也
副査	筑波大学教授	理学博士	漆原 秀子
副査	筑波大学教授	理学博士	鎌田 博
副査	筑波大学教授	理学博士	沼田 治

論文の内容の要旨

生物の発生過程では活発な遺伝子発現の変動が生じ、その結果として多様な機能を持つ分化した細胞、組織、形態がつくられていく。それぞれの細胞は一部の例外をのぞき、同一のゲノムを共有するが、実際に発現する遺伝子セットは細胞により大きく異なる。これは発生分化の過程で様々な修飾がゲノム上に施される、いわゆる「エピジェネティック」な制御の帰結ということができる。したがって、発生現象は遺伝子発現プログラムとエピジェネティック制御の動的な関連を調べるための非常によい研究対象といえよう。しかし、発生している胚では、細胞ごと、領域ごとに質的な変化が生じており、時間的、空間的なエピジェネティック変動を調べるのは技術的に非常に困難であった。

本研究では代表的なゲノム修飾であるDNAメチル化に着目し、細胞分化過程にある個々の細胞でメチル化がどのように変動しているかを解析するための実験手法を確立することを試みた。手法としては、メチル化DNAと特異的な結合を示すメチル化結合蛋白質、MBD1のメチル化DNA結合ドメインと核移行シグナルをコードする領域を緑色蛍光蛋白質(GFP)遺伝子と融合させ、これをCAGGSプロモーターによってES細胞で恒常的に発現させることとした。このES細胞株は正常に増殖し、分化誘導により胚様体をつくり様々な細胞へ分化することから、少なくとも実験に使用した株ではコンストラクト導入による増殖・分化に対する悪影響は認められなかった。

このES細胞を観察するとGFP-MBD融合蛋白はセントロメア近傍のヘテロクロマチンに局在しており、各種DNAメチル化酵素の局在や抗メチル化DNA抗体染色パターンとこの融合蛋白の局在は概ね一致していた。また、維持型DNAメチル化酵素遺伝子を欠損し、DNAメチル化レベルが低下した変異ES細胞では、融合蛋白質のヘテロクロマチン上の局在が消失することなどから、この融合蛋白の局在を指標にしてDNAメチル化レベルの変動を検出できることが確認された。このGFP-MBD融合蛋白局在によってメチル化されたセントロメリックヘテロクロマチンの形成パターンの変動をES細胞分化過程で調べたところ、未分化ES細胞では核小体周辺にセントロメリックヘテロクロマチンが集合した巨大なクラスターが形成されてい

たが、分化誘導に伴い、未分化細胞で見られた巨大クラスターは分散し、多数の小クラスターとなりメチル化レベルはむしろ減少した。さらに分化が進むとクラスターは、核膜と近接して存在するようになり、クロマチン全体の DNA メチル化レベルは再び増大することがわかった。このように細胞分化過程ではグローバルな DNA メチル化の変動と並行してヘテロクロマチンの形成や核内での染色体の配置も大きく変化することが明らかとなり、またタイムラプス撮影により、未分化状態から分化に向かう瞬間の ES 細胞の観察に成功し、上記の過程が連続して起こることが確認された。これらの観察から、分化ステージ特異的な核内構築は M 期完了後すぐに形成され、その後の間期を通じて安定に維持される。したがって、この構造の変換は細胞核分裂を契機として起きるものと考えられた。このように核内構造（ゲノム修飾、ヘテロクロマチン形成、染色体配置など）の変動と分化ステータスとの間にきれいな相関があることから、細胞タイプに特徴的な核内配置が分化段階特異的遺伝子発現の基盤となっていることが示唆された。実際に未分化細胞特異的遺伝子である Oct3/4 遺伝子座が細胞分化の過程で、活発な転写の場である「クロマチン間領域」からヘテロクロマチンや核小体などの抑制的な「場」に再配置することを DNA-FISH, RNA-FISH 法などを用いて明らかにした。さらに、GFP-MBD コンストラクトを発現するトランスジェニックマウス系統を確立して解析したところ、個体発生の過程でも ES 細胞分化系で見られたと同様に、DNA メチル化、ヘテロクロマチン形成パターンが時間的・空間的に大きく変化していることが明らかとなり、細胞核内構造を指標にすることで今まで分類が困難であった各発生段階の細胞タイプの差異を明確にすることが可能となった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

古くから核の形態、染色体の配置などの核内構造と遺伝子発現、細胞分化の関連が指摘されており、核内での遺伝子座、染色体の配置自身が遺伝子発現の制御に関わっているという考えは近年注目を集め始めている。細胞核構造と遺伝子発現の関係は、細胞の全能性や再プログラム化を考える上でも重要な問題であり、生物学の様々な分野と関連しているが、この問題を体系的に、それも生細胞において追究する実験系が存在しなかったために、未だ未解決の問題が多く残されている。本研究はそのための実験系、解析手法を新たに提示する独創的な研究であり、新しい研究分野を開拓していくための重要な出発点となるものと評価できる。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。