

氏名(本籍)	やま ざき たい が (東京都) 山 崎 大 賀 (東京都)		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 甲 第 4701 号		
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 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	Epigenetic Studies of Mouse Preimplantation Embryos by Live-cell Imaging (ライブセルイメージング技術によるマウス初期胚発生のエピジェネティクスに関する研究)		
主 査	筑波大学教授	農学博士	馬 場 忠
副 査	筑波大学教授	農学博士	小 林 達 彦
副 査	筑波大学教授	博士(薬学)	柳 澤 純
副 査	筑波大学准教授	博士(農学)	柏 原 真 一

論 文 の 内 容 の 要 旨

初期胚発生における細胞核の再プログラム化過程でのDNAのメチル化やヒストン修飾は、エピジェネティックな分子基盤の理解のために重要である。しかし、初期胚を用いた解析は出発材料に乏しく生化学的解析が困難なため、細胞固定後の抗体を用いた免疫染色が多用されてきた。この手法は数多くの抗体を利用することによってさまざまな修飾情報を検出できるが、生きた細胞を使えないために、例えば細胞系譜の追跡などが困難であるなどの実験上の制限がある。そこで、この研究ではマウス初期胚にライブセルイメージング技術を応用し、細胞内タンパク質の局在に時間軸を加えたエピジェネティック情報から新たな知見を得ることを目的とした。

まず、ヘテロクロマチン形成に影響するHP1 β の流動性と胚の分化段階との相関性をFRAP解析によって検討した。その結果、発生に従ってHP1 β が核内でクラスター様の構造を作ることや、1細胞と比較して4細胞ではタンパク質流動性の低下が生じることが見いだされた。したがって、発生にしたがって核内構造が変化する際にクロマチン自体の安定性が増加していることが示唆された。

次に、生細胞でのメチル化DNAの可視化を試みた。クラゲ由来の蛍光タンパク質EGFP、ヒトMBD1のメチルCpG結合ドメイン、および核移行シグナルNLSの融合タンパク質を作製し、このプローブがメチル化DNAを認識することを生化学的に確認した。加えて、遡及解析によって1細胞でのメチル化パターンと胚発生率との相関性を円形精子細胞由来の顕微授精胚を用いて検討した。その結果、1細胞の雄性前核内でドット状のメチル化DNAのシグナルが観察され、核内に局在するシグナル数と胚盤胞形成率に相関性が見いだされた。このことから、メチル化DNAを含む適切なクロマチンの核内配置が胚発生に影響している可能性が示唆された。

最後に、さまざまな発生・分化ステージの生殖細胞でのセントロメア領域のDNAメチル化状態を調べた。検討したすべての体細胞でセントロメア領域が高メチル化状態であるのに対し、雌雄生殖細胞では低メチル化状態であることが明らかとなった。さらに、体細胞クローン胚の1細胞、桑実胚、および胚盤胞について検討したところ、正常受精卵と比べてDNAメチル化が亢進していることが明らかとなった。これらの結果は、

初期胚発生過程でのクロマチンの適切な核内配置や核タンパク質の流動性などがクロマチン自体の構造や性質を規定しており、時空間的な遺伝子発現に必要な核内基盤として機能していることを示唆した。さらに、DNAメチル化やヒストンのアセチル化などの「修飾情報」とは異なる別のエピジェネティック調節の存在も暗示された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

哺乳動物胚発生のエピジェネティック制御機構に関する研究報告が蓄積されてきたが、それらの多くは免疫染色によって得られた知見である。特に、哺乳動物の卵子は材料に乏しいことから生化学的解析が困難な面が問題としてあげられる。この研究では、生きた細胞を解析する研究手法を確立し、新しい見地から知見を得ることを目的としている。生きた卵子や初期胚での核内分子の流動性速度の測定やDNAメチル化の可視化を行うことによって、(ア)核構造変化に付随してクロマチンの安定化が胚発生とともに起こっていること、(イ)メチル化DNAの核内配置が破綻すると胚発生が影響を受けること、および(ウ)生殖細胞のセントロメア領域のDNAは低メチル化状態であることなどを明らかにした。

この研究によって、従来の研究手法では調べることが不可能であった初期胚でのタンパク質流動性測定や遡及解析をある程度明確にしたことは評価できるが、得られた現象がどのように調節されているのかという分子機構を解明するまでには至っていない。このため今後に残された課題も少なからずあるが、研究自体は非常に注意深く行われており、十分な信頼性を有していると判断できる。したがって、当該研究分野の発展に貢献したと考えられる。

よって、著者は博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。