

[課程一2]

審査の結果の要旨

氏名 渡邊大士

本研究は高等動物の核拡大機構を明らかにするため、ヒストン H2B-mRFP1 を発現させて染色体を可視化させたマウス受精卵をはじめ様々なマウス胚にて、前核拡大過程のタイムラプスイメージングを行った。また、核内 DNA 密度が正常の半分である胚を用いて、核内クロマチン構造、核形態の解析ならびに発生試験を行い、下記の結果を得ている。

1. 前核を1つ、2つ、あるいは3つ持つ受精卵を作成し前核拡大過程を解析した。前核の拡大開始から 510 分後の拡大をほとんど終えた時点での前核総表面積と前核総体積を比較した結果、これらすべての受精卵では、前核総表面積には明らかな差が見られた一方で、前核総体積は約 $8,000\sim 9,000 \mu\text{m}^3$ となりほぼ同じ値を示した。これらの結果から、受精卵中の前核の拡大は、総体積が上限値に達すると停止することが示唆された。
2. 顕微受精してから 10-10.5 時間後の前核拡大をほとんど終えた時点で雄性前核を除去した胚では、2 細胞期にて核体積が通常の約半分程度にまで低下した。また、前核拡大をほとんど終えた時点で細胞質を除去した胚では、2 細胞期の核体積/細胞質体積比率が上昇した。これらの結果から、卵子細胞質に存在する「核体積を増加させる因子」が拡大に伴い前核内に集積することが示唆された。
3. 受精卵中においても 1 倍体胚においても雄性前核は雌性前核よりも初期前核拡大速度が速いことから、前核形成時のクロマチンの状態が初期前核拡大速度に影響することが示唆された。人為的に前核形成時の雌染色体塊を大きくした雌核発生胚では初期前核拡大速度が速くなったこと、また、精子クロマチンを分裂期染色体へ凝縮させてから発生を開始させた胚では、同じ染色体塊の大きさをもつ非熱処理精子頭部由来の前核と比較して初期前核拡大速度が低下しことから、染色体塊の大きさおよび、凝縮した染色体を形成しているか否かが独立に初期前核拡大速度を制御し得ることを示した。
4. 前核拡大過程の解析から、1 倍体胚でも 2 倍体胚でも前核総体積がほぼ同じとなる、すなわち、1 倍体胚では核内 DNA 密度が正常の半分となることが示された。核内 DNA 密度が正常の半分である 1 倍体胚では 1 細胞期にて、核小体周辺のヘテ

ロクロマチンの形成と DNA 複製の完了が遅延することが、ヘキスト染色と BrdU の取り込み試験により観察された。また、2 細胞期にて、核の歪みが大きいことがタイムラプスイメージングにより観察された。さらに、2 倍体であっても核内 DNA 密度が正常の半分である胚（2 倍体・細胞体積 2 倍の胚）も 1 倍体胚と同様に胚盤胞期胚への発生率が著しく低かったことから、核内 DNA 密度が核内クロマチン構造や発生能に影響する可能性が示唆された。

以上、本論文はマウス胚における前核拡大過程の解析を通し、受精卵中の 2 つの前核は細胞質中に存在する「核体積を増加させる因子」が核内に集積し終えた時点で前核の拡大が止まるという **Limiting pool** モデルで説明可能であること、ならびに、前核形成時のクロマチンの状態が前核の初期拡大速度に影響し、雌雄前核の体積に差を生み出すことを示唆した。また、マウス初期発生過程において、適切な核内 DNA 密度の重要性が示唆された。本研究はこれまで未知に等しかった、哺乳類受精卵の前核拡大機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。