

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 田部井 靖享

Selenoprotein H (SelH) は微量元素セレンウムをアミノ酸セレノシステインとして含むセレノプロテインの一つであり、核移行シグナルを有し、核内に局在する。SelH は Baf250 などのクロマチンリモデリング因子と共通するDNA結合モチーフであるAT hook motifを有しており、ヒストンシャペロンである Nucleolin や、ヒストンメチル化酵素と複合体を形成する RbBP5 と結合することが報告されている。本論文は、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) を用い SelH のゲノム調節機能の解明を目的としたもので、以下の三章より構成されている。

第一章ではまず、shRNA 発現ベクターを用いて SelH ノックダウン (KD) ES 細胞の樹立が試みられた。ゼブラフィッシュでは SelH が初期胚発生に必須であることから SelH KD ES 細胞株の作製には困難が予想されたが、2 株の樹立に成功し、SelH KD によりヘテロクロマチン化ゲノム領域の数が減少することが判明した。本章ではまた、SelH 強制発現 ES 細胞の作製も試みられた。但し、セレノシステインをコードする UGA コドンは通常停止コドンとして機能するコドンであるため、同コドンにおける異常な翻訳停止の可能性があった。そこで、セレノシステインをシステインに置換した変異型 SelH の強制発現が試みられた。この変異型 SelH 強制発現細胞では、ヘテロクロマチンシグナル数の増加が認められ、KD 株の結果と合わせ、SelH がクロマチン構造変化に関わることが示唆された。

第二章では SelH が ES 細胞の多分化能に与える影響が解析されている。SelH KD ES 細胞では、多分化能関連遺伝子である *Nanog*, *Dppa3*, *Nodal* mRNA 発現の低下が認められた。これらの遺伝子発現の低下が野生型 SelH の強制発現によって回復したことから、SelH が多分化能の維持に関与していることが示唆された。興味深いことに、変異型 SelH の強制発現でも多分化能遺伝子の発現が回復し、この作用にセレノシステインは必須でないことが示された。SelH KD ES 細胞では *Nanog*, *Dppa3*, *Nodal* 遺伝子領域で、ヒストン H3 の 4 番目のリシントリメチル化 (H3K4me3) 修飾の低下と H3 の 9 番目と 27 番目のリシンのトリメチル化 (H3K9me3 および H3K27me3) 修飾の増加が認められた。また、SelH KD ES 細胞では、胚葉体 (EB) の形成に異常が認められ、さらに内胚葉マーカー遺伝子 (*Gata4*, *Gata6*)、中胚葉マーカー遺伝子 (*T*, *Kdr*) の発現低下と外胚葉マーカー遺伝子 (*Nes*, *Ascl1*) 発現増加を伴っていた。したがって、SelH は多分化能関連遺伝子のヒストン修飾状態を維持し、多分化能関連遺伝子発現調節および外胚葉分化の抑制と中・内胚葉分化の促進という初期胚葉分化の方向性の決定に関与することが示された。

第三章では SelH の ES 細胞の神経分化への影響が調べられた。マウスの初期発生段階では神経前駆細胞が原腸陥入期の外胚葉に現れることから、SelH が神経分化に関わっている可能性が浮上してきたためである。ES 細胞から神経系へ分化誘導したところ、SelH KD ES 細胞では、神経前駆細胞マーカー (*Tubb3*, *Nes*, *Ngn1*, *Ngn2*, *Sox1*)、神経細胞マーカー (*Th*, *Ascl1*, *Mtap2*, *Lmx1b*, *Syt1*)、グリア細胞マーカー (*Gfap*, *S100B*, *Cldn11*) の全てで発現時期が早まっていることが明らかになった。また、未分化状態の SelH KD ES 細胞について神経分化に関与する遺伝子のヒ

ストン修飾の解析を行った結果、H3K27me3 修飾の低下が認められた。さらに、神経以外の分化を誘導する遺伝子 (*Gata4*) などを含む遺伝子のヒストン修飾を解析したところ、H3K27me3 修飾の低下が認められた一方で、H3K4me3 修飾などその他のヒストン修飾にはほとんど変化が認められなかった。したがって SelH KD が H3K27me3 修飾を選択的に低下させた結果、神経を含む外胚葉分化が抑制されたと考えられた。このように、SelH は未分化状態の ES 細胞において、バイバレントな分化誘導遺伝子領域の抑制的修飾である H3K27me3 修飾を維持する機能に関与していることが明らかとなった。

以上より SelH は H3K27me3 修飾を介して、分化多能性細胞の分化の方向性およびタイミングを調節する役割を有することが明らかになった。

本研究では、SelH がエピジェネティック制御能を有しており、幹細胞の分化能維持に機能していることが明らかとなった。SelH が分化多能性維持に関係し、特に神経系の分化に関係することの発見は、微量元素としてのセレンウムの役割を考える上でも重要である。これらの発見は遺伝子制御の基礎として重要であるばかりでなく、栄養素としてのセレンウムにも新たな視点を提供している。よって、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。