

メーターはA法でもB法でも妥当であると考えられた。すなわち推定子宮重量Yは $A=0.503X-35.9$ ( $X=a \times b \times c$ )で、B法では $Y=0.604X+249.0$ ( $X=a' \times b' \times c'$ )で算出することが判明した。臨床の現場では計測の簡易なことより、A法のほうが簡便に使用できる。

今回われわれの計算式を用いることにより簡便に子宮重量近似値が計算可能となり、術式選択のツールのひとつになると考えられる。

質疑

1. 得られた回帰式から算出した推定重量が術後摘出子宮重量とかけ離れている際にはどのような場合か；術前MRIで高度変性・石灰化のものは除外しているが、術後に肉眼的に変性・石灰化が確認されたものがあったためであった。

2. 頸部筋腫の場合など筋腫の位置によらずこの計算式が使用できるか；筋腫の数や筋腫の位置の違いによらず、簡易に算出可能な計算式を目指したため、どのような形状にも応用可能である。

3. 術後の評価としては体積での評価をすることが多いが、なぜ重量を用いているのか；婦人科的には腫瘍が大きいため、術後評価は重量が用いられることが多く、今回子宮の比重の検討も行ったが、検討の結果筋腫を含む子宮全体の比重はばらつきが有意に少なかったため、重量での検討でもばらつきは少ないと考えられた。

4. 今回MRIは矢状断・横断像を用いているがその他のスライスではどうか；骨盤の形により、また子宮は前屈であるので今回は矢状断と横断像を用いた。

5. 超音波測定とMRI測定では違いはあるか；子宮筋腫は経膈超音波では測りきれないほど大きいことが多いこと、検者の主観により、検査軸のずれが生じるため、客観的評価の可能なMRIを用いた。

6. 3DCTはどうか；現在子宮筋腫患者に対してMRIはルーチンで行っているため今回はMRIを用いたが、今後は筋腫核出術などにも3DCTを使用することも検討している。

以上質疑に対し専門的知識を持って論理的に応答が行えており学位授与に相当する内容及び知識を持つものであると判断された。

氏名	まつ おか とし き 松 岡 俊 樹
学位の種類	博 士 (工学)
学位記番号	生 第 1 2 号
学位授与の日付	平 成 2 0 年 3 月 2 2 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	マウス初期胚におけるZaglとRhopilin-2の発現と機能解析に関する研究

論文審査委員 (主査)	教授	松	本	和	也
(副主査)	教授	細	井	美	彦
(副主査)	教授	佐	伯	和	弘

## 論文内容の要旨

哺乳類の卵子と精子が受精した直後の受精卵の発生は、卵子に蓄積された母性因子によって制御されている (Schultz, 1993; Latham, 1999; Minami, 2007)。生殖細胞における減数分裂の間は、遺伝子の転写は起こらない。マウスでは、後期1細胞期において最初の minor な胚性遺伝子の活性化 (zygotic gene activation, ZGA) が起こり (Matsumoto et al., 1994)、2細胞期において major ZGA が起こることが知られている。さらに、ZGAの開始あるいは制御機構の分子的背景に関する研究も進展し、これまでに Zar1 (Wu et al., 2003)、Oog1 (Minami et al., 2003) そして、Brg1 (Bultman et al., 2006) などがZGAに関わる遺伝子 maternal-effect gene として同定されている。しかし、未だZGAの詳細な分子機構は明らかになっていない。

本研究では、これら母性因子のマウス初期胚における詳細な分子機構の解明により、マウス初期胚におけるZGAの発現調節機構および第1分裂機構の基礎的知見を得ることを目的に、マウス初期胚において発現するZAG1およびRhopilin-2の発現および機能の解析を行った。

第2章では、マウス初期胚におけるZGA時期に発現が変化する遺伝子zag1 (zygotic gene activation associated gene 1) 遺伝子の機能解析を行った。マウス初期胚においてzag1遺伝子は、mRNAおよびタンパク質は未受精卵から存在しており受精後一旦減少するが、ZGA時期に発現することを明らかにした。また、ZAG1のアミノ酸構造から核移行シグナルの存在が確認されており、ZAG1-EGFP融合タンパク質発現ベクターを用いた実験から、ZAG1が核内に局在することを明らかにした。次に、ZAG1と相互作用する因子としてU2 small nuclear ribonucleoprotein B (U2B<sup>''</sup>) が同定した。U2B<sup>''</sup>は、pre-mRNAのスプライシングに関与するU2 snRNP複合体の1つであり、ZAG1はU2B<sup>''</sup>を核移行させるために必要である可能性を示唆した。さらに、受精後1細胞期の胚において、ZAG1のノックダウン実験から、発生の停止もしくは遅延する結果を得た。これはZAG1によるU2B<sup>''</sup>の核移行が行われず、U2 snRNPによるpre-mRNA splicing が起こらなかった結果、発生の停止もしくは遅延が起こったものと考えられた。

以上のことから、マウス受精卵において、受精後の2細胞期胚への胚発生がpre-mRNA splicing によって制御されている可能性が示唆された。ZAG1はマウス後期1細胞

期胚におけるZGAを調節する遺伝子の1つである可能性が考えられた。

第3章では、マウス初期胚におけるRhopilin-2の発現に関する知見を得ることを目的に、マウス初期胚におけるmRNAおよびタンパク質の発現量の変動、Rhopilin-2タンパク質および微小管との動態を観察した。その結果、マウス初期胚におけるrhopilin-2遺伝子のmRNA発現量は、未受精卵から受精後21時間までは高い値を維持しているが、その後著しい減少を示し、その後は低い値を示した。一方、タンパク質は、未受精卵から受精後48時間まで検出された。さらに、マウスの2細胞期までの胚におけるRhopilin-2の局在を観察したところ、第1分裂時において微小管と似た挙動が観察された。以上の結果より、マウス初期胚におけるRhopilin-2は、受精後の極めて初期において機能していること、また、第1分裂時において紡錘体微小管と似た挙動を示すことから、分裂の機構に関与している可能性についても示唆された。

第4章では、Rhopilin-2タンパク質と相互作用する因子の同定を目的に、酵母Two-hybrid system および共免疫沈降実験によりRhopilin-2と相互作用する因子を探索した。その結果、Rhopilin-2と相互作用を示す因子として、GABA受容体関連タンパク質 (GABARAP) が同定された。さらに、GABARAPがRhopilin-2のPDZドメインを介して結合していることを明らかにした。以上より、生体内においてRhopilin-2はGABARAPと相互作用することが明らかとなった。

第5章では、マウス初期胚におけるGABARAPの発現に関する知見を得ることを目的に、mRNAおよびタンパク質の発現量の変動、GABARAPおよび微小管との動態を観察した。その結果、マウス初期胚におけるGABARAP遺伝子のmRNAの発現の変動は、未受精卵では低い値を示し、受精後発生が進むにつれてmRNAの発現量の増加が確認された。一方、マウス初期胚におけるGABARAPタンパク質の発現の変動は、受精後60時間まで一定量維持されていることが確認された。次に、マウス初期胚の2細胞期までの胚におけるGABARAPの局在を観察したところ、第1分裂時において微小管と似た挙動が観察された。よって、GABARAPが細胞分裂時の紡錘体微小管において関与している可能性が示唆された。以上より、受精後マウス胚の2細胞期までの胚において、Rhopilin-2及びGABARAP両タンパク質の細胞内の挙動が酷似していることが示され

## 論文審査結果の要旨

た。

第6章では、Rhopilin-2およびGABARAPの相互作用時の機能を検討することを目的に、まずGABARAPの結合部分であるRhopilin-2のC末端を欠損させたRhopilin-2 $\Delta$ C-EGFPを1細胞期胚において発現させ、EGFP蛍光による細胞内局在の観察を行った。次に、活性型Rhoを阻害させた胚におけるRhopilin-2およびGABARAPの局在を観察した。その結果、1細胞期胚においてRhopilin-2 $\Delta$ C-EGFPを発現させた細胞では、第1分裂期のミッドゾーン微小管においてEGFP蛍光が観察されなかったことから、ミッドゾーン微小管への局在にはGABARAPが必要であることが示された。また、活性型Rhoを阻害させた胚では、分裂期後期の紡錘体微小管において歪な形をした微小管が観察された。このときのRhopilin-2およびGABARAPの局在については特定できなかった。以上の結果より、マウス受精卵の第1分裂において、Rhopilin-2はRhoの制御下によりGABARAPと相互作用し、分裂期後期以降の微小管の安定化および不安定化に関わる機構の1つとして関与していることが示された。

以上から、マウス初期胚におけるzag1遺伝子およびrhopilin-2遺伝子の機能解析により、ZAG1は後期1細胞期胚におけるminor ZGA時期のpre-mRNA splicing機構に関与している可能性を明らかにし、ZGAの調節機構の一旦が明らかとなった。また、Rhopilin-2は低分子量Gタンパク質Rhoの制御下においてGABARAPと相互作用し、生体内で最大の細胞である受精卵の第1分裂機構に深く関与していることが示された。

哺乳類の卵子と精子が受精した直後の受精卵の発生は、卵細胞質に蓄積されたmaternal-effect genesに由来するmRNAおよびタンパク質によって制御されていることが知られている。生殖細胞における減数分裂の間は、遺伝子の転写は起こらず、マウスでは後期1細胞期において最初のminorな胚性遺伝子の活性化(zygotic gene activation, ZGA)が開始し、2細胞期においてmajor ZGAが起こることが明らかになっている。さらに、ZGAの開始あるいは制御機構の分子的背景に関する研究も進展し、マウス初期胚におけるZGAに関わる遺伝子がmaternal-effect geneとして幾つか同定されている。しかし、未だZGAの詳細な分子機構は明らかになっていない。

本研究は以上の観点より、マウス初期胚における母性因子の機能解析より、ZGAの発現調節機構および第1分裂機構の基礎的知見を得ようとしたものであり、その成果は以下のとおりである。

最初に、マウス初期胚におけるZGA時期に発現が変化するzag1(zygotic gene activation associated gene 1)遺伝子の機能解析を行った。マウス初期胚においてzag1遺伝子は、mRNAおよびタンパク質は未受精卵から存在しており受精後一旦減少するが、ZGA時期に発現することを明らかにした。また、ZAG1のアミノ酸構造から核移行シグナルの存在が確認されており、EGFP融合ZAG1タンパク質発現ベクターを用いた実験から、ZAG1が核内に局在することを明らかにした。次に、ZAG1と相互作用する因子としてU2 small nuclear ribonucleoprotein B (U2B<sup>''</sup>)が同定した。U2B<sup>''</sup>は、pre-mRNA splicingに関与するU2 snRNP複合体の1つであり、ZAG1はU2B<sup>''</sup>を核移行させるために必要である可能性を示唆した。さらに、受精後1細胞期の胚において、ZAG1のノックダウン実験から、発生が停止もしくは遅延するという結果を得た。これはZAG1によるU2B<sup>''</sup>の核移行が行われず、U2 snRNPによるpre-mRNA splicingが起こらなかった結果、発生の停止もしくは遅延が起こったものと考えられ、受精後の2細胞期胚への胚発生がpre-mRNA splicingによって制御されている可能性を示唆した。

次に、マウス初期胚において発現しているrhopilin-2遺伝子の機能解析を行った。rhopilin-2遺伝子のmRNAは受精後21時間から減少すること、一方タンパク質は受精

後48時間まで存在することを明らかにした。また、Rhopilin-2と相互作用する因子としてGABA受容体関連タンパク質（GABARAP）を同定し、さらにRhopilin-2のPDZドメインを介して結合することを明らかにした。これらRhopilin-2およびGABARAPのマウス初期胚における細胞内局在をそれぞれ微小管との対比染色を行った結果、両タンパク質が第1分裂時の微小管とよく似た挙動を観察した。最後に、GABARAPが結合するRhopilin-2のPDZドメインを含むC末端部分を欠損させたRhopilin-2 Δ C-EGFPをマウス1細胞期胚において発現させ、Rhopilin-2 Δ C-EGFPの挙動を観察したところ、分裂期のミッドゾーン微小管の中心部分にはEGFP蛍光が観察されなかった。さらに、Rhopilin-2を制御していると考えられているRhoの活性阻害剤を処理した1細胞期胚におけるRhopilin-2およびGABARAPの局在を調べた結果、染色体が分かれる分裂期後期において両タンパク質の局在が不安定化したことと、それに伴い、紡錘体微小管の形が歪になることを示した。以上のことから、Rhoの制御下において、Rhopilin-2およびGABARAPはマウス受精卵の第1分裂時の後期以降の微小管の安定化あるいは不安定化に関与していることを示唆した。

以上、マウス受精卵において発現する2つの遺伝子について解析を行ったことにより、前者のZAG1については、ZAG1はマウス後期1細胞期胚におけるZGAを調節する遺伝子の1つである可能性が考えられた。これは、ZGAの時期は動物種によっても異なり、その分子機構については依然明らかになっていないことから、本研究の結果がもつ生殖生理学的意義は大きいと考えられる。また、後者のRhopilin-2については、受精後の第1分裂時においてRhoの制御下においてGABARAPと相互作用し、最も大きい細胞である受精卵の分裂に関与している可能性が考えられた。これは、母性因子の持つ機能の枠組みの1つとして、大きな細胞の分裂に関与する因子の存在を示唆するものであり、本研究の結果は初期胚の発生制御に関する重要な基礎的知見を提示している。

以上のように、本論文は、分子発生的手法によりマウスの1細胞期胚におけるZGAの分子機構の解明の端緒を示した研究として意義あるものであり、博士（工学）論文として価値あるものと認める。

氏名	もり 森	まさ 真	ゆき 幸
学位の種類	博士（工学）		
学位記番号	生第13号		
学位授与の日付	平成20年3月22日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	映像教材に対する学習者の認知的負荷の軽減と 教員の教材作成支援に関する研究		
論文審査委員（主査）	教授	武田	昌一
（副主査）	教授	奥井	順
（副主査）	教授	秋濃	俊郎