

た初期胚では *Polm* mRNA と *Slc2a1* mRNA 量が減少しないことが認められた。以上のことから、PARN が受精後の母性 mRNA である *Polm* mRNA と *Slc2a1* mRNA の分解に関与していることを初めて明らかにした。

以上のように、本論文は、マウス初期胚の MZT 時期に起こる母性 mRNA の分解制御機構に、mRNA 分解経路の最初の段階である deadenylation が関与していることを初めて明らかにした論文であり、再プログラムによる受精卵の分化全能性の獲得機構の解明につながる知見を提示している。ここに、本論文は博士（工学）論文として価値あるものと認める。

氏 名	李 娥 苾
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	生 第 3 3 号
学位授与の日付	平成 25 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規程第 5 条該当
学位論文題目	Studies on roles of HDACs in oocyte aging and aging of reconstructed oocyte

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

論文内容の要旨

排卵後、間もなく受精しない卵子は老化が始まり、時間の経過とともにその受精能や発生能が失われていく。最近の研究から、卵子は老化するにつれてヒストンH3(H3K14)およびH4(H4K8/K12)タンパク質のアセチル化レベルが高くなることが示されている(Huang JC et al., 2007)。同時に、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の阻害剤であるtrichostatin A (TSA)で卵子を処理することでマウスの卵子の老化が促進されることも示唆されている。従って、少なくともヒストンのアセチル化は卵子の老化の指標になり、その他の表現型に関与する可能性が考えられる。一方で、老化した第二減数分裂中期で停止している卵子においては正常な紡錘体が崩壊し(Wakayama et al., 2004)、染色体の細胞質への分散も高頻度で観察されることが知られている(Chebotar NA, 1976)。

これらの知見に基づき、本研究では紡錘体を形成するチューブリンタンパク質のアセチル化の状態が卵子老化を通じて変化する可能性について検討し、さらにClass III および Class I/IIのHDAC阻害剤であるnicotinamide (NAM)とTSAで卵子を処理することでマウスの卵子の老化の表現型に与える影響について調べた。その結果、排卵後の未処理の卵子は、採卵後の24時間体外培養により異常な形態を示しはじめ、48時間後では全体の半数以上の卵子で細胞質の断片化が認められた。また、老化した卵子では紡錘体のチューブリン量は減少し、細胞質のアセチルチューブリン量は老化にしたがい増加が認められた。さらに36時間後の卵子では細胞質にチューブリンにより生成された小さいスポットとして星状体微小管(astral microtubules)も観察された。これは老化の指標になることが知られているが、このスポットにおいてもアセチル化チューブリンが認められた。しかし、排卵後の卵子の培養開始時にNAMを添加することで、36時間後の細胞質に生成される上記の小さいスポットの形成は抑制された。さらに、TSA処理では卵子の老化の進行にともない染色

体の分散率が増加する一方、紡錘体の異常な伸長は防ぐことができた。それに対して、NAM処理では染色体の分散と紡錘体形態の異常な伸長は防ぐことができた。以上の結果から、ヒストンのみならず非ヒストンタンパク質のアセチル化も老化の進行に伴い増加すること、Class III HDACが卵子の老化に重要な役割を果たすことが初めて示唆された。

最近の研究により、老化した卵子の核を新鮮な卵子細胞質に移植を行ったところ受精後の発生率が回復し、また逆に老化した細胞質へ新鮮な卵子の細胞核を移植した卵子においても部分的に発生率が回復することが示されている(Opsahl et al, 2002; Bai et al, 2006)。これらの知見から核と細胞質がそれぞれ相互に影響を与え卵子老化に関与していることが考えられる。そこで卵子老化における核が果たす役割を明らかにするために、核置換技術を用いて核が除去された除核(ENU: enucleation)卵子および体細胞核が移植された体細胞核移植(SCNT: somatic cell nuclear transfer)卵子がどのような老化の表現型を示すか検討を行った。上記でも示したように、排卵後の卵子では培養開始24時間後に異常な細胞質分裂が始まり、48時間後では全体の半分以上の卵子で細胞質分裂を観察した。しかし、ENU卵子では48時間以上経った後でも異常な細胞質分裂はほとんど認められなかった。この結果とは対照的に、SCNT卵子では正常に老化が進行した卵子より早い24時間後に細胞質分裂が観察され(自発的な単為発生)、48時間後では通常の断片化より細胞質のサイズが小さい細胞質の断片化を示すことが観察された。この結果から、体細胞由来の核が卵子細胞質の異常な細胞質の断片化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、SCNT卵子と正常な卵子ではともにアセチル化チューブリンが老化の進行にともなって増加した。また、36時間後の卵子の細胞質においてチューブリンによる小さなスポットとして星状体微小管も観察された。特に、ENU卵子においては正常卵子より早い24時間後から星状体微小管が顕著に観察され、36時間後では24時間と比較してさらに小さなスポットの増加が認められた。対照的に、SCNT卵子では36時間が経っても星状体微小管が観察されなかった。しかし、SCNT卵子では老化の進行によ

て、染色体の分散と紡錘体の異常な伸長が高頻度に観察された。次に排卵後の卵子と再構築された卵子においてmicrofilamentsの局在を観察した。SCNT卵子では再構築後1時間でmicrofilamentsは染色体近位のactin capに、ENU卵子では細胞膜に局在が認められた。また、SCNT卵子では老化の進行に伴い24時間後でもactin capが見られる一方、ENU卵子では細胞膜と細胞質中央に局在が認められた。最後に、老化が進行した再構築された卵子でcortical granules (CGs)の局在を観察した。その結果、排卵後の卵子では老化が進行するにしがたいCGsが紡錘体の周りに局在することを観察した。しかし、ENU卵子では老化の進行に伴い細胞膜にCGsが局在し、36時間後のSCNT卵子では老化が進行しても異常なCGsの局在がほとんど認められなかった。以上の結果から、卵子の老化の表現型は、細胞核の存在の有無が影響するもの(異常な星状体微小管形成)、卵子にある核の種類により異なるもの(actin capの崩壊)、核とは独立して起こるもの(チューブリンのアセチル化の増加)に分類されることが明らかとなった。

本研究は、卵子の発生能の分子機構の解明とその改善・制御技術の開発を最終目標として、排卵後の卵子老化にともなう発生能喪失の機構解明と老化抑制技術の開発を目的としている。またこの研究は、近年問題となっている体細胞クローンの低発生率、高齢化による女性の不妊、体外培養による卵子の低発生率の解決も視野に入れている。

卵巣より卵管へと排卵された卵子は、受精して個体になれる時間が限られており、人間では24時間以内であり、マウスでは8~12時間である。受精しない卵管中の卵子は、まもなく老化が始まり、時間の経過とともにその受精能や発生能が失われていく。この卵子の老化にともない卵子細胞において様々な生理的变化が起こることが知られている。例えば、MPF活性の低下、ATP量の低下、紡錘体の形態異常、アクチンの消失等である。また最近の研究から、卵子の老化にともないDNAのメチル化異常などエピジェネティックな変化が起こることも報告されている。さらにDNAのメチル化のみならず、卵子は老化するにつれてヒストンH3 (H3K14) およびH4 (H4K8/K12) タンパク質のアセチル化レベルが高くなること、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の阻害剤であるtrichostatin A (TSA)で卵子を処理することでマウスの卵子の老化が促進されることも示されている(Huang JC et al., 2007)。しかしながら、卵子老化にともなうこれらのアセチル化異常がヒストンに限定的なのか、どのようなアセチル化酵素が老化に関与しているのかについては明らかではなかった。

本研究では、排卵後の卵子を培養することで老化する系を用いて実験を行った。そして、紡錘体を形成するチューブリンタンパク質のアセチル化の状態が卵子老化を通じて変化する可能性について検討を行い、さらにHDAC阻害剤であるnicotinamide (NAM)とTSAで卵子を処理することでマウスの卵子の老化の表現型に与える影響について検討を行った。その結果、排卵後の卵子は24時間後異常な形態を示しはじめ、48時間後では全体の半分以上の卵子で細胞質の断片

化が認められた。また、卵子は老化にともない紡錘体のチューブリン量は減少し、逆に細胞質のアセチルチューブリン量は老化にしたがい増加が認められた。また36時間後の卵子では細胞質にチューブリンにより生成された小さいスポットとして星状体微小管 (astral microtubules) が観察された。これは老化の指標になるようになることが知られているが、この星状体微小管でもアセチル化チューブリンが認められた。しかし、排卵後の卵子の培養液にNAM を同時に添加することで、老化にともなう卵子の異常な形態変化に36時間後細胞質に生成される上記の小さいスポットの形成を抑制した。さらに、排卵後卵子に NAMと TSAを添加した場合、TSAは老化の進行にしたがい染色体の分散率は増加したが、紡錘体の異常な伸長は防ぐことができ、NAMは染色体の分散と紡錘体形態の異常な伸長は防ぐことができた。以上の結果は、卵子においてヒストンのみならず非ヒストタンパク質のアセチル化も老化の進行に伴い増加すること、Class III HDACが卵子の老化に重要な役割を果たすことが示唆された世界で初めての知見となった。

さらに卵子老化において核の果たす役割を明らかにするため、体細胞核移植 (SCNT)された卵子および除核 (ENU)された卵子に関する老化研究を行った。その結果、SCNT卵子は通常の卵子と異なり24時間後に一部の卵子で異常な活性化が始まり、48時間後では細胞質の断片が通常と異なることを発見した。対照的に、ENU卵子では48時間以上経った後でも細胞質の断片化は認められなかった。これらの結果から、体細胞由来核が異常な細胞質分裂に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、SCNT卵子においてマイクロフィラメント (microfilament)の局在を観察し、SCNT卵子では再構築後1時間以内にマイクロフィラメントは染色体近位のactin capに集まること、ENU卵子では細胞膜に局在が認められないことを見出した。最後に、老化が進行したSCNT卵子で表層粒 (CGs: cortical granules) の局在を観察し、排卵後の卵子は老化が進行するにしたがいCGsが紡錘体の周りに局在するが、ENU卵子では老化の進行に伴い細胞膜にCGsが局在し、36時間後のSCNT卵子では老化が進行しても異常なCGsの局在がしないことを示した。これらの結果から、卵子の老化の表現型は、細胞核と細胞質が協調的に制御していることが示唆された。

以上のように、本論文は卵子老化研究において、1. アセチル化の異常が非ヒストタンパク質にまで及んでいること、2. 卵子老化にClass IIIのヒストン脱アセチル化酵素が関与していること、3. 体細胞核移植した卵子を用いて卵子老化の表現型に核が重要であることを明らかにし、この研究分野に大きく貢献する研究内容であることから、博士 (工学) 論文として価値あるものと認める。