

氏名（本籍）	柿野 陽子
学位の種類	博 士（ 農学 ）
学位記番号	博 甲 第 7351 号
学位授与年月日	平成 27 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	生殖工学技術を用いた初期胚のエピジェネティクスな異常に関する研究

主査	筑波大学教授（連携大学院）	農学博士	小倉 淳郎
副査	筑波大学教授	農学博士	馬場 忠
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	柏原 真一
副査	筑波大学准教授（連携大学院）	博士（理学）	井上 貴美子

論 文 の 要 旨

本研究は、未成熟な精子細胞を用いた円形精子細胞注入(round spermatid injection; ROSI)におけるエピジェネティックな異常を調べることを目的に実施した。マウス前核期胚では、主に雄性前核でメチル化 DNA の 5-methylcytosine(5mC)から 5-hydroxymethylcytosine (5hmC)へのヒドロキシ化が進行し、これが能動的 DNA 脱メチル化に至ることが知られている。そこで、ROSI 胚における能動的 DNA 脱メチル化の正常性を調べるために、5mC と 5hmC、そしてこのヒドロキシ化に関わる水酸化酵素 ten-eleven translocation 3 (Tet3)の免疫染色による検出を行い、さらにライブセルイメージング法を用いて経時的な円形精子細胞由来のヒストンタンパクの消失時間と DNA メチル化レベルの関係を解析した。また脱メチル化レベルの ROSI 胚発生への影響を調べるために、胚移植実験も実施した。

顕微授精後 6 時間における ROSI 胚雄性前核での 5mC レベルは、精子を用いた顕微授精 (intracytoplasmic sperm injection; ICSI)胚と比較して有意に高く、ROSI 胚では十分に脱メチル化が進行していないことが明らかになった。雄性前核における Tet3 のタンパク質局在を調べたところ、ROSI 胚では ICSI 胚に比べて有意に低い局在が確認された。ICSI と異なり、ROSI では円形精子細胞由来のヒストンが卵子由来のヒストンに置換される。そこで、ヒストン H2B-EGFP マウスの円形精子細胞を用いて顕微授精を行い、円形精子細胞由来のヒストン消失までの時間とその後の DNA メチル化レベルの関係についてライブセルイメージングを用いて調べた。ライブセルイメージングでは、mRNA 注入後のメチル化 DNA 結合タンパク質 (Methyl CpG binding domain; MBD)の局在レベルをもって DNA メチル化レベルとした。H2B シグナル消失時間と雄性前核のメチル化レベルには正の相関がみられた。DNA メチル化レベルをもとに ROSI 胚を分類して胚移植

を行った結果、着床率および 11.5 日における胎仔発生率に差は見られなかった。しかし、得られた胎仔の大きさを計測したところ、高 DNA メチル化 ROSI 胚由来では、正常な大きさの胎仔数が有意に低下しており、前核期の雄性前核における DNA 脱メチル化不全と胎仔発生遅延に何らかの関連があることが示唆された。

以上から、ROSI 胚において、能動的 DNA 脱メチル化不全というエピジェネティクス異常が生じることが明らかになった。その原因の一つとして、円形精子細胞ヒストン→卵子ヒストン置換が、精子核プロタミン→卵子ヒストン置換に比べて時間がかかるため、DNA 脱メチル化が正常に進行しない可能性が考えられた。DNA 脱メチル化不全が、実際の ROSI 胚の発生率低下につながっているという直接的な証拠は得られなかったが、両者に相関関係があることが示された。本研究は、哺乳類 ROSI 胚におけるエピジェネティクス特性を初めて本格的に明らかにしたものである。その成果は、精子完成における核タンパク質変遷の生物学的意義の解明および臨床における ROSI 技術の改善につながることを期待される。

審 査 の 要 旨

未成熟精子、すなわち円形精子細胞を用いた顕微授精 (ROSI) は、細胞の選別から注入操作まで、高度な経験と技術を要するため、基礎研究分野においても、その基本的な情報が不足している。特に ROSI 胚のエピジェネティクスの特性は、これまでほとんど解明されていなかったため、ROSI 後の低い産子率がエピジェネティクス異常に起因するかを明らかにすることは、発生生物学上の重要な研究課題と言える。

本研究は、ROSI 胚におけるエピジェネティクス異常として、雄性前核の DNA 脱メチル化に着目したものである。免疫細胞化学的観察により、雄性前核における Tet3 タンパク質局在低下を起因とする DNA 脱メチル化不全を明らかにした。さらに、ライブイメージング技術を駆使することによって、円形精子細胞由来のヒストンタンパク質の置換遅延と DNA メチル化レベルが関係すること、そして脱メチル化不全を起こした ROSI 胚は胚発生遅延を引き起こしやすいことを明らかにした。これらの結果は、DNA 脱メチル化不全および胚発生能の低下が、円形精子細胞核におけるヒストンの存在に起因する可能性を示している。よって、本研究は、円形精子細胞の細胞学的特徴と ROSI 胚のエピジェネティクス特性を結びつけることに初めて成功したものである。これらの新しい知見はマウス ROSI 技術への貢献だけでなく、ヒト生殖補助医療において精子のみつからない重度の男性不妊症に対する治療においても今後重要な情報を与えると考えられる。

平成 27 年 1 月 19 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査および最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。