

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 新井 良和

着床前胚の体外操作は家畜生産の幅広い分野で応用されている。従来、体外操作胚の正常性は、ヒトを含め、形態的観察を基に評価され、生まれてきたら胚操作は成功というように、未だに技術の進歩に追いつかず科学とは遠い世界にある。少なくとも、培養や核移植を含む胚操作の段階で、先端の科学概念でどう理解するのかを真剣に向き合う必要がある。エピジェネティクスは発生・分化の新たなパラダイムである。DNA メチル化は哺乳類のゲノム DNA に見られる唯一の化学修飾で、ヒストン修飾とともにエピジェネティクス制御の主要な要因である。DNA メチル化はヒストン修飾の状況も反映することが期待されるので、DNA メチル化情報を得ることは今後の胚の正常性評価の基盤となる。家畜を含め、一般に生物は雑種である。エピジェネティクスの成立は、ウイルスなど外来遺伝子と自己遺伝子の攻防にあり、例えば非コード RNA などがエピジェネティクス系に影響を与える事実は、その考えを支持している。したがって、雑種と近交系はエピジェネティクス系で重要な問題を含んでいる。このことは、近交系での成績を、一般の動物の生殖に当てはめる限界を意味している。本論文はマウス初期胚について、雑種 F1 胚の解析と体細胞核移植胚について DNA メチル化を中心に解析したものである。

第1章では、近交系と雑種 F1 マウスの初期胚について、異なった酸素濃度下での発生と5遺伝子(Dnmt1o, Oct4, mPer1, Sphk1, Sall3)の T-DMR の DNA メチル化状況を解析している。体外での着床前胚の発生にも酸素濃度条件は大きく影響し、母体内環境に近い 5% O₂ 条件下の方が、外気と同じ約 20%(20% O₂) に比べて、胚の発生能は向上する。このことは、げっ歯類の卵管・子宮の酸素濃度は 3-10%と報告されている結果と合致する。しかし、現在は胚の発生に対して 20% O₂ での培養が一般的である。まず、母体内より回収された胚では Restriction mapping によるマウス初期胚の DNA メチル化解析により、遺伝子領域ごとに異なる発生ステージ特異的な DNA メチル化パターンが形成されることが明らかになった。(本論文では、それぞれの DNA メチル化パターンの集合を DNA メチル化プロファイルと呼ぶ)。したがって、DNA メチル化プロファイルは初期胚発生時期の指標となることが明らかになった。

さて、近交系胚は培養を含む体外操作に弱く、通常は胚の体外操作では雑種 F1 胚が用いられてきた。本実験でも 20% O₂ 条件下では、胚盤胞および桑実胚への発生率は、それぞれ C57BL/6NCrj(B6) 胚では低く、雑種 F1 胚[C57BL/6NCrj x DBA/2NCrj](BDF1)、では高かった。しかし、5% O₂ 条件下では、B6 胚の胚盤胞への発生率は大幅に改善された。胚盤胞への発生率が高い BDF1 胚では酸素濃度条件によらず、さらに母体内より回収された胚に類似した DNA メチル化プロファイルが形成された。興味深いことに、B6 胚 DNA メチル化プロファイルは、20% O₂ 条件下では母体回収胚と大きく異なった DNA メチル化プロファイルを示した。しかし、5% O₂ 条件下では DNA メチル化プロファイルの異常は改善され BDF1 胚と近くなった。培養条件下では、近交系胚は F1 胚と異なった DNA メチル化プロファイルを示すこと、酸素濃度を下げることで発生能と DNA メチ

ル化プロファイルが改善することが明らかになった。このことは、DNA メチル化情報は、初期胚の発生指標として有用であることを示している。

第2章では体細胞核移植胚の DNA メチル化プロファイル変化が解析された。まず、生殖細胞(精子・卵)、及び核移植胚のドナー細胞(卵丘細胞)の3 遺伝子(Dnmt1o、Oct4、Sall3) T-DMR について、Pyrosequencing による定量的な DNA メチル化解析を行い、先の報告結果を確認した。生殖細胞に由来する精子顕微授精(ICSI)胚、及び体外培養した自然交配卵では、3 ヶ所の遺伝子座に共通して、多くの個体で低メチル化状態が示された。一方、核移植胚では Oct4 において、脱メチル化が不完全であり、多くの個体で高メチル化状態が認められた。興味深いことに、卵丘細胞でも低メチル化状態であった Sall3 では、DNA メチル化の亢進が核移植胚でのみ高頻度に生じていた。また、2細胞期で発生停止・遅延した核移植胚では、このようなメチル化亢進が顕著に現れた。以上の結果より、着床前の核移植胚での DNA メチル化異常は、メチル化亢進を含む両方向に生じることが明らかとなった。体細胞クローン動物では分娩期までの発生能が低く、さらに出生に至る個体でも過大仔や胎盤過形成などの表現型異常を示し、核移植技術には依然として多くの問題が残されている。本結果から、DNA メチル化解析はクローン胚の異常を知る上で重要な手段となると期待される。

以上、本研究では、マウス初期胚の DNA メチル化プロファイル解析を行い、胚発生の指標として DNA メチル化情報が有効であること、近交系と雑種 F1 胚は培養下で異なった DNA メチル化プロファイルを示すことなど、基礎生物学として重要な知見が得られた。これらの発見は、DNA メチル化解析は、畜産分野やヒトの不妊治療としての体外培養などの様々な新たな技術開発に対応してゲノムレベルで評価を可能なことを示し、応用面でも貴重な貢献となっている。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。