

論文の内容の要旨

論文題目 **Sirt3 endows preimplantation embryos with mitochondrial protection against p53-inducing stress conditions**

和訳 Sirt3 はミトコンドリア機能調節を介して p53 誘導性ストレスによる初期胚発生停止を抑制する

指導教員 栗原 裕基 教授

東京大学医学系研究科

平成 18 年 4 月進学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

河村悠美子

体外受精 (IVF)、顕微授精 (ICSI)、体外培養等是不妊治療における生殖補助医療技術として臨床現場でも広く用いられている。近年、高齢での妊娠や不妊治療は増加傾向にあることより、そうした技術の需要は増加しているが、一方で実際の治療効果向上のためには多くの課題が残されている。また近年では、発生初期の環境要因がエピジェネティック制御に影響を及ぼし、生後の生理状態や疾患発症にも影響を与える可能性が諸研究より示唆されている。従って、初期胚発生過程に関与する分子機序の理解を深めることは、臨床的にも意義を持つと思われる。

受精とそれに続く初期発生の過程は、次世代へと種のゲノム情報を伝えるという重要な任務を担う生命現象であることから、正確に且つ安定的に遂行されねばならない。哺乳類では一般に、排卵から受精、着床に至る過程は低酸素状態で外界から防御された生体内で

営まれるが、生殖補助医療におけるような体外の好气的環境下では、高酸素状態に伴う代謝活性の変化に付随して活性酸素種（ROS）が産生され、その過剰による酸化ストレスは胚を傷害することが報告されている。このように、初期胚は代謝変化を含めた、環境変化や生体ストレスに高い感受性を示すが、一方で防御機構も高度に備えていると考えられる。

本研究で注目した Sirtuin ファミリーは酵母からヒトまで高度に保存された脱アセチル化酵素で、哺乳類では Sirt1~7 が同定されている。NAD⁺濃度依存性にヒストンや多様なタンパク質を脱アセチル化し、老化、癌化、DNA 損傷修復、アポトーシス、細胞周期調節、ストレス応答等、多岐に亘る生命現象に関与することが知られており、細胞の代謝状態と生命現象をつなぐ重要な因子として注目されている。その観点から、マウス初期胚において Sirtuin が代謝変化に応答し、細胞傷害性ストレスに対する防御機構の一端を担っているのではないかと推測し注目した。そこで本研究では、その可能性を追求するとともに、そうであるならばそれはどのようなメカニズムによるのかを明らかにすることを目的とした。

まず、Sirtuin の初期胚発生への関与の手がかりとして発現の確認と機能阻害実験を行った。未受精卵と胚盤胞に至る各卵割段階の胚を母体から採取し、Sirt1-7 の発現とその変化を RT-PCR 法、Sirt1 に関してはさらに real-time PCR 法を用いて検討した結果、全メンバーの母性転写産物が胚に遺伝されていること、胚ゲノム由来の遺伝子発現開始後の発現レベルは、Sirt1-3、7 は胚盤胞に至る過程で漸減し、Sirt4-6 は検出感度以下であった。また、Sirt1 の発現挙動は RT-PCR 法と real-time PCR 法とでほぼ相関する結果を示した。

IVF と胚盤胞までの培養期間、胚を Sirtuin 阻害薬 (nicotinamide, sirtinol, BML-210) 添加培地で培養すると、発生に遅延や停止が生じた。その際の代謝との関連を、Sirtuin 特異性の高い阻害薬 sirtinol で処理した胚に関し、ROS を標識する蛍光プローブ CM-H₂DCFDA を用いて検討したところ蛍光強度の上昇が見られ、抗酸化剤 N-acetyl-L-cysteine(NAC) 処理により蛍光が抑制された。さらに電子伝達系阻害剤 stigmatellin 処理によっても蛍光強度が抑制

されたことから、Sirtuin 機能阻害胚では代謝変化が生じ、ミトコンドリアでの ROS 産生が増加することが示された。以上は、Sirtuin の初期胚発生の進行及びミトコンドリアにおける ROS 産生への関与を示唆している。

次に、初期胚の酸化ストレス防御機能への Sirtuin の寄与について検討するため、酸化ストレス刺激に起因した Sirtuin の発現変化を解析した。4 細胞期胚を過酸化水素処理したところ、Sirt4,5 以外の Sirtuin 遺伝子の発現上昇が RT-PCR 法にて認められた。

酸化ストレス応答とミトコンドリア機能とが密接に関与することは既知の知見である。本研究でも、Sirtuin 機能阻害実験にて Sirtuin とミトコンドリア ROS 産生との関連が見られた。そこでミトコンドリア局在性メンバー (Sirt3-5) に注目し、中でも発現が過酸化水素刺激に対し増加したこと、電子伝達系複合体 I を始めとするミトコンドリア局在性の代謝関連タンパク質群の脱アセチル化を介してミトコンドリア機能を調節していることが報告されていることから本研究では Sirt3 に解析の焦点を絞ることにした。

まず、Sirt3 に EGFP を結合した mRNA を受精卵へ顕微注入しタンパク発現挙動を追う手法を用いて、Sirt3 が初期胚でもミトコンドリアに局在することを EGFP 蛍光と MitoTracker 染色との局在の一致から確認した。

初期胚発生における Sirt3 の関与と役割を探るため、Sirt3 特異的 siRNA を前核期胚に顕微注入し、胚盤胞期まで観察した結果、コントロール siRNA 群に比べ、Sirt3 ノックダウン群では発生に遅延や停止が生じた。さらに、Sirt3 欠損配偶子を用いた IVF と体外培養の実験系でも、Sirt3 完全欠損胚で胚盤胞までの発生率にノックダウン胚と同様の低下が見られたことから、Sirt3 が体外培養下での初期発生過程に重要であることの実証を得た。

また、Sirt3 ノックダウン胚でも、ROS 産生が亢進していること、ROS の細胞内主要産生源とされている NAD(P)H oxidase と電子伝達系の各々の阻害薬 apocynin と stigmatellin で処理すると stigmatellin でその産生がより抑制されることが CM-H₂DCFDA 標識を用いて検

出されたことから、ミトコンドリア ROS 産生が亢進することが示唆された。さらに、NAC 処理でこの ROS 産生は抑制され、且つノックダウンで低下した胚発生率が改善されたことより、産生された ROS の過剰が胚発生異常を引き起こしたものと推測される。

また先述の *Sirt3* 欠損配偶子を用いた IVF 一体外培養実験では、精子の *Sirt3* 遺伝子型非依存的に *Sirt3* 欠損卵子を用いた場合に胚発生率が低下する現象が見出された。Sr²⁺処理により単為発生を誘導した *Sirt3* 欠損卵や誘導後 *Sirt3* ノックダウン処理した卵が、胚盤胞形成率の低下を示したことから、卵子由来の *Sirt3* の重要性が示唆された。ミトコンドリアがほぼ母親に由来し、着床前には数の増殖が抑制されていることとの関連性が推測される。

以上の結果と既報の知見から、体外環境下では好氣的な代謝活性が高まるが、*Sirt3* による脱アセチル化を介した電子伝達系の機能調節を欠く状態では電子伝達系が正常に機能せず、酸素分子への直接的な電子伝達が亢進する結果、ROS が過剰に産生され胚発生を阻害した、と推測した。

さらに着床前胚における *Sirt3* ノックダウンが及ぼす着床後胚発生への影響について検討した。*Sirt3* またはコントロール siRNA 導入後、24 時間と 72 時間の異なる培養期間後に仮親マウスに移植し、着床率と移植後 18.5 日における生存率で評価した。結果、長期間培養した *Sirt3* ノックダウン群で着床率と生存率がともに低下した。ノックダウン胚では、初期発生に重要な遺伝子 *Oct3/4*、*Nanog*、*Cdx2* の桑実胚期での発現が低下していることが RT-PCR 法により見出されたことより、初期胚培養時に *Sirt3* が十分に機能することが、個体形成に至る正常胚発生の維持に重要であると考えられた。

最後に、*Sirt3* 機能低下による ROS 産を上昇から胚発生異常に至る分子メカニズムを解明するにあたり、ストレスに応答して DNA 修復や細胞周期停止、アポトーシス等に機能する p53 シグナル経路に注目した。過酸化水素処理胚、*Sirt3* ノックダウン胚、*Sirt3* ノックアウト胚の遺伝子発現変化を指標に p53 シグナル経路の関与の検討をしたところ、p53 及び

その下流の p21 の mRNA またはタンパクレベルでの発現誘導が RT-PCR 法または Western blotting 法を用いて認められた。また、p53 による転写抑制が知られる *Nanog* が p21 に相反する遺伝子発現変化を示したことから、p53 シグナル経路の関与が示唆された。

さらに、NAC 処理した *Sirt3* ノックダウン胚では、p21 の誘導及び *Nanog* の抑制が解除されたことから、ノックダウンにより増加した細胞内 ROS が p53 シグナル経路を誘導したものと考えられるが、p53 の発現は抑制されなかったことから、ROS 以外の p53 誘導経路の存在が示唆される。

p53 シグナルの胚発生率低下への関与を調べるため、*Sirt3* ノックダウン胚に p53 siRNA 処理を施し p53 シグナルを抑制したところ、胚盤胞形成率が顕著に改善した。この結果から、*Sirt3* ノックアウトやノックダウンにより生じる胚発生遅延や停止に p53 シグナル経路が中心的な役割を果たしていることが明らかになった。

[総括] *Sirt3* は正常な初期発生を進行させるためにミトコンドリア機能の調節を介して酸化ストレスに対して防御的に機能する。*Sirt3* が十分に機能しない場合、ミトコンドリアの電子伝達系の正常機能が阻害され、電子伝達系での ROS 産生が亢進する。過剰な ROS が酸化ストレスとなり p53 シグナル経路を誘導することで、胚発生の遅延や停止を招いたものと考えられる。本結果は、初期胚の生理機能についての理解につながるとともに、生殖補助技術の向上に新しい視点を与えるものと期待される。

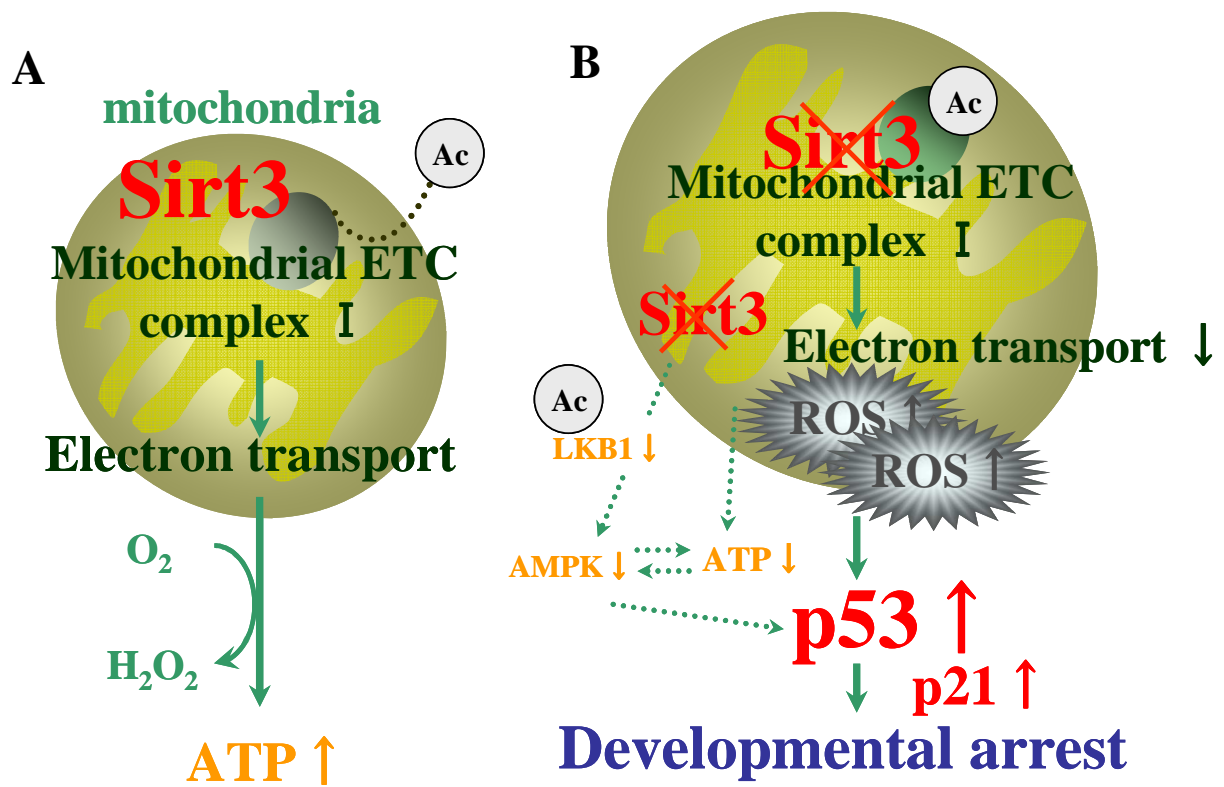


図. 初期胚発生における Sirt3 によるミトコンドリアの機能調節機構

A. Sirt3 正常機能時。

B. Sirt3 ノックダウンまたは欠損時のミトコンドリア機能調節機構の破綻時。本研究で明らかにした ROS-p53 経路以外にも、図示した LKB1-AMPK 経路等、p53 シグナル経路を誘導する別の経路の存在が推定される。