

高等動物の初期胚は環境変化や生体ストレスに高い感受性を示す一方で、防御機構も高度に備えていると考えられている。本研究は発生工学的手法及び分子生物学的な手法を用いたマウス着床前胚の解析により、NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide)依存性脱アセチル化酵素として知られる Sirtuin ファミリーの、その機構への関与とその作用機序の解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 未受精卵から胚盤胞に至る初期発生過程における Sirt1~7 の発現が RT-PCR 法により検出され、これらの発現は胚盤胞期に至るまでの過程で減少または消失した。この結果より、体内の嫌気的環境下では、卵子形成過程で発現した産物が遺伝していること、胚ゲノム由来の発現は低いことが明らかとなった。今後、Real-time PCR 法などを用いて定量的に評価し、結果の精度を高める必要がある。
2. 受精卵を Sirtuin 阻害薬 (nicotinamide, sirtinol, BML-210) 添加培地で培養すると、胚盤胞に至る発生が遅延または停止したことから初期胚発生への Sirtuin の機能的関与が示唆された。
3. Sirtuin に特異性の高い阻害薬 sirtinol 処理胚では、活性酸素種 (ROS) 検出プローブである CM-H₂DCFDA を用いた蛍光標識で細胞内 ROS の上昇が認められた。ミトコンドリア電子伝達系複合体 I 及び III の阻害薬 stigmatellin で処理することにより ROS が減少したことから、Sirtuin 機能阻害胚では主にミトコンドリアを産生源とした細胞内 ROS が増加することが明らかとなった。
4. 過酸化水素による活性酸素刺激後に Sirt4,5 以外のメンバーで発現レベルが上昇することが、RT-PCR 法により検出され、Sirtuin の初期胚における酸化ストレス応答性が示唆された。本結果に

についても定量的に評価する必要がある。

5. **Sirt3** の役割に注目し、受精卵への **Sirt3** siRNA のマイクロインジェクション法によるノックダウンを行ったところ、コントロール siRNA 群に比べ、ノックダウン胚では胚盤胞の形成が有意に抑制されたことから、**Sirt3** の初期胚発生への関与が示唆された。

6. **Sirt3** ノックダウン胚においても細胞内 ROS の上昇が CM-H₂DCFDA 標識により認められた。細胞内 ROS の主要産生源として知られる NAD(P)H Oxidase とミトコンドリア電子伝達系、各々の阻害薬 apocynine と stigmatellin でノックダウン胚を処理したところ、Stigmatellin 処理でより有意に ROS 産生が抑制されたことから、**Sirt3** ノックダウン胚でも主にミトコンドリアでの ROS 産生が亢進することが示された。ROS の過剰産生は、胚におけるミトコンドリア機能異常を示唆するものである。

7. **Sirt3** ノックダウン胚を活性酸素阻害薬 N-acetyl-L-cysteine (NAC) で処理すると、細胞内 ROS レベルが低下し、胚盤胞の形成に改善が見られた。この結果より、ノックダウン胚の胚発生異常は細胞内で産生された ROS が誘引したものであることが示唆された。

8. **Sirt3** ノックアウトマウス由来の卵子及び精子を用いた体外受精と体外培養の実験を行い、**Sirt3** 完全欠損胚では胚発生率が低下するという、初期胚発生における **Sirt3** の重要性を示唆する、ノックダウン実験結果を支持する結果を得た。さらに、精子の **Sirt3** 遺伝子欠損の有無に関わらず、卵子が **Sirt3** を欠損する場合に、より胚発生率が低下する現象が認められた。

9. Sr²⁺処理で単為発生を誘導した後 **Sirt3** をノックダウンした卵及びノックアウト卵子に単為発生の誘導をかけた卵は、ともに胚盤胞形成率の低下を示したことから、初期胚発生の初期段階の細胞防御機構には卵子形成過程で転写され蓄積されている母親由来の **Sirt3** が重要な機能を果たしている、という示唆を得た。1, 4の結果より、胚性の遺伝子発現開始後は、環境やストレス刺激に応じて発現を生じ、胚の防御に寄与するものと考えられる。

10. **Sirt3** ノックダウン及びノックアウト胚の遺伝子発現変化に注目した。初期発生に重要な遺伝子のうち内部細胞塊のマーカー遺伝子として知られる *Oct3/4* 及び *Nanog*、栄養外胚葉への分化

マーカーとして知られる *Cdx2* に注目し、桑実胚期での遺伝子発現レベルを RT-PCR 法 (ノックダウン胚は Real-time PCR 法でも検討) を用いて検討した結果、当該遺伝子すべてにおいて発現レベルの低下が示された。この結果は、正常に胚発生が進行していないことが遺伝子発現レベルでも確かめられたことを意味する。

11. 体外培養に起因するストレスと *Sirt3* の関係及び、体内環境に戻した後への影響を探るため、siRNA 導入後、24 時間と 96 時間の培養期間条件の差をつけて仮親マウスに移植し、着床率と胎生 18.5 日生存率を評価した。その結果、長時間培養 *Sirt3* ノックダウン群のみ有意に着床と生存率が低下した。すなわち、培養時における *Sirt3* の働きは、個体形成に至る胚発生の維持に重要であることが示唆された。

12. *Sirt3* ノックダウン胚、*Sirt3* ノックアウト胚、過酸化水素処理胚において *p53* およびその下流遺伝子 *p21* の誘導、及び *p53* により転写の抑制を受けることが報告されている *Nanog* の *p21* に相反した遺伝子発現が Western blotting 法または RT-PCR 法により認められた。さらに、ノックダウン胚を NAC 処理することにより、*p21* の誘導および *Nanog* の抑制が解除された。これらの結果から、*Sirt3* ノックダウン胚の胚発生停止には細胞内 ROS に誘導された *p53* シグナル経路が関与している、という示唆を得た。本実験の RT-PCR 法によって得られた結果を、定量的に評価し結果の精度を高める必要がある。

13. *Sirt3* と同時に *p53* を siRNA で抑制することにより胚盤胞形成率が著明に改善したことから、*Sirt3* ノックダウンによる胚発生の停止や遅延は、誘導された *p53* シグナル経路を介したものであることが明らかとなった。

以上、本論文では *Sirt3* が体外受精や培養に伴うストレス環境下において、正常な初期発生を進行させるために防御的に機能すること、*p53* シグナル経路が *Sirt3* のノックダウンや欠損により生じる胚発生遅延や停止を生じるメカニズムにおいて中心的な役割を果たしていることを明らかにした。

本研究結果は、生殖細胞や初期発生においてこれまで未知に等しかった **Sirtuin** の役割の解明及び、ミトコンドリア機能やエネルギー代謝の調節機構が複雑に関連する初期胚発生のメカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。