HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on epigenetic reprogramming of germ cells in mice [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	青島, 圭佑
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第6981号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62071
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Keisuke_Aoshima_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：青　島　圭　佑

審査委員	主査　教授	木　村　享　史
	副査　教授	澤　　洋　文
	副査　教授	堀　内　基　広
	副査　准教授	市　居　　修

学位論文題名

Studies on epigenetic reprogramming of germ cells in mice

(マウス生殖細胞におけるエピジェネティックリプログラミングに関する研究)

リプログラミングとは DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティック修飾が大きく変化することにより，一度分化した細胞が未分化状態に戻る機構である。自然界では受精直後の受精卵や始原生殖細胞において，人工的には未受精卵への核移植や転写因子の遺伝子導入により引き起こされる。リプログラミングは人工的にも現象としては再現できるものの，その効率は自然界のものに比べて著しく低く，両者の分子機構の違いも明らかではない。リプログラミングの分子機構の解明は分子生物学や発生学といった基礎生命科学に新規の知見をもたらすだけでなく，リプログラミング効率の向上を可能にし，再生医療の発展をより一層推し進めることができる。そこで本研究では，生殖細胞に生じるリプログラミングに着目し，その分子機構を明らかにすることを目的とし，研究を行った。

第一章では受精直後の受精卵前核期に生じるリプログラミングにおけるヒストン修飾の役割を調べた。前核期では特に雄性前核においてヒストン修飾が大きく変化することが知られているが，どのヒストン修飾が初期胚発生に最も重要であるかはわかっていない。本研究では転写に重要なヒストンメチル化修飾 (H3.3K4, K9, K27, K36) に焦点を絞り，それぞれのリジン残基をメチオニン残基に変換した変異体を用いて当該部位の内在性メチル化修飾を消去することで，前核期におけるヒストンメチル化修飾の役割を調べた。その結果，雄性前核における H3K4 メチル化が minor zygotic gene activation (minor ZGA) とその後の初期胚発生に必須であることがわかった。更に，H3K4 メチル化酵素のうち，

Mixed lineage leukemia 3/4 (*Mll3/4*) をノックダウンした時に H3K4 メチル化修飾を消去した場合と同様の結果が認められた。以上の結果から，マウス受精卵前核期に生じるリプログラミングにおいて，雄性前核において MLL3/4 により成立すると思われる H3K4 メチル化が雄性前核の minor ZGA の開始と初期胚発生に必須であることがわかった。

第二章では精原幹細胞 (spermatogonial stem cells: SSCs) の効率的な培養方法の開発を目的として Knockout Serum Replacement (KSR) と マウス胎仔線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast) の有用性を調べた。従来の培養法ではウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA) の添加が必須であったが，動物由来の BSA はロット間や製造者間でのばらつきがあり，再現性のある培養条件を保つことが難しかった。近年，血清代替産物である KSR を用いることで血清やサイトカインを用いずに精巣の臓器培養が可能であることが報告された。そこで，KSR が BSA の代替物として SSCs の培養にも適用できるかどうかを調べた。その結果，KSR を添加すると BSA 非添加の条件でも SSCs は高い増殖活性を示し，ヌードマウスへの移植実験においても幹細胞性を保持していることが確認されたため，KSR が BSA の代替物として利用可能であることがわかった。また，BSA を KSR と同時に添加することで，SSCs は BSA 非添加条件と比べて高い増殖活性を示した。更に従来の培養法では glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)，GDNF family receptor alpha 1，fibroblast growth factor 2 の添加が必要であったが， GDNF のみで SSCs の培養が可能となり，必要な GDNF 量も 20 ng/ml から 5 ng/ml まで減らすことができた。これまでの培養法では DBA/2 マウス由来の SSCs しか培養できなかったが, KSR と BSA を添加した条件下では ICR マウスと C57BL/6 マウス由来の SSCs も培養可能となった。以上から, KSR を添加することで SSCs の培養がより効率的になり, 様々なマウス由来の SSCs を用いた研究を行うことが可能となった。

本研究によりマウス受精卵前核期リプログラミング機構の一端が解明されるとともに，マウス SSCs の効率的な培養が可能となった。本研究の知見はマウス生殖細胞におけるリプログラミング機構の解明に貢献するものであり，人為的リプログラミングの更なる効率化にも資することが期待される。

よって，審査委員一同は，上記学位論文提出者青島圭佑氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。