要約

報告番号  甲乙第7号
氏名  山田朝子

主論文題名

Age-associated telomere shortening in mouse oocytes
（マウス卵子における加齢によるテロメア長短縮とテロメラーゼ活性の変化）

（内容の要旨）

母体加齢に伴う妊娠性の低下は卵子の「質」の低下が主たる要因とされ、背景に酸化ストレスの関与が示唆されているものの、分子生物学的メカニズムは解明されていない。先行研究では若齢マウスおよび加齢マウス由来の卵子を比較した網羅的発現解析の結果、テロメアの伸長・維持に働くテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子（telomere reverse transcriptase：Tert）の発現低下が報告されている。そこで母体加齢卵子におけるTertの発現とテロメラーゼ酵素活性、酸化ストレスおよびテロメアの動態を明らかにすることを目的とした。一方、排卵後に一定時間が経過した卵子は、母体加齢と同様に受精能や胚発生能の低下を示すことが知られている（排卵後加齢）。そこで排卵後加齢卵子についても同様に検討を加えた。

定量的リアルタイム逆転写PCR（quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction：qPCR）法を用いてTert mRNA発現量を測定した結果、母体加齢卵子（0.65 ± 0.09）および排卵後加齢卵子（in vivo: 0.16 ± 0.01, in vitro: 0.24 ± 0.04）のいずれも若齢卵子（1.00 ± 0.07）と比較して有意に減少した（p<0.05）。免疫染色によりTERTタンパク発現を観察し蛍光強度を比較した結果、母体加齢卵子（0.68 ± 0.03）は若齢マウス卵子（1.00 ± 0.04）と比較して有意に低下した（p<0.05）、排卵後加齢卵子は明確な変化を示さなかった。テロメアリピート増幅プロトコル法を用いてテロメラーゼ酵素活性を測定したところ、母体加齢卵子（0.51 ± 0.08）は若齢卵子（1.00 ± 0.12）と比較して有意に低下（p<0.05）したが、排卵後加齢卵子（in vivo: 0.67 ± 0.06, in vitro: 0.90 ± 0.18）は有意な変化を示さなかった。ジハイドロエチジウム染色法を用いて卵子における酸化ストレスを計測したところ、母体加齢および排卵後加齢卵子は若齢卵子と比較して有意な酸化ストレスの上昇を認めた（p<0.05）。ゲノムqPCR法を用いて卵子20個あたりの平均テロメア長を計測した結果、母体加齢卵子（0.80 ± 0.05）は若齢卵子（1.00 ± 0.05）と比較し有意なテロメア長の短縮を認めた（p<0.05）。

一方、排卵後加齢卵子は有意な変化を認めなかった。さらに個々の卵子のテロメア長を測定するためにQuantitative Fluorescent in situ hybridization (Q-FISH)法を行ったところ、Q-FISH法においても同様の結果を示した。

以上より、母体加齢卵子はTertの発現・活性の低下および酸化ストレスに長期間暴露されることがテロメア長の短縮に寄与することが示唆された。