



Title	マウス初期胚発生においてミトコンドリアの形態的リモデリングが果たす意義 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	林, 芳弘
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第15768号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/92647
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	HAYASHI_Yoshihiro_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(農学) 氏名 林 芳 弘

審査担当者 主査 准教授 川原 学
副査 教授 上田 宏一郎
副査 教授 小池 聡
副査 助教 唄 花子
副査 教授 高橋 昌志 (国際食資源学院)

学位論文題名

マウス初期胚発生においてミトコンドリアの形態的リモデリングが果たす意義

本論文は5章からなり、図30、表5、文献140を含む頁数99の和文論文であり、別に参考文献1編が添えられている。

細胞機能において多様な役割を果たすミトコンドリアは、細胞の分化状態に伴って著しく形態変化することが知られている。初期胚などの未分化細胞のミトコンドリアでは、全体が球状でクリステ構造が未発達である一方、分化した体細胞のミトコンドリアでは、形状が伸長しクリステ構造が発達している。このようなミトコンドリアの形態変化は、初期胚発生中においても進行する。しかしながら、ミトコンドリアの形態的リモデリングが初期胚発生において果たす意義については調べられていない。本研究では、体細胞由来の成熟したミトコンドリアを、未成熟ミトコンドリアを保持した初期胚へ導入した体細胞ミトコンドリア導入胚 (SM胚) を作製し解析することで、ミトコンドリアの形態的リモデリングが初期胚発生において果たす意義を明らかにすることを試みた。

(1) 体細胞ミトコンドリアの導入が初期胚発生率およびアポトーシス誘導に及ぼす影響

成熟ミトコンドリアの導入が初期胚発生率に及ぼす影響を明らかにするために、SM胚の体外発生率が調べられた。実験の結果、通常の外受精胚と比較して、2細胞期および胚盤胞期までのSM胚の発生率は有意に低下していた ($P < 0.01$)。さらに、卵割したSM胚の約90%が2細胞期で胚発生を停止することも突き止められた。また、SM胚ではアポトーシス発動を促すシトクロムCを細胞質に放出するミトコンドリアが観察された。

(2) 体細胞ミトコンドリアの導入が胚性遺伝子活性化に及ぼす影響

SM胚における2細胞期発生停止の原因についてさらに詳しく調べるため、RNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析を実施し、発生進行に不可欠な胚性遺伝子活性化 (zygotic gene activation; ZGA) に関与する遺伝子群の発現レベルが調べられた。一般にZGAは2段階で進行し、minor ZGAと呼ばれる小規模な胚性遺伝子の活性化の後、minor ZGA遺伝子群の発現

低下に伴い major ZGA と呼ばれる大規模な胚性遺伝子の活性化がみられる。解析の結果、SM 胚では minor ZGA 遺伝子群の発現レベルが高い状態で維持されていることが示された。その一方で、major ZGA 遺伝子群の発現レベルは抑制されていることが示された。さらに、代表的なエピジェネティック修飾の一つであるヒストン修飾状態について免疫染色により調べられた。その結果、SM 胚では転写抑制の指標となる H3K4me3 の蛍光シグナル強度が有意に高く ($P < 0.01$)、転写活性化を示す H3K27ac の蛍光シグナル強度が有意に低かった ($P < 0.01$)。以上より、SM 胚では、ヒストン修飾状態のかく乱を伴う ZGA の破綻が起きていることが明らかになった。

(3) 体細胞ミトコンドリアの導入がヒストン修飾酵素および代謝産物に及ぼす影響

SM 胚におけるヒストン修飾状態のかく乱の原因を探るべく、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) 依存性脱アセチル化酵素 Sirt1 のタンパク質発現レベルが免疫染色により調べられた。その結果、SM 胚の Sirt1 の蛍光シグナル強度は、通常体外受精胚と比較して有意に低下していた ($P < 0.01$)。続いて、Sirt1 の活性化およびタンパク質発現に必要な代謝産物 NAD⁺ について分析した。SM 胚における NAD⁺/NADH 比は、通常体外受精胚と比較して有意に減少していた ($P < 0.05$)。さらに、代謝全般に関わるミトコンドリア膜電位 (MMP) について測定用蛍光プローブ (JC-10) を用いて調べたところ、SM 胚の MMP 活性が低下していることが確かめられた。以上の実験結果を通じて、SM 胚では、MMP が低下したことで NAD⁺ などの代謝産物が減少し、ヒストンの修飾状態が変化したことで ZGA の進行が妨げられた可能性が示された。

本研究をまとめると、体細胞ミトコンドリアの混在により MMP の低下とそれに伴う代謝物産生量の低下、それに付随してヒストン修飾状態が変化したことから ZGA の進行が妨げられ、結果として 2 細胞期における発生停止が引き起こされたことが示唆された。これらの結果は、初期胚が胚自身の遺伝子を起動させて発生を進行させていくためには、ミトコンドリアの形態が初期胚特有の未成熟型に統一されていることが不可欠であることを示している。本研究は、初期胚発生における遺伝子発現調節とミトコンドリア形態的リモデリングの関連を初めて明らかにしたものであり、遺伝学および繁殖学の両見地からこれまでにない新しい発見であると評価できる。これらの研究成果は、正確な発生プログラムの進行に則った初期胚発生が求められる家畜受精卵移植による動物生産および生殖補助医療の両分野の発展を支える基礎的な知見を与えるものである。

よって、審査員一同は、林芳弘氏が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。