



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	体内および体外に由来するマウス胚盤胞期胚のミトコンドリア微細構造における相違
Author(s)	林, 芳弘; Hayashi, Yoshihiro; 江連, 泰知 他
Citation	北海道大学大学院農学研究院邦文紀要, 39, 1-6
Issue Date	2023-02-13
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88075
Type	departmental bulletin paper
File Information	01_hayashi_39.pdf



体内および体外に由来するマウス胚盤胞期胚の ミトコンドリア微細構造における相違

林 芳 弘*・江 連 泰 知**・唄 花 子***
高 橋 昌 志****・川 原 学****

(*北海道大学大学院農学院, **北海道大学農学部, ***北海道大学大学院農学研究院,
****北海道大学大学院国際食資源学院)

Differences in Mitochondrial Ultrastructure between In Vivo and In Vitro Mouse Blastocysts

Yoshihiro HAYASHI*, Taichi EDURE**, Hanako BAI***, Masashi TAKAHASHI**** and Manabu KAWAHARA***

(*Graduate School of Agriculture, Hokkaido University,

**School of Agriculture, Hokkaido University,

***Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University,

****Global Station for Food, Land and Water Resources, Global Institution for Collaborative Research and Education)

I. 背 景

家畜生産の現場では、体外受精により作出した受精卵を胚盤胞期胚という発生ステージまで体外培養した後、胚を子宮へ移植する繁殖技術が活用されている。例えば、乳牛を代理母として個体価格の高い和牛胚を移植して、乳生産と肉牛生産を行う方法が一般的に実施され、国内において胚移植の実施件数は年々増加している。一方で、体外生産胚 (*in vitro* 胚) は体内発生胚 (*in vivo* 胚) と比べて発生率が低いこと^[1]や、*in vitro* 胚におけるエピジェネティックな遺伝子変化^[2]、代謝プロファイルの変化^[3]が生じることが知られており、より *in vivo* 胚に近い *in vitro* 胚の作出系の開発が期待されている。しかし、*in vivo* 胚と *in vitro* 胚間での細胞生物学的な相違については詳しく分析されていない。そこで本研究では、*in vivo* 胚と *in vitro* 胚の細胞生物学的な違いを探るべく、細胞代謝に重要な役割を果たす細胞小器官であるミトコンドリアに着目した。

ミトコンドリアは細胞のエネルギー合成やアポトーシス経路の上流として働く細胞小器官であり、細胞の機能維持に必須となる。ミトコン

ドリアは正常な発生に必要不可欠であり、着床前でのミトコンドリアの機能の破綻は胎子胎盤の成長を妨げる^[4]。

ウシの *in vitro* 胚は *in vivo* 胚と比較してミトコンドリア DNA のコピー数が多くなることが知られており、ミトコンドリア DNA コピー数の増加が発生率減少の一要因である可能性が報告された^[5]。ヒト胚においても胚盤胞期胚においてミトコンドリア DNA のコピー数が異常に多い胚は着床率の低下に繋がることや^[6]、異数性胚の増加に繋がること報告されている^[6,7]。これらの知見は、初期胚においてミトコンドリアが正常に駆動することがその後の正常な発生に重要であることを示している。しかしながら、ミトコンドリア DNA コピー数だけではミトコンドリアの機能や細胞の代謝状態を類推することはできない。そこで、ミトコンドリアの微細構造に着目し形態学的な相違を明らかにすることとした。

ミトコンドリアの形態は細胞の分化状態や代謝状態によって動的に変化し、それぞれの細胞に適した機能を果たす^[8]。そのため、細胞の代謝状態やミトコンドリアの機能を理解するうえでミトコンドリアの形態を調べることは非常に

重要となる。本研究では、*in vivo* 胚と *in vitro* 胚間における違いを明らかにするため、実験動物であるマウスを用いて着床直前の胚盤胞期におけるミトコンドリアの微細構造を解析した。

II. 方 法

A. マウス胚盤胞期胚の作製

a. 供試動物

本研究では8から12週齢のICRマウス(Sankyo, Tokyo, Japan)を実験に供した。すべての動物実験は「北海道大学における動物実験に関する指針」に従って行った。

b. *In vivo* 胚盤胞期胚の回収

性成熟したICR雌マウスと性成熟したICR雄マウスを同居させることで交配し、同居した日の夜0時を0日としたときの3.5日後(E3.5)に雌マウスを安楽死させ、子宮より胚盤胞期胚を回収した。

c. *In vitro* 胚盤胞期胚の作出

マウスの体外受精、体外培養は先行研究と同様に実施した^[9]。性成熟したICR雌マウスに7.5 IU (international units) の Equine chorionic gonadotropin (ASKA Pharmaceutical, Tokyo, Japan) を腹腔内注射し、その48時間後に7.5 IU の Human chorionic gonadotropin (hCG; ASKA Pharmaceutical) を同様に投与することで過剰排卵処理を行った。hCG 投与16時間後に卵管から卵丘細胞-卵子複合体(COCs)を採取し、HTF培地に移動し、体外受精に供試した。性成熟した雄マウスより採取した精子を前培養したあと、COCsを移したHTF培地中に前培養精子を加え、37℃、5% CO₂、湿度100%の条件下で6時間培養した。その後、卵子をM16培地に移し、体外培養開始時を0日としたときの3.5日後(E3.5)まで37℃、5% CO₂、湿度100%の条件下で培養した。

B. 透過型電子顕微鏡観察

E3.5 胚盤胞期胚は2.5%グルタルアルデヒド固定液(TAAB Laboratories, Reading, UK)を用いて、4℃で2時間前固定した。その後0.2%ポリビニルアルコールを添加した0.1 M リン酸バッファーで3回洗浄した後、1%オスミウム酸溶液(Nisshin EM, Tokyo, Japan)を

用いて4℃で2時間後固定した。0.1 M リン酸バッファーで3回洗浄した後、0.2%ゲルに胚を包埋した。ゲル包埋した胚は、エタノールシリーズで脱水した後、プロピレンオキサイド(Nisshin EM)でエタノールを除去し、エポキシ樹脂(TAAB Laboratories, Reading)に包埋した。ウルトラミクロトーム(ULTRACUTN, Reichert-Nissei, Buffalo, NY, USA)で80 nm の超薄切片を作製し、2%酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電子染色し、透過型電子顕微鏡(JEM-2100, JEOL Tokyo, Japan)で観察した。*In vivo* 胚および *in vitro* 胚どちらも3胚ずつ観察した。

C. Image J による解析

In vivo 胚1,101個のミトコンドリアと、*in vitro* 胚1,001個のミトコンドリアの画像を解析に供した。ミトコンドリアの長径、短径、面積、および電子密度は、画像解析ソフト Image J (National Institutes of Health, <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>)を用いて決定した。ミトコンドリアの球形度は先行研究^[10]と同様、次の式を用いて決定した。

$$\text{球形度} = \frac{a-b}{a}$$

a: 長径, b: 短径

電子密度は、白が0、黒が255となるように設定して計測した。球形度、長径、面積、電子密度は、いずれもスチューデントの *t* 検定を用いて解析した。すべての解析には、解析ソフト R (Comprehensive R Archive Network) を用いた。

III. 結 果

マウス胚盤胞期胚の *in vivo* 胚と *in vitro* 胚におけるミトコンドリアの電子顕微鏡像は図1のようになった。*In vivo* 胚と比べて *in vitro* 胚ではミトコンドリアの電子密度を表す明度の上昇が観察された。また、*in vivo* 胚においては、*in vitro* 胚よりも大きなミトコンドリアが多数観察された。

次に、電子顕微鏡により撮影したミトコンドリア像を Image J を用いて分析した。まず、球形度を計測することで、ミトコンドリアの形状

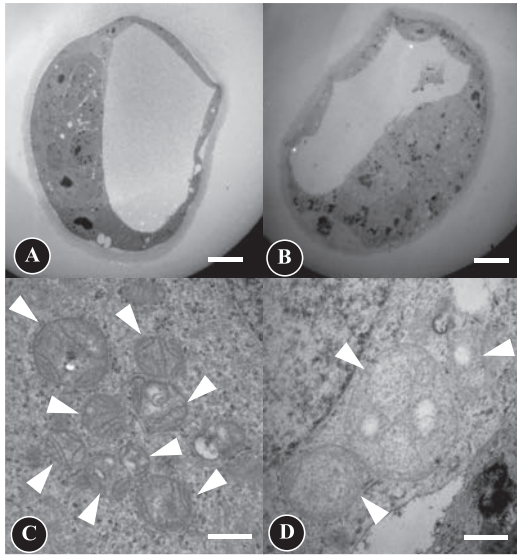


図1 *In vivo* 胚盤胞期胚と *in vitro* 胚盤胞期胚の代表的なミトコンドリアの透過型電子顕微鏡像。

(A) *In vivo* 胚盤胞期胚の全体像。Bar=10 μ m。
(B) *In vitro* 胚盤胞期胚の全体像。Bar=10 μ m。
(C) *In vivo* 胚盤胞期胚における代表的なミトコンドリアの透過型電子顕微鏡像。Bar=500 nm。(D) *In vitro* 胚盤胞期胚における代表的なミトコンドリアの透過型電子顕微鏡像。Bar=500 nm。矢尻：ミトコンドリア

を評価した(図2A)。球形度に有意な差はみられなかった。

さらに、ミトコンドリアの大きさを評価すべくミトコンドリアの面積と長径を比較した。*In vitro* 胚の面積値が *in vivo* 胚に比較して有意に大きくなっており(図2B, $p<0.01$)、長径についても *in vitro* 胚が有意に長くなっていた(図2C, $p<0.01$)。

最後に、ミトコンドリアの電子密度を比較した。ミトコンドリアは色調が暗くなり電子密度が高くなると膜電位が高まることが知られている^[11]。分析の結果、*in vitro* 胚のミトコンドリアの電子密度は有意に低下していた(図2D, $p<0.01$)。このことから、*in vitro* 胚は *in vivo* 胚に比べて、ミトコンドリアの機能が低下していることが推測された。

IV. 考 察

本研究結果より *in vitro* で培養したマウス胚

盤胞期胚のミトコンドリアは、*in vivo* 胚に比べてミトコンドリアが大きくなり、ミトコンドリアの機能が低下していることが示唆された。これは蛍光プローブを用いて *in vivo* 胚盤胞期胚と *in vitro* 胚盤胞期胚のミトコンドリアの膜電位を計測した過去の知見と一致する^[12]。ミトコンドリアの機能低下は、アポトーシスの主要因である酸化ストレスの増加を引き起こす^[13,14]。アポトーシスが生じる際、ミトコンドリアは膜電位の低下と体積の膨張が生じる^[15]。*In vitro* 胚は *in vivo* 胚と比べて酸化ストレスが増加し、アポトーシスが生じる胚の割合が増加するという報告もあり^[16]、*in vitro* 胚における発生率低下は、ミトコンドリアの機能低下と体積膨張の結果、アポトーシスが誘発されたのかもしれない。

In vitro 胚におけるミトコンドリアの機能低下を示す形態的特徴は、通常酸素濃度である20%で体外培養したことが原因かもしれない。一般に、初期胚は母体内で2-5%酸素という低酸素環境で成長する^[17]。低酸素環境では低酸素誘導タンパク質 Hif-1 α が活性化され、ミトコンドリアの機能を活性化し、酸化ストレスを抑制する^[18]。過去の研究において、低酸素条件下の体外培養におけるマウス胚では、ミトコンドリアの膜電位の上昇や^[12,19]、抗酸化関連遺伝子の発現増加が引き起こされることが知られている^[19]。そのため、本研究で用いた *in vitro* 胚におけるミトコンドリア機能低下は、20%酸素濃度の環境下における Hif-1 α の活性低下により引き起こされた可能性があると考えられる。

以上より本研究では、透過型電子顕微鏡を用いた解析により、*in vivo* 胚と *in vitro* 胚では、ミトコンドリアの微細構造が異なっていることが判明した。これらの形態学的な差異が、ミトコンドリアの機能的差異と結びついている可能性があり、今後マウス胚のみならずウシを含む家畜胚における分析に展開することで、より体内由来胚に近い哺乳類胚の体外作出系開発に寄与できるかもしれない。

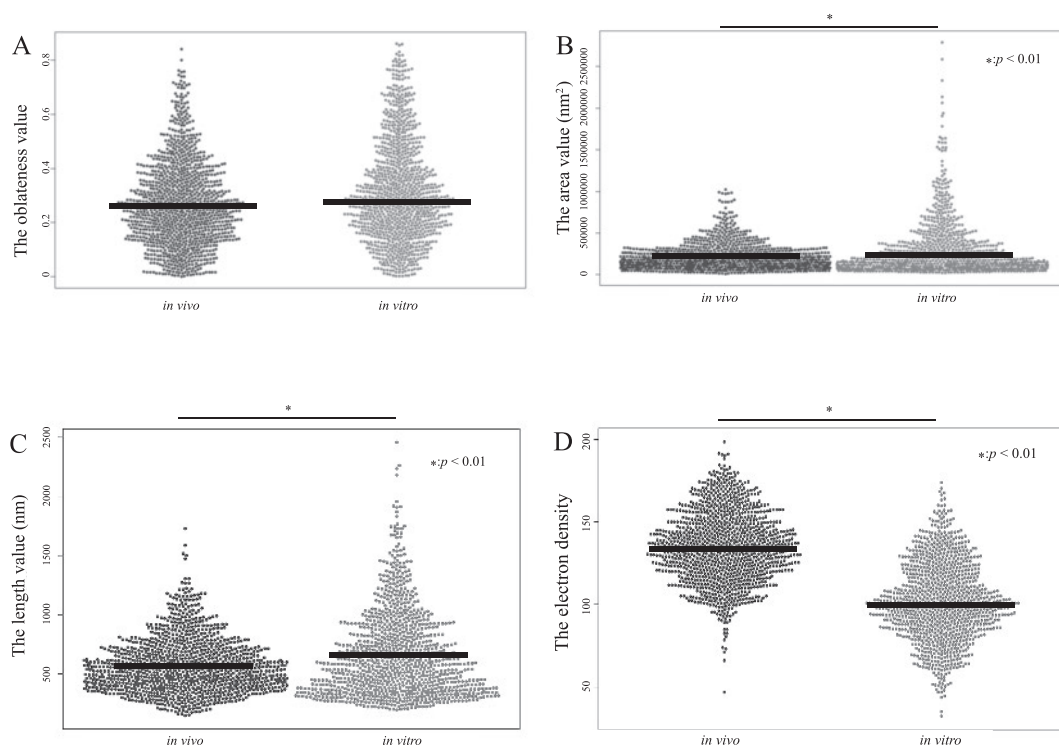


図2 *In vivo* 胚盤胞期胚と *in vitro* 胚盤胞期胚におけるミトコンドリアの Image J による解析結果。(A) 球形度の解析結果。黒線：平均値；*in vivo*：0.268072, *in vitro*：0.318302 (B) 面積の解析結果。黒線：平均値；*in vivo*：208757.9 nm², *in vitro*：276764.3 nm² (C) 長径の解析結果。黒線：平均値；*in vivo*：576.8027 nm, *in vitro*：664.4206 nm (D) 電子密度の解析結果。黒線：平均値；*in vivo*：135.4246, *in vitro*：102.4878

参考文献

- [1] Barnwell CV, Farin PW, Whisnant CS, Alexander JE, Farin CE. Maternal serum progesterone concentration and early conceptus development of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Domest Anim Endocrinol* 2015; 52: 75–81.
- [2] Urrego R, Rodriguez-Orsorio N, Niemann H. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of assisted reproductive technologies in domestic cattle. *Epigenetics* 2014; 9: 803–815.
- [3] Khurana NK, Niemann H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. *Biol Reprod* 2000; 62: 847–856.
- [4] Wakefield SL, Lane M, Mitchell M. Impaired mitochondrial function in the preimplantation embryo perturbs fetal and placental development in the mouse. *Biol Reprod* 2011; 84: 572–580.
- [5] Noguchi T, Aizawa T, Munakata Y, Iwata H. Comparison of gene expression and mitochondria number between bovine blastocysts obtained *in vitro* and *in vivo*. *J Reprod Dev* 2020; 66: 35–39.
- [6] Klimczak AM, Pacheco LE, Lewis KE, Massahi N, Richards JP, Kearns WG, Saad AF, Crochet JR. Embryonal mitochondrial DNA: relationship to embryo quality and transfer outcomes. *J Assist Reprod Genet.* 2018; 35: 871–877.
- [7] de los Santos MJ, Diez Juan A, Mifsud A, Mercader A, Meseguer M, Rubio C, Pellicer A. Variables associated with

- mitochondrial copy number in human blastocysts: what can we learn from trophectoderm biopsies? *Fertil Steril* 2018; 109: 110–117.
- [8] Wanet A, Arnould T, Najimi M, Renard P. Connecting Mitochondria, Metabolism, and Stem Cell Fate. *Stem Cells Dev* 2015; 24: 1957–1971.
- [9] Yamazaki W, Amano T, Bai H, Takahashi M, Kawahara M. The influence of polyploidy and genome composition on genomic imprinting in mice. *J Biol Chem* 2016; 291: 20924–20931.
- [10] Hayashi Y, Saito S, Bai H, Takahashi M, Kawahara M. Mitochondrial maturation in the trophectoderm and inner cell mass regions of bovine blastocysts. *Theriogenology* 2021; 175: 69–76.
- [11] Gualtieri R, Iaccarino M, Mollo V, Prisco M, Iaccarino S, Talevi R. Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status. *Fertil Steril* 2009; 91: 1023–1034.
- [12] Belli M, Zhang L, Liu X, Donjacour A, Ruggeri E, Palmerini MG, Nottola SA, MacChiarelli G, Rinaudo P. Oxygen concentration alters mitochondrial structure and function in in vitro fertilized preimplantation mouse embryos. *Hum Reprod* 2019; 34: 601–611.
- [13] Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev* 2014; 94: 909–950.
- [14] Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res* 2016; 1863: 2977–2992.
- [15] Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-x (L) regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997; 91: 627–637.
- [16] Ren L, Wang Z, An L, Zhang Z, Tan K, Miao K, Tao L, Cheng L, Zhang Z, Yang M, Wu Z, Tian J. Dynamic comparisons of highresolution expression profiles highlighting mitochondria-related genes between in vivo and in vitro fertilized early mouse embryos. *Hum Reprod* 2015; 30: 2892–2911.
- [17] Ciray HN, Aksoy T, Yaramanci K, Karayaka I, Bahceci M. In vitro culture under physiologic oxygen concentration improves blastocyst yield and quality: a prospective randomized survey on sibling oocytes. *Fertil Steril* 2009; 91: 1459–1461.
- [18] Li HS, Zhou YN, Li L, Li SF, Long D, Chen XL, Zhang JB, Feng L, Li YP. HIF-1 α protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria. *Redox Biol* 2019; 25: 101109.
- [19] Ma YY, Chen HW, Tzeng CR. Low oxygen tension increases mitochondrial membrane potential and enhances expression of antioxidant genes and implantation protein of mouse blastocyst cultured in vitro. *J Ovarian Res* 2017; 10: 1–11.

Summary

Embryo transfer is a widespread assisted reproductive technique for the production of livestock. In general, the blastocyst-stage embryos used for transfer are produced *in vivo* or *in vitro*. However, little is known about differences in mitochondrial ultrastructure between *in vivo* and *in vitro* blastocysts in mammals. This study aimed to compare the mitochondrial ultrastructure between *in vivo* and *in vitro* mouse blastocysts using transmission electron microscopy (TEM). TEM analyses were performed using more than 1,000 mitochondria from blastocyst embryos. No significant difference was observed in mitochondrial

roundness. However, the average major axes (nm) and areas (nm²) were significantly greater in the *in vitro* embryos than in the *in vivo* embryos ($p < 0.01$). Furthermore, the average electron density was significantly decreased in the *in vitro* embryos compared to the *in vivo* embryos ($p < 0.01$). Taken together, we conclude that mitochondria in *in vitro* blastocysts show an increase in size and a decrease in electron density compared with those in *in vivo* blastocysts. This implies that mitochondrial functions are deteriorated in *in vitro* blastocysts compared to *in vivo* blastocysts.