



HOKKAIDO UNIVERSITY

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
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15768号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92647
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	HAYASHI_Yoshihiro_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名 林 芳弘

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

背景と目的

細胞小器官の一つであるミトコンドリアは、細胞内のエネルギー合成や細胞死の誘導など細胞機能において中心的な役割を果たす。ミトコンドリアは、細胞の分化状態の変化に伴って著しく形態変化する。初期胚などの未分化細胞のミトコンドリアは、全体が球状でエネルギー合成の場であるクリステと呼ばれる構造も未発達である一方、分化した体細胞のミトコンドリアは、伸長しクリステも発達している。これらの形態変化は、ミトコンドリアの成熟と呼ばれる。生殖細胞が形成される際、成熟したミトコンドリアは、生殖細胞内で未成熟型へとリモデリングされ、初期胚発生間において分化状態に併せて再度成熟していく。しかしながら、細胞内のミトコンドリア成熟に伴う形態的リモデリングが、初期胚発生において果たす役割については調べられていない。そこで本研究では、体細胞由来の成熟ミトコンドリアを、未成熟ミトコンドリアを持つ初期胚へと導入した体細胞ミトコンドリア導入胚 (SM 胚) を作製し、ミトコンドリアの成熟度が不均一な SM 胚の解析を通して、ミトコンドリア成熟に伴う形態的リモデリングが初期胚発生において果たす役割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

まず、成熟ミトコンドリア導入が初期胚発生に及ぼす影響を明らかにするために、体細胞由来の成熟ミトコンドリアを体外受精胚に導入し、体外発生率を調べた。体細胞ミトコンドリアを導入した SM 胚の体外発生率を、通常の体外受精胚と比較したところ、2 細胞期、胚盤胞期までの発生率が有意に低下した ($P < 0.01$)。また、SM 胚では卵割し、2 細胞期に至った胚の約 90% が 2 細胞期で胚発生を停止した ($P < 0.01$)。次に、発生停止の原因を調べるために、細胞死の一種であるアポトーシスの上流因子の活性状態について調べた。アポトーシスの誘導は、ミトコンドリア内部に蓄えられたヘムタンパク質の一種であるシトクロム C の細胞質への放出が Caspase 経路を活性化することによって引き起こされる。透過型電子顕微鏡により SM 胚の超微細構造を観察したところ、シトクロム C 放出を示す空胞化ミトコンドリアが観察された。さらに、免疫電子顕微鏡により SM 胚におけるミトコンドリアの外部にシトクロム C が観察された。最後に、活性化 Caspase を検出する蛍光プローブ (Cell Event Caspase 3/7) により、SM 胚における Caspase 経路の活性化を確認した。以上の結果から、SM 胚におけるアポトーシス経路の活性化が 2 細胞期発生停止の一つの原因であることが示唆された。

(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

本項では、SM 胚における 2 細胞期発生停止の原因についてさらに調べるために、RNA-Seq による網羅的遺伝子発現解析を実施した。解析では特に胚性遺伝子活性化 (zygotic gene activation; ZGA) に関与する遺伝子群の発現に注目した。なぜなら、マウス 2 細胞期胚では ZGA と呼ばれる胚性遺伝子の転写が開始され、この ZGA の破綻はアポトーシスを伴う 2 細胞期発生停止を引き起こすからである。一般に ZGA は 2 段階で構成される。まず、1 細胞期 S 期に minor ZGA と呼ばれる小規模な胚性遺伝子の活性化が生じ、2 細胞期中後期以降に minor ZGA 遺伝子群の発現低下と共に 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、2 細胞期後期における minor ZGA 遺伝子群の発現レベルが、対照となる通常体外受精胚に比較して高い状態で維持されていた。その一方で、major ZGA 遺伝子群の発現レベルは抑制されていた。加えて、定量 PCR でも同様の結果が確かめられたことから、SM 胚

では minor ZGA が終結することなく major ZGA の開始が阻害されていることが判明した。

続いて、SM 胚における ZGA 破綻の原因を突き止めるために、ヒストン修飾状態を調べた。ヒストン修飾とは、クロマチン構造変化を引き起こすエピジェネティック修飾の一種であり、ZGA を含む転写制御の根幹を担う。対照となる通常体外受精胚の H3K4me3 および H3K27ac を免疫染色により調べたところ、major ZGA が生じている 2 細胞期後期において、転写抑制の指標となる H3K4me3 は微弱な蛍光シグナルしか観察されなかったのに対し、転写活性化を示す H3K27ac では強い蛍光シグナルが観察された。一方、H3K4me3 の蛍光シグナル強度を画像解析に供したところ、SM 胚では通常体外受精胚と比較して有意に高く ($P < 0.01$)、H3K27ac の蛍光シグナル強度は有意に低かった ($P < 0.01$)。以上より、SM 胚では、ヒストン修飾状態のかく乱が原因で minor ZGA から major ZGA への移行が阻害されていることが示唆された。

(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

次に、SM 胚でみられた、通常体外受精胚とは異なるヒストン修飾状態を示した原因を探るべく、NAD⁺依存性脱アセチル化酵素 Sirt1 の発現レベルを調べた。なぜなら、Sirt1 による脱アセチル化は時期特異的な minor ZGA 遺伝子発現の抑制を行うヒストン修飾酵素だからである。免疫染色により SM 胚の Sirt1 の蛍光シグナル強度を調べたところ、通常体外受精胚と比較して有意に低かった ($P < 0.01$)。このことから、SM 胚では ZGA 制御に関わるヒストン修飾酵素 Sirt1 の発現レベルが減少していることが示唆された。

さらに、SM 胚における代謝物について調べた。まず、ミトコンドリアにおける代謝の過程でアセチル基を供与するアセチル CoA について、細胞内在性アセチル CoA 測定用蛍光プローブ (RH-NH₂) を用いて調べた。その結果、SM 胚のアセチル CoA 量は、通常体外受精胚と比較して有意に減少していた ($P < 0.05$)。続いて、Sirt1 の活性化に必要な代謝物である NAD⁺に着目した。NAD⁺は、還元状態の NADH との比率が重要となる。そこで、SM 胚における NAD⁺と NADH の比率を調べたところ、通常体外受精胚と比較して NAD⁺/NADH 比が有意に減少していた ($P < 0.05$)。

アセチル CoA や NAD⁺の適切な合成量が維持されるためには、ミトコンドリアの適切な代謝活性が必要となる。そこで、ミトコンドリア代謝活性の指標であ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。実験の結果、通常体外受精胚に比べて SM 胚では MMP を示す蛍光強度が有意に低下していた ($P < 0.05$)。以上の結果から、SM 胚では、ミトコンドリア代謝活性が低下した結果として、アセチル CoA や NAD⁺などの代謝物の減少が生じ、ヒストンの修飾状態がかく乱したことで ZGA の調節が破綻したものと推察された。

結論

本研究では、ミトコンドリア成熟に伴う形態的リモデリングが初期胚発生において果たす役割について調べるために、体外受精胚に体細胞ミトコンドリアを導入した SM 胚の体外発生について調べた。その結果、SM 胚ではミトコンドリアの代謝活性の低下とそれに伴う代謝物産生量の低下、さらには遺伝子発現活性化に重要なヒストン修飾状態の調節破綻がみられ、胚性遺伝子の起動を示す ZGA の進行が妨げられ、2 細胞期で発生停止を引き起こすことが判明した。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唆している。本研究で得られた知見は、ミトコンドリアの形態的リモデリングが初期胚発生の進行に重要であることを示しており、ミトコンドリアの形態的リモデリングの役割と初期胚発生の進行を結び付ける発生生物学的に新しい洞察を与えると共に、正常な初期胚発生の達成が求められる動物生産および生殖補助医療の分野においても重要な基盤情報となりうる。