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［全文の要約］
Author(s)	林, 芳弘
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/92650
Type	doctoral thesis
File Information	HAYASHI_Yoshihiro_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博 士 論 文 の 要 約

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

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形態変化を示す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、初期胚発生間から分化体細胞に向け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、未成熟ミトコンドリアから成る初期胚中に体細胞由来の成熟ミトコンドリアを導入した体細胞ミトコンドリア導入胚 (SM 胚)を作製して、SM 胚の解析を通じてミトコンドリア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

【目的】

体細胞ミトコンドリアの導入が初期胚発生率に及ぼす影響についてはコンセンサスが得られていない。これは、体細胞由来のミトコンドリアの初期胚内への導入を確かめた上で解析された研究と、確認されていない実験系で得られた結果が混在していることに起因しているのではないかと考えた。本研究では、導入した体細胞ミトコンドリアが初期胚内に存在しているか透過型電子顕微鏡　(Transmission Electron Microscopy: TEM)を用いて厳密に確認したのちに、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調べた。また、初期胚発生率への影響を調べるとともに、発生率にも直接関与すると考えられる細胞死の一種アポトーシスの関連分子への影響も調べることとした。

【材料と方法】

体細胞ミトコンドリアが導入された SM 胚の作出は、顕微操作により行った。作出した胚は、胚盤胞期胚まで体外培養を行い、胚盤胞期までの体外発生率を調べた。また、体細胞ミトコンドリアの導入がアポトーシスに及ぼす影響に関しては、TEM 観察、免疫電子顕微鏡法、および活性化 Caspase を検出する蛍光プローブ (Cell Event Caspase 3/7)を用いて調べた。

【結果と考察】

体細胞ミトコンドリアを導入した SM 胚の初期胚発生率を、未操作の Intact 胚およびミトコンドリア導入用バッファー導入胚 (BI 胚)と比較したところ、2 細胞期および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、2 細胞期に発生した胚の約 90%が胚発生停止を示した ($P < 0.01$)。次に、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。TEM 解析により 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、免疫電子顕微鏡解析により SM 胚におけるミトコンドリアの近傍にシトクロム C が観察された。

最後に、Cell Event Caspase 3/7 により、SM 胚における Caspase 経路の活性化が確認された。以上の結果から、体細胞ミトコンドリアが混在した SM 胚は、2 細胞期で発生停止し、胚盤胞期胚までの発生率が低下すること判明した。さらに、発生率低下の一つの原因としてアポトーシスが誘導され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

【目的】

本実験では、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ことが知られているからである。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。本実験では、RNA-seq を用いた網羅的遺伝子発現解析と定量 PCR を実施し、minor ZGA と major ZGA に関わる遺伝子発現レベルについて評価した。また、ヒストン修飾状態も評価した。ZGA をはじめとする転写制御は、ヒストン修飾状態の変化と密接に関係している。そこで、SM 胚における ZGA の遺伝子発現解析を行うとともに、ZGA を制御するヒストン修飾状態を調べた。

【材料と方法】

RNA-seq を実施し、Intact 胚と比較して SM 胚において発現レベルに有意な差が認められた遺伝子群の中から、major ZGA 遺伝子群および minor ZGA 遺伝子群を抽出し、遺伝子の発現レベルを Intact 胚と比較した。また、Intact 胚および SM 胚について、major ZGA が生じる前の 1 細胞期および生じた後の 2 細胞期後期においてサンプリングを行い、minor および major ZGA 関連遺伝子の発現量の変化率を調べた。さらに、2 細胞期後期において、転写活性型ヒストン修飾である H3K27ac と、抑制型ヒストン修飾である H3K4me3 の免疫染色を実施した。

【結果と考察】

minor ZGA 遺伝子群の発現レベルを解析した結果、Intact 胚と比較して SM 胚では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 胚におけるヒストン修飾状態を調べた。Intact 胚および BI 胚を H3K4me3 および H3K27ac の免疫染色に供したところ、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。ところが、Intact 胚および BI 胚と比べて SM 胚では H3K4me3 の強い蛍光シグナルが観察され、H3K27ac は微弱な蛍光シグナルしか観察されなかった。画像解析により蛍光シグナル強度を比較したところ、SM 胚の H3K4me3 の蛍光シグナル強度は、Intact 胚および BI 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

【目的】

ヒストン修飾状態は、ヒストン修飾酵素や代謝産物によって変化する。本実験では、ヒストン修飾酵素のうち、ZGA に関わる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 に注目した。Sirt1 による時期特異的な脱アセチル化は、minor ZGA 遺伝子の発現を抑制することで、minor ZGA から major ZGA への移行を制御する。そこで、SM 胚における Sirt1 発現を免疫染色により調べた。また、NAD^+は Sirt1 の活性化および発現レベルにも関わる。そこで、SM 胚における NAD^+/NADH 比についても NAD^+/NADH Glo cycling assay により調べた。さらに、アセチル CoA は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代謝産物であり、

ヒストンアセチル化修飾レベルの制御に関わるため、SM 胚におけるアセチル CoA についても調べた。最後にアセチル CoA や NAD^+などの代謝産物の合成に関わるミトコンドリア膜電位 (MMP) についても調べた。MMP とはミトコンドリア膜内外の電位差のことであり、ミトコンドリア代謝活性の指標となる。

【材料と方法】

SM 胚を作出し、Sirt1 の発現レベルは免疫染色により調べた。NAD^+と NADH の比率は、NAD^+/NADH 比は活性測定キットを用いて調べた。アセチル CoA 量と MMP は、それぞれの感受性蛍光プローブを用いて画像解析により調べた。

【結果と考察】

免疫染色により Sirt1 の蛍光シグナル強度を調べたところ、Intact 胚および BI 胚と比較して SM 胚では有意に低下していた ($P < 0.01$)。また、Sirt1 による脱アセチル化への影響を調べるため、2 細胞期中期から 2 細胞期後期への H3K27ac の変化を調べた。Intact 胚および BI 胚では、2 細胞期中期から後期にかけて H3K27ac の蛍光シグナル強度の有意な減少がみられたものの ($P < 0.01$)、SM 胚では H3K27ac のシグナル強度の変化はみられなかった。これらの結果から、SM 胚では ZGA 制御に関わるヒストン修飾酵素 Sirt1 の発現レベルの減少が、ヒストン修飾状態のかく乱に関与していることが示唆された。

続いて、SM 胚における代謝産物 NAD^+およびアセチル CoA を調べた。NAD^+と NADH の比率を調べたところ、Intact 胚および BI 胚と比較して、SM 胚では NAD^+/NADH 比が有意に低下していた ($P < 0.05$)。またアセチル CoA 量は、Intact 胚および BI 胚と比較して SM 胚では有意に減少していた ($P < 0.05$)。

最後に、ミトコンドリア代謝活性の指標である MMP を調べた結果、Intact 胚および BI 胚と比べて、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、NAD^+やアセチル CoA などの代謝産物の減少が生じていることが示唆された。

総合考察

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 胚の初期胚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。

今後、生殖細胞内におけるミトコンドリアの形態的なリモデリングに必要な分子を特定し、ミトコンドリアの形態的リモデリングの人為的改変が可能になれば、転写制御が適切な発育能力の高い初期胚の作出が可能になるかもしれない。

以上より、本研究の結果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、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有用な知見となる。

結論

初期胚内において成熟度の異なるミトコンドリアが混在すると、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で 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およびアポトーシスの誘導が引き起こされることが示唆された。