

令和元年5月28日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07996

研究課題名(和文) ミトコンドリアからのアプローチでわかる、母体の老化が卵子に記憶されるメカニズム

研究課題名(英文) Age associated mitochondrial changes in oocytes

研究代表者

岩田 尚孝 (IWATA, Hisataka)

東京農業大学・農学部・教授

研究者番号：50385499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：卵子のミトコンドリアゲノムやタンパクに母体の状態によってひきおこされる異常とその制御方法について取り組んだ。肥満をモデルにした高脂質環境は卵子の能力低下とヒストンの低アセチル化およびミトコンドリアのタンパクの高アセチル化を引き起こした。ミトコンドリアの機能はSIRT1の活性化によって改善できることが分かった。また加齢によってミトコンドリアのゲノムに変異が起こることも明らかになった。ミトコンドリア障害のモデルとして、凍結によってミトコンドリアの機能や質が低下することを示し、障害を受けたミトコンドリアはSIRT1の活性化によって除去されることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では加齢によって卵子のミトコンドリアのゲノムにどのような異常が蓄積されるのかを明らかにした。また高濃度の脂肪酸存在下ではミトコンドリアのタンパクの高アセチル化が起こり機能が減退することがわかった。凍結などにより物理的に惹起されたミトコンドリア異常の一部はミトコンドリアの品質管理機構をSIRT1の活性化によって活性化させることで、改善できることが分かった。母体の加齢や胚操作に起因するミトコンドリア障害に対する簡便な対抗手段として、本研究の知見は応用が可能である。

研究成果の概要(英文)：The present study addressed age and obesity associated low mitochondrial functions and mitochondrial genome mutations and possible countermeasures against the mitochondrial deterioration in oocytes and embryos. DNA sequencing of mitochondrial genome revealed aging associated mitochondrial genome mutations. Obesity induced mitochondrial dysfunctions including hyperacetylation of mitochondrial proteins, which were ameliorated by activation of SIRT1 levels in oocytes. SIRT1 activation helped embryo-recovery from cryopreservation associated mitochondrial dysfunctions through removal of damaged mitochondria and improved quality and pregnancy rate of the post warmed embryos.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ミトコンドリア 加齢 肥満 ゲノムの変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ブタ卵子をミトコンドリア(Mt)脱分極剤(CCCP)で処理すると、SIRT1 や AMP-activated protein kinase : AMPK (AMPK) が活性化し、Mt 合成とマイトファージ (分解) の両方の活性化を介した“Mt の更新”が起こる“品質管理機構”が存在する予備知見がある。また SIRT1 や AMPK の活性化処理も、同様に Mt の合成と分解を促し、卵子の質を改善する。このため卵子内では Mt の品質が監視、維持されていると考えられるが、加齢ウシ卵子では不良な Mt の蓄積が認められ Mt の障害から合成に至る品質管理機構が弱体化していると考えられる。一方で不良 Mt が蓄積される背景、不良な Mt の運命やこれが引き起こす長期的な影響は不明である。

2. 研究の目的

加齢や痩身といった生理的減退期の卵子に由来する産子には異常があることが報告されている。申請者は加齢卵子の質低下の大きな原因として、Mt の数や質の低下があり、Mt の合成と分解を伴う品質管理機構の弱体化がある可能性を見出した。また、加齢ウシ卵子のエネルギー状態が低下し、これは低アセチル化を招く予備知見を得た。そこで加齢に伴う Mt の変化や品質管理機構の弱体化が、さらに不良 Mt の蓄積を招き、このエネルギー不足に起因した何らかのメモリーが卵子に施されていると仮定している。本研究では、加齢に伴う品質管理機構の弱体化と、不良 Mt 蓄積のメカニズムと、惹起された卵子のエネルギー充足度の低下が、どのようなメモリーとして卵子に残るのか、そしてそれらのメモリーは予後にどのように影響するのかについて検討する。

3. 研究の方法

本研究では、加齢によりどのようなメカニズムで不良 Mt が蓄積し、それによる低エネルギー状態が卵子にどのような悪影響を及ぼすのかとその対応策を検討した。具体的には Mt-DNA の変異に着目し、機能変化や変異の予測とその制御方法について取り組む課題、Mt の品質管理機構に着目し、Mt 障害への反応性が加齢により弱体化するのかどうか、それに対する制御法は何かについて取り組む課題、そして卵子のエネルギー状態に惹起されるアセチル化に着目し、どのようなメモリーとして卵子に残るのか、これらを制御する培養法は何かについて検討した。

4. 研究成果

(1)

加齢による Mt ゲノムの変異を調べるため高齢と若齢ウシの卵子を用いて 7000bp の領域を対象に PCR し産物を得て、次世代シーケンサーを用いて解析したところ、加齢に伴い変異が蓄積する個所を同定することが出来た。これらの変異の多少の部分を対象に 2 通りのリアルタイム PCR を用いてその比率を卵子で検証するとやはり、若齢と加齢の卵子内で比率が異なる事が示せた。一方で受精後の胚を用いてリアルタイム PCR にて再度検証したがこの変異差は縮小しており卵子から胚に至る過程でミトコンドリアの質に何らかの変化が起こることが推測された[学会発表]。上記の異常は個体によってばらつきが大きかったため、卵子のミトコンドリアに明確な変化が引き起こせる凍結融解卵子をモデルに用いた。凍結融解はガラス化においても緩慢凍結においても Mt に機能低下をひき起こし、さらに Mt のゲノムの細断が起こることを示すことが出来た。凍結後の胚は培養中に Mt ゲノムの断片を培地中に放出することが明らかになり、卵子や胚中では壊れた Mt を除去していると考えられた。この Mt の修復機構を SIRT1 の活性化剤であるレスベラトロールで処理を行うと、凍結前、後に関わらず培養培地中に Mt ゲノムの断片の増加が観察され、胚に含まれる Mt ゲノムの減少と胚質の向上、移植後の受胎率の改善が認められた。そのためミトコンドリアの除去機構の活性化は不良 Mt を持つ胚や卵子に重要であると考えられた[3,7,11]。この SIRT1 の活性化による胚質の改善は胚の短期間の高温処理によっても同等の効果を得ることが明らかになった[5]。あわせて、卵子の体外発育では、培地中に卵子や細胞から放出される Mt ゲノムに由来する細胞外 DNA 量が多いと内包する卵子の質が低いことを示すことが出来た[1]。

(2)

加齢に伴う Mt の品質管理機構の低下とその制御については、若齢と加齢ウシの卵子を対象に CCCP を用いて Mt の障害を起こしたところ、その後の発生率とミトコンドリア機能で推測した卵子の回復力は、加齢において低調であった。ここにレスベラトロール処理を行い、SIRT1 を活性化させると卵子の Mt の質が改善することから膜電位低下を伴う卵子中不良 Mt の一部は、薬剤などによる人為的処理で改善できることが明らかになった[9]。

(3)

最初にブタの卵子を用いて卵子発育には顆粒層細胞数が決定要因であることを証明し[4]、次に卵子の Mt 異常を惹起している原因を顆粒層細胞に求めて以下の実験を行った。初期胞状卵胞卵子の体外発育中に周囲の細胞を他個体のものと入れ替える培養方法を開発し[2]その方法をウシの初期胞状卵胞卵子に用いたところ加齢個体 (ウシ) に由来する顆粒層細胞を用いて体外発育した若齢個体由来卵子に、上記で見つけた加齢に伴う Mt ゲノムの変異が増加する事が明らかになり、卵子発育を支持する細胞の質が Mt のゲノムの変異を惹起している可能性を示す知見を得た[未発表]。顆粒層細胞数以外の卵子のアセチル化状態を変化させる要因として、卵

胞液中の遊離脂肪酸量に着目しこれらが卵子の発育に及ぼす影響を詳細に明らかにした[8]。さらに高脂質の条件で体外発育した卵子の Mt ではタンパクの高アセチル化が観察され、Mt の機能が低下し Mt にメモリーが残る可能性が得られた。この高アセチル化タンパクは卵子の AMPK の活性化により減少し Mt の機能改善が観察されたため、肥満状態では Mt の質が変化し、これが長期間の発育不良を惹起する可能性と、この一部が薬剤処理によって改善可能であることが明らかになった[6]。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1: Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, **Iwata H**. Cell-free DNA in medium is associated with the maturation ability of in vitro cultured oocytes. J Reprod Dev. 2019.in print. 査読有り

2: Ishiguro A, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, **Iwata H**. Addition of granulosa cells collected from differential follicle stages supports development of oocytes derived from porcine early antral follicles. Reprod Med Biol. 2018;18(1):65-71.査読有り

3: Hara T, Kin A, Aoki S, Nakamura S, Shirasuna K, Kuwayama T, **Iwata H**. Resveratrol enhances the clearance of mitochondrial damage by vitrification and improves the development of vitrified-warmed bovine embryos. PLoS One. 2018 ;13(10):e0204571.査読有り

4: Munakata Y, Ueda M, Kawahara-Miki R, Kansaku K, Itami N, Shirasuna K, Kuwayama T, **Iwata H**. Follicular factors determining granulosa cell number and developmental competence of porcine oocytes. J Assist Reprod Genet. 2018;35(10):1809-1819.査読有り

5:Itami N, Shirasuna K, Kuwayama T, **Iwata H**. Short-term heat stress induces mitochondrial degradation and biogenesis and enhances mitochondrial quality in porcine oocytes. J Therm Biol. 2018;74:256-263.査読有り

6:Itami N, Shirasuna K, Kuwayama T, **Iwata H**. Palmitic acid induces ceramide accumulation, mitochondrial protein hyperacetylation, and mitochondrial dysfunction in porcine oocytes. Biology of Reproduction. 2018;98(5): 644-653.査読有り

7:Kansaku K, Munakata Y, Itami N, Shirasuna K, Kuwayama T, **Iwata H**. Mitochondrial dysfunction in cumulus-oocyte complexes increases cell-free mitochondrial DNA. J Reprod Dev. 2018;64(3):261-266. 査読有り

8:Ogawa K, Itami N, Ueda M, Kansaku K, Shirasuna K, Kuwayama T, **Iwata H**. Non-esterified fatty acid-associated ability of follicular fluid to support porcine oocyte maturation and development. Reproductive Medicine and Biology. 2018;17(2):155-163. 査読有り

9:Kansaku K, Takeo S, Itami N, Kin A, Shirasuna K, Kuwayama T, **Iwata H**. Maternal aging affects oocyte resilience to carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone -induced mitochondrial dysfunction in cows. PLoS One. 2017; 12(11):e0188099. 査読有り

10:Kansaku K, Itami N, Kawahara-Miki R, Shirasuna K, Kuwayama T, **Iwata H**. Differential effects of mitochondrial inhibitors on porcine granulosa cells and oocytes. Theriogenology. 2017;103:98-103.査読有り

11:Abe T, Kawahara-Miki R, Hara T, Noguchi T, Hayashi T, Shirasuna K, Kuwayama T, **Iwata H**. Modification of mitochondrial function, cytoplasmic lipid content and cryosensitivity of bovine embryos by resveratrol. J Reprod Dev. 2017;63(5):455-461. 査読有り

〔学会発表〕(計 3 件)

19 回日本生殖工学会学術講演会 (大阪)
卵子の発育を支えるマイクロ RNA
岩田 尚孝
2019 年 2 月 16 日

The 11th Congress of the Pacific Society for Reproductive Medicine (Osaka)
Aged-associated increases in mitochondrial DNA mutation in bovine oocytes Kin A, Kansaku K,
Kawahara-Miki R, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H
2017 October 14-15

World Congress of Reproduction and Biology (Okinawa)
Granulosa cell number and oocyte growth
H Iwata
2017年9月27日 - 29日

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。