

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：14602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2020

課題番号：18H06438・19K21511

研究課題名（和文）ビオチン不足・欠乏による卵子の質劣化要因の解明

研究課題名（英文）Analysis of the factors of mouse oocyte aging by biotin deficiency

研究代表者

辻 愛（Tsuji, Ai）

奈良女子大学・生活環境科学系・助教

研究者番号：40826749

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円

研究成果の概要（和文）：質の劣化した卵子は減数分裂異常が起きやすく、染色体不分離や流産、不妊症の原因となる。水溶性ビタミンであるビオチン不足・欠乏による減数分裂異常の要因の解明を目的とした。減数分裂異常にはエネルギー不足、ミトコンドリア機能の低下、酸化ストレス、ヒストンのメチル化/アセチル化異常などが関与する。ビオチン不足によって脂肪酸合成が抑制され、卵子中の脂肪滴量が減少し、ミトコンドリア機能が低下した。これらが不足・欠乏時の減数分裂の要因となりうることを明らかにした。一方、酸化ストレス、ヒストンのメチル化はビオチン不足の影響を受けなかったことから、ビオチン不足による減数分裂異常の要因である可能性は低いと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不適切な栄養状態は卵子の質を劣化させる。栄養素や栄養状態と卵子のかかわりを明らかにすることは、栄養学的手法による不妊の予防や卵子の質の改善につながる。ビオチン不足によって卵子の減数分裂異常が誘発されるが、その機序は不明である。ビオチン不足によって、脂肪酸合成が抑制、卵子中の脂肪滴量が顕著に減少し、ミトコンドリア機能は低下することを明らかにした。これらが、ビオチン不足による減数分裂の要因となりうることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Low-quality oocytes cause meiosis failure, autopolyploidy, and infertility. Biotin is a water-soluble B-group vitamin. This study aimed to elucidate the mechanism of oocyte meiosis failure caused by biotin deficiency. Energy deficits, reductions in mitochondrial membrane potential, oxidative stress, and the abnormal methylation/acetylation of histone induces oocyte meiosis failure. Biotin deficient mice exhibit decreases in oocyte lipid droplets, lipogenesis, and mitochondrial membrane potentials. The reduction in lipid droplets and mitochondrial membrane potentials may be associated with oocyte meiosis failure caused by biotin deficiency. Alternatively, biotin deficiency did not affect reactive oxygen species and histone methylation in oocytes. We propose that oxidative stress and abnormal histone methylation negligibly contribute to oocyte meiosis failure caused by biotin deficiency.

研究分野：栄養学

キーワード：ビオチン 欠乏 卵子の質 減数分裂異常 脂肪滴 ミトコンドリア エピジェネティクス マウス

1. 研究開始当初の背景

水溶性ビタミンの1つであるビオチンは、遺伝子発現の調節や補酵素として脂肪酸合成や糖新生、アミノ酸異化代謝に関与する。また、胎児の正常な発生に必須である。ビオチン不足・欠乏によって、卵子(卵母細胞)に減数分裂異常が起きる(Tsuji A et al., 2015)。さらに、ビオチン不足後にビオチンを21日間投与しても、減数分裂異常は元に戻らないことを報告した。ビオチン不足・欠乏による卵子の減数分裂異常が起きるメカニズムは不明である。ビオチンは先にも述べたように補酵素として、様々な代謝に関与する。脂肪酸合成の律速酵素であるアセチル CoA カルボキシラーゼ(ACC)活性は、ビオチン欠乏によって顕著に減少し、低ビオチン濃度培地で培養したヒト脂肪細胞中の脂肪滴が減少する(Suchy et al., Am J Clin Nutr., 1986、Järvinen et al., Int J Obes (Lond), 2016)。このことから、ビオチン不足・欠乏マウスの卵子において、脂肪滴量の減少が予想される。脂肪酸は卵子の減数分裂のエネルギーとして利用される。エネルギー不足(ATP産生量の減少)は減数分裂異常を誘発する(Zhang et al., Cell Res., 2006)。つまり、ビオチン不足・欠乏によって卵子中の脂肪酸合成が抑制され、卵子中の脂肪酸含量の減少によるエネルギー不足が減数分裂異常を引き起こすという仮説(脂肪酸仮説)を考えた。

また、減数分裂異常が起きる要因には、一般的にミトコンドリア機能の低下、活性酸素種による酸化ストレス、ヒストンのメチル化/アセチル化異常の関与が言われている(図1)。

そこで本研究では、脂肪酸仮説を中心にビオチン不足・欠乏によって引き起こされる減数分裂異常の要因を明らかにすることを目的とした。

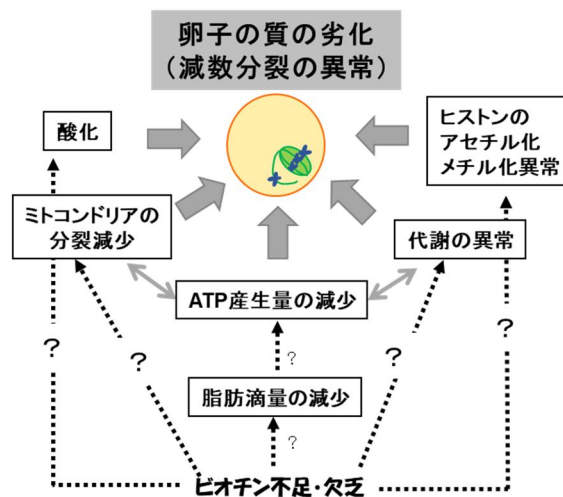


図1 ビオチン不足・欠乏による減数分裂異常の予想される要因

2. 研究の目的

ビオチン不足・欠乏および回復時の卵子中脂肪滴量および脂肪酸合成、ミトコンドリア機能、酸化ストレス、ヒストンのメチル化に影響を明らかにし、ビオチン不足・欠乏による減数分裂異常の要因を解明すること。

3. 研究の方法

(1) 実験動物および飼料・飼育方法

3週齢のICRマウス49匹を対照群(Ct群; n=23)、ビオチン欠乏食群(BD群; n=13)、回復群(Re群; n=13)に分けて、マウス用の代謝ケージで飼育した。Ct群には30%卵白粉末食(ビオチン 0.004g/kg)を与え、BD群にはビオチン欠乏食を与えた。Re群には21日までビオチン欠乏食を与えた。22日目からビオチン栄養状態を回復させる目的で、回復食として30%卵白粉末食を与えた。飼育開始から22日目、43日目、64日目に各群の卵子、卵巣および肝臓を採取した。卵子はGV期卵子(卵核胞期卵子)あるいはMII卵子(第二減数分裂中期卵子)を採取した。解析した日が早い順から、Ct群をCt1、Ct2、Ct3とし、BD群はBD1、BD2、Re群はRe1、Re2と表記する(図2)。

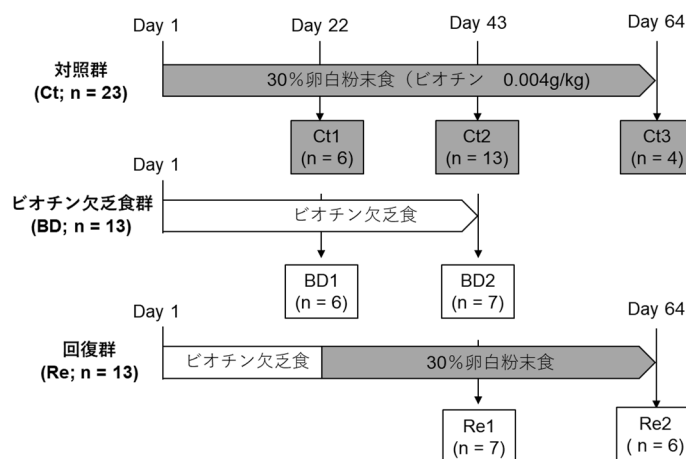


図2 実験方法

(2) 卵子中脂肪滴

卵子中脂肪滴量はGenicotら(Theriogeneology, 2005)の報告をもとに行った。卵丘細胞から単離したMII卵子をNile Red染色液に6時間浸漬した。洗浄後、MII卵子を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、ImageJソフトにより解析した。

(3) ミトコンドリア膜電位および活性酸素種

MII 卵子のミトコンドリア膜電位および活性酸素種 (ROS) を評価した。質の劣化した卵子のミトコンドリアは脱分極する。ミトコンドリア膜電位によって色が赤と緑に変化する JC-1 はミトコンドリアの健康を評価に使用される。JC-1 を溶解した培地に MII 卵子を浸漬し、インキュベートした。蛍光顕微鏡下で観察した。赤色発光強度を緑色発光強度で除した値を、群間で比較した。

ROS 濃度依存的に緑の蛍光を発する CM-H2DCFDA で MII 卵子を染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。緑色発光強度を群間で比較した。

(4) 卵巣中遺伝子発現量の測定

ビオチンを補酵素とするカルボキシラーゼや脂肪酸合成酵素 (FAS) β 酸化に關与する酵素 (Carnitine palmitoyltransferase 1 α : CPT1 α 、Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1: ACOX1) の遺伝子発現量を測定した。

(5) ヒストンのメチル化

Ct1 と BD1 の GV 期卵子におけるヒストンのメチル化への影響を観察した。卵子の減数分裂異常への関与が知られているヒストン H3 の 9 番目のリシンのジメチル化 (H3K9me2) β ヒストン H3 の 27 番目のリシンのジメチル化 (H3K27me2) を蛍光免疫染色法で検出し、評価した。

(6) 異常卵子の割合

これまでの研究で、ビオチン不足後から 21 日間ビオチンを投与しても卵子の質が回復しないことを報告している。回復期間を延長し、42 日間ビオチンを投与した時の卵子の質を評価するために、Ct3 群と Re2 群の MII 卵子を採取した。 α -チューブリン抗体による蛍光免疫染色から卵子の紡錘体構造を観察した。紡錘体が両サイドで収束していない、かつ/または染色体が同一平面状に並んでいない卵子や GV 期卵子を異常卵子とした。観察した卵子に占める異常卵子の割合を算出した。

(7) 卵巣中 ACC のリン酸化

ACC のリン酸化によって、脂肪酸合成が抑制される。卵巣中の ACC リン酸化レベルを評価するために、ウェスタンブロッティング法によって ACC のリン酸化を解析した。

4. 研究成果

(1) ビオチン不足・欠乏が卵子や脂質代謝におよぼす影響

BD1 は肝臓ビオチン濃度や尿中ビオチン排泄量が Ct1 よりも減少していたが、欠乏症状である脱毛症状は認められなかったことから、ビオチン不足状態であった。一方、BD2 は脱毛症状が認められたことから、ビオチン欠乏状態であった。BD1 および BD2 の卵子中脂肪滴量が各 Ct 群に比べて顕著に減少し (図 3-A) β 酸化 ACC は増加した。また、脂肪酸の β 酸化に關与する Cpt1 α の遺伝子発現が BD1 で抑制傾向、BD2 で有意に抑制された。以上のことから、ビオチン不足・欠乏によって脂肪酸合成の抑制により卵子中脂肪滴量がすること、 β 酸化も抑制されることが示唆された。さらに、BD1 のミトコンドリア膜電位が低下したことから、ビオチン不足によってミトコンドリアの機能が低下することが示唆された (図 3-B)。

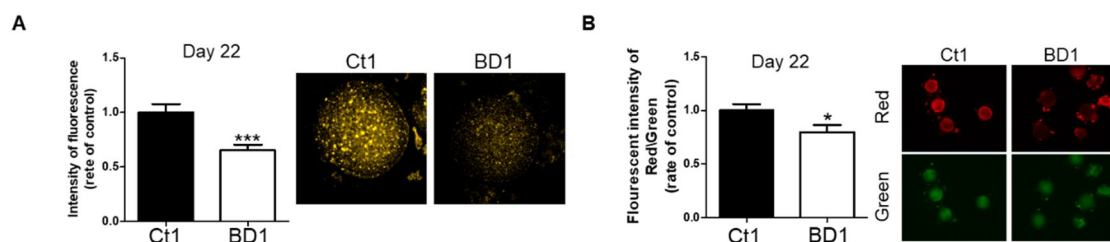


図3 ビオチン不足が卵子中脂肪滴量とミトコンドリア膜電位におよぼす影響

A) 卵子中脂肪滴量。オレンジ色は脂肪滴を示す。B) JC-1 色素による赤色/緑色の比を示した。赤色は正常なミトコンドリアを示す。Ct1: Day 22の対照群、BD1: Day 22のビオチン欠乏群(ビオチン不足状態)

BD1 の卵子中の ROS は Ct1 より低く、H3K9-me2,3 および H3K27-me2 の発現量は変化しなかった。このことから、ビオチン欠乏による減数分裂異常に酸化ストレスおよびヒストンのメチル化異常が関与している可能性は低いと考えられる。

(2) ビオチン栄養状態の回復が卵子や脂質代謝におよぼす影響(回復食摂取期間 21 日の場合)

Re1 の肝臓中ビオチン濃度や尿中ビオチン排泄量および卵巣中 ACC リン酸化レベルは Ct2 と同等レベルに回復した。しかし、卵子中脂肪滴量は Ct2 の 71% であり、有意に低かった (図 4-A)。ミトコンドリア膜電位は回復していた (図 4-B)。Re1 の Acc1 や Cpt1 α 発現量は Ct2 より有意に低く、Fas 遺伝子発現量は有意に高かった。ビオチン欠乏ではなく、不足であっても遺伝子発現調節機構や生成物への影響は色濃く、体内ビオチン量の回復との間にずれが生じること

が明らかとなった。

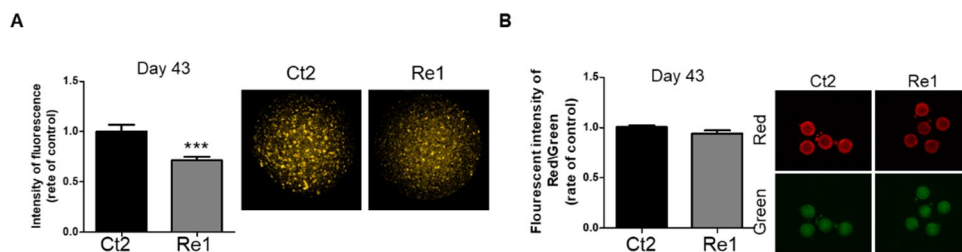


図4 ビオチン不足からの回復が卵子中脂肪滴量とミトコンドリア膜電位におよぼす影響
 ビオチン不足マウスに回復食として対照食を21日間与えた。
 A) 卵子中脂肪滴量。オレンジ色は脂肪滴を示す。B) JC-1色素による赤色/緑色の比を示した。赤色は正常なミトコンドリアを示す。
 Ct2: Day 43の対照群、Re1: ビオチン不足マウスに回復食として対照食を21日間与えた回復群

(3) ビオチン回復期間の延長が卵子の脂肪滴量や減数分裂異常におよぼす影響(回復食摂取期間 42 日の場合)

21 日間から 42 日間に回復期間を延長したことによって、Re2 の *Acc1*、*Cpt1a*、*Fas* などの遺伝子発現量は Ct3 と同等レベルに回復した。しかし、Re2 の卵巣中脂肪滴量は Ct3 の 75.7% であり、Ct3 より有意に低かった(図 5-A)。また、Re2 の異常卵子の割合は Ct3 群より有意に高かった(図 5-B)。

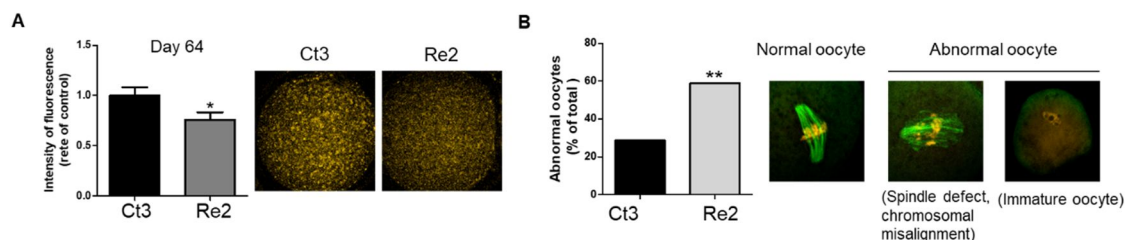


図5 ビオチン回復期間の延長が卵子中脂肪滴量と減数分裂異常におよぼす影響
 ビオチン不足マウスに回復食として対照食を42日間与えた。
 A) 卵子中脂肪滴量。オレンジ色は脂肪滴を示す。B) 減数分裂異常卵子の割合。紡錘体が両サイドで収束していない、かつ/または染色体が同一平面状に並んでいない卵子やGV期卵子を異常卵子とした。
 Ct3: Day 64の対照群、Re2: ビオチン不足マウスに回復食として対照食を42日間与えた回復群

(4) まとめ

本研究は、ビオチン不足・欠乏による減数分裂異常の要因を明らかにすることを目的とした。ビオチン不足・欠乏によって、脂肪酸合成の抑制による脂肪滴量の減少、 β 酸化の抑制やミトコンドリア機能が低下することを明らかにした。ビオチン欠乏によってミトコンドリアが膨張することが報告されている (Bhuvaneswaran et al., Arch Biochem Biophys. 1971)。減数分裂異常には脂肪酸合成の抑制による脂肪滴量の減少、エネルギー産生不足を引き起こし、減数分裂異常につながった可能性が考えられる。一方、酸化ストレスやヒストンのメチル化異常は、減数分裂異常の要因である可能性は低いと考えられる。

Re 群のミトコンドリア膜電位および遺伝子発現量はビオチン栄養状態の回復によって Ct 群と同等レベルに回復した。しかし、脂肪滴量の減少は回復期間を延長しても回復しなかった。ビオチン不足・欠乏時だけでなく回復時の減数分裂異常にも、脂肪滴の関与が示唆された。しかし、ビオチンは染色体構造の安定性や DNA 損傷にも関与するという報告があり、未知の要因の存在も疑われる。脂肪滴量の減少が直接的な原因であると断定するには、さらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 辻愛、池田祐香、中川友希江、村上睦美、北岸靖子、柴田克己、松田覚
2. 発表標題 ピオチン欠乏による減数分裂異常とその要因の解明
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻 愛、樺澤 理紗子、池田 祐香、中川 友希江、村上 睦美、北岸 靖子、松田 覚
2. 発表標題 ピオチン欠乏および再摂取が卵子中脂肪滴、卵巣中脂質代謝におよぼす影響
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻愛、樺澤理紗子、池田祐香、中川友希江、村上睦美、北岸靖子、松田覚
2. 発表標題 ピオチン不足によって卵子中の脂肪滴量は減少する
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------