

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号： 11501

研究種目： 奨励研究

研究期間： 2020 ~ 2020

課題番号： 20H00971

研究課題名 ミトコンドリアDNA高精度定量システムを利用した受精卵品質評価法の確立

研究代表者

坂原 聖士 (Sakahara, Satoshi)

山形大学・工学部・技術専門職員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 460,000 円

研究成果の概要：近年ミトコンドリアに存在するDNA（mtDNA）の量が受精卵の品質評価に有効であることが多数報告されている。本研究では、研究代表者が以前確立した「mtDNA高精度定量システム」の受精卵品質評価法としての有効性を検証した。その結果、形態学的品質の良い受精卵にはmtDNAが適切な量含まれていることが示された。また生化学および電気化学的手法による従来の品質評価に加えて本システムによるmtDNA定量を行うことで、同一受精卵の品質を詳細に評価することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本システムによるミトコンドリアDNAの高精度定量と従来の品質評価法を組み合わせることで受精卵の品質を総合的に評価することは、受精卵のミトコンドリアに起因する品質低下や不妊の原因を解明する有効な方法として期待される。さらに、本研究で使用した外部標準DNAを用いたミトコンドリアDNA高精度定量システムは、ES細胞やiPS細胞などの採取の難しい極微量サンプルでの解析といった様々な研究への応用が期待される。

研究分野： 発生生物学

キーワード： ミトコンドリア ミトコンドリアDNA ミトコンドリア膜電位 呼吸

1. 研究の目的

ミトコンドリア (Mt) はエネルギー産生やアポトーシスなど重要な生物現象に関わり、受精卵や細胞の品質に影響している。一般に、Mt の機能は Mt 膜電位や酸素消費量測定などによって解析されている。また近年、Mt に存在する DNA (mtDNA) コピー数が受精卵の品質評価に有効であることが示されたことから、精度の高い mtDNA コピー数解析の開発が必要になってきた。しかし、単一受精卵由来の試料は極微量であるため、従来の方法では測定中に mtDNA が損失するという問題があった。そこで研究代表者は、植物由来の外部標準 DNA を用いた「mtDNA コピー数高精度定量システム」の開発を進めてきた (平成 29 年度交付・奨励研究課題)。本研究では、受精卵の品質評価法としての mtDNA コピー数高精度定量システムの有効性の検証を目的とした。具体的には、受精卵の品質を細胞生物学、生化学および電気化学的手法により評価し、同一受精卵の mtDNA コピー数を本システムにより解析することでその有効性を検討した。

2. 研究成果

(1) 形態学的品質評価と mtDNA コピー数定量解析

BALB/cA または C57BL/6N マウスの受精卵 (胚盤胞) を作製後、胚盤胞を形態学的評価に基づき分類し、コピー数既知の外部標準 DNA を添加した後、リアルタイム PCR により mtDNA コピー数の定量および補正を行った。その結果、形態が良好な胚盤胞に含まれる mtDNA は 150,000 コピー前後で一定範囲内であったが、形態が不良な胚盤胞ではその範囲外となるものが増え、サンプル間のバラつきが大きくなることが明らかとなった (図 1)。

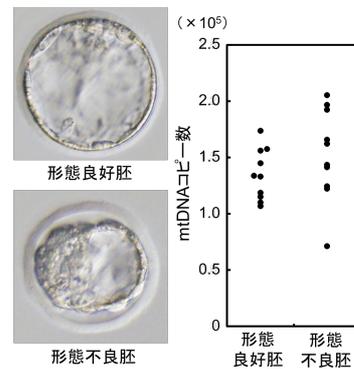


図1 マウス胚盤胞に含まれるmtDNAコピー数

(2) Mt 膜電位測定と mtDNA コピー数定量解析

作製した胚盤胞を Mt 膜電位測定試薬 (JC-10, EnzoLifeSciences) で染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて Mt 膜電位を測定し、その後 mtDNA コピー数を定量した。その結果、胚盤胞の Mt 相対膜電位と mtDNA コピー数との間に明確な関連はみられなかったが、形態が良好な胚盤胞では検出された JC-10 の緑色および赤色蛍光量が多かったことから、Mt が発達していることが示唆された (図 2)。

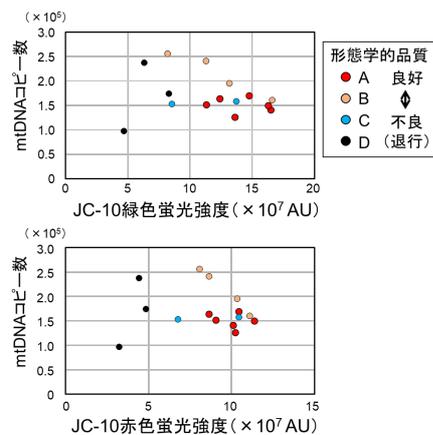


図2 ミトコンドリア膜電位とmtDNAコピー数との関係

(3) 酸素消費量測定と mtDNA コピー数定量解析

作製した受精卵を呼吸測定装置 (HV405, 北斗電工) で酸素消費量を測定し、その後 mtDNA コピー数を定量した。その結果、形態が不良な胚盤胞では良好なものよりも酸素消費量が低い傾向があり、mtDNA がより多く含まれていた。

以上より、mtDNA コピー数の高精度な定量により、形態学的品質の良い受精卵には適切な量の mtDNA が含まれていることが明らかとなった。また、本システムを Mt 機能評価と組み合わせることで、Mt に起因する受精卵の品質低下の原因解明に貢献することができる。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
阿部 宏之	(Abe Hiroyuki)