

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14587

研究課題名(和文) マウス胚着床において核-ミトコンドリア相互作用が果たす役割の解明

研究課題名(英文) The role of nuclear-mitochondrial interaction in mouse embryo implantation

研究代表者

川原 学 (Kawahara, Manabu)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：70468700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胚にウシ由来の異種ミトコンドリアを混入させたウシ-マウスミトコンドリアヘテロプラスミー胚(mtB-M胚)を胚移植しても、着床痕もみられず着床能は完全に欠落している。本研究では、mtB-M胚の栄養膜幹細胞(TS細胞)形成能を調べ、mtB-M胚の着床不全の原因を探った。mtB-M胚でTS細胞樹立能を調べたところ、mtB-M胚では細胞の樹立の指標である継代5回目までコロニーを維持することができなかった。以上より、mtB-M胚では栄養膜細胞の機能が維持できないことが判明し、これが着床不全の原因の一つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria are present in every eukaryotic cell, and have unique DNA different from nuclear DNA. Compared with nuclear DNA, it has a close structure between species. However, mitochondrial heteroplasmic embryo (mtB-M embryo) in which heterologous mitochondria derived from cattle has been mixed in mouse embryos shows implantation failure. In this study, we examined the ability of mtB-M embryo to form trophoblast stem cells (TS cells) and investigated the cause of mtB-M embryo implantation failure. Mouse oocytes were subjected to in vitro fertilization, and subsequently, mitochondrial regions derived from bovine pronuclear stage embryos were transplanted into pronuclear stage embryos by the cell fusion. In the establishment test of TS cells, colonies derived from the mtB-M embryos could not be maintained until passage 5. In summary, the function of trophoblast cells cannot be maintained in the mtB-M embryos, which is considered to be one of causes of implantation failure.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ミトコンドリア 初期胚発生 着床 栄養膜幹細胞 マウス ウシ

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは真核生物においてエネルギー産生を担う重要な細胞小器官である。その起源は、10 億年以上前に古代の真核細胞に取り込まれた細菌に由来し、現在の形に進化したものであると信じられており、細胞内共生説として有名である。これを裏付ける事実として、ミトコンドリアは核 DNA とは別の独自の遺伝物質であるミトコンドリア DNA (mtDNA) を保持していること、そして、その mtDNA の構造が種を跨いで極めて高度に保存されていることが挙げられる。進化の過程で、ミトコンドリアの祖先となる細菌が保有していた遺伝子のほとんどは核 DNA に移行し、mtDNA 自体には電子伝達系に関する 13 種類のタンパク質、2 種類のリボソーム RNA および 22 種類のトランスファー RNA がそれぞれコードされている。そして、これらの mtDNA 上にコードされる 37 遺伝子の種類、および、塩基配列相同性は高等動物間で広く保存されている。主要な機能としてはミトコンドリアにおける電子伝達系において、核 DNA から 72 種、mtDNA から 13 種のタンパク質が供給されることにより呼吸鎖複合体を形成している。複合体 I、II、III および IV の順に酸化還元反応が起き、複合体 V において ATP を合成している。mtDNA からは複合体 I、III、IV および V を構成するタンパク質が供給され、エネルギーを供給している。

このようにミトコンドリアが細胞生物学的に重要な役割を果たしていることに疑問の余地は無いものの、着床過程という一つの生命現象の中でどのような意義を持つのか生殖生物学的な理解は進んでいない。我々のグループではウシ胚由来ミトコンドリアをマウス胚に導入したミトコンドリアヘテロプラスミー胚 (mtB-M 胚) の構築に成功し、その発生能を詳細に調べている。

胚盤胞期までの発生遅延、胚移植後の着床不全を伴う致死が mtB-M 胚の特徴として判明している。本課題では、mtB-M 胚の特徴を精査することで、ミトコンドリアが哺乳類初期胚の着床にどのような役割を果たしているのかを調べた。

## 2. 研究の目的

本課題では、着床阻害が起きる異種間ヘテロプラスミー胚の着床不全の原因を探ることで、哺乳類胚の着床におけるミトコンドリアが果たす役割を理解することを目的とした。

## 3. 研究の方法

まず、1)ウシミトコンドリアが着床不全の直接的原因になっていることを突き止めるため、胚の透明帯を酸性タイロイド液で除去して脱出 (孵化) を補助した mtB-M 胚の移植試験、および、ウシ胚由来のミトコンドリア以外の細胞質成分を導入したマウス胚 (non mtB-M 胚) の移植試験を行った。次に、2)mtB-M 胚の生存性について調べるために、アポトーシス細胞について TUNEL 染色により調べ、特に着床に重要な栄養外胚葉 (TE) の細胞数について着目して解析した。さらに、mtB-M 胚のアポトーシス関連遺伝子発現についても調べた。内部細胞塊 (ICM) 分化マーカーである OCT4 と TE 分化マーカーである CDX2 の免疫染色も実施した。また、3)mtB-M 胚の着床不全機構を体外で評価するために、mtB-M 胚の接着能評価としてフィーダー細胞への胚の接着割合やアウトグロース形成率を調べ、さらに、胎盤形成に必要な不可欠な栄養膜幹細胞 (Trophoblast Stem Cells; TS 細胞) の樹立能を調べた。

## 4. 研究成果

1) **透明帯除去 mtB-M 胚およびミトコンドリア以外の細胞質成分を導入した non mtB-M 胚の個体までの発生能力**

ミトコンドリア以外のウシ胚由来の細胞質を導入した non mtB-M 胚の卵割率および胚盤胞期までの発生率は通常の体外受精胚(IVF 胚)、マウス胚に他のマウス胚ミトコンドリアを導入した mtM-M 胚および mtB-M 胚と比較して有意な差は認められなかった。一方で、mtB-M 胚の胚盤胞期までの発生率は IVF 胚および mtM-M 胚と比較して低下しており有意な差がみられた。また、着床後の発生率については non mtB-M 胚は IVF 胚と比較して有意な差は認められなかった。コントロールとして透明帯を除去した IVF 胚を移植し、胎齢 12.5 日で剖検した。透明帯除去 IVF 胚では着床痕 (65.0%) および生存胎子 (35.0%) が観察されたが、同様に透明帯を除去した mtB-M 胚を胚移植に供した結果、着床痕および生存胎子は全く観察されなかった。以上より、mtB-M 胚の着床不全の原因としては、ミトコンドリア以外の細胞質成分、および、脱出不全が直接的な原因ではないことが判明した。

## 2) mtB-M 胚におけるアポトーシス誘導および細胞分化マーカータンパク質局在

アポトーシス抑制に作用する遺伝子 *Bcl2* の発現レベルは、IVF 胚、mtM-M 胚および mtB-M 胚の間で差は認められなかった。アポトーシス亢進に關与する *Bax*、また、アポトーシス誘導因子である *Caspase 3*、*7* および *9* の 4 遺伝子に関して IVF 胚と比較した場合、mtB-M 胚ではいずれの遺伝子発現レベルも有意に増加していた。*Caspase 7* および *9* については、mtM-M 胚でも IVF 胚と比較して有意に増加していた。さらに、mtB-M 胚由来の胚盤胞期胚では、IVF 胚および mtM-M 胚と比較してアポトーシス細胞の割合が有意に増加していた。加えて、mtB-M 胚由来の胚盤胞において分化マーカーである OCT4

および CDX2 の両方のタンパク質の局在を示す蛍光シグナルが、IVF 胚および mtM-M 胚由来の胚盤胞と同様に ICM および TE の核においてそれぞれ観察されたことから、mtB-M 胚由来の胚盤胞では ICM および TE への細胞分化マーカーに異所性発現はみられなかった。次いで、細胞数について調べた結果、ICM 細胞数では IVF 胚、mtM-M 胚、mtB-M 胚の三者で有意差は認められなかった。しかし、総細胞数、さらに TE 細胞数では mtB-M 胚 ( $30.0 \pm 9.0\%$ ) において他の IVF 胚および mtM-M 胚 ( $48.9 \pm 3.1\%$  および  $46.2 \pm 6.7\%$ ) と比べて有意に減少した。

## 3) mtB-M 胚の TS 細胞樹立能

IVF 胚および mtB-M 胚の 2 種類について、アウトグロース試験を行った。mtB-M 胚では、IVF 胚と比べ播種後 2 日目でのアウトグロース形成率が有意に低下していた。培養 4 日目におけるアウトグロース形成率には mtB-M 胚と IVF 胚で有意な差がみられなかった。その後、培養を継続し TS 細胞樹立の可否を確かめた。mtB-M 胚では継代 2 代目(P2)、P3 および P4 でコロニーの出現率が IVF 胚と比べ有意に低下していた。コントロールである IVF 胚では供試胚 34 個中 4 個 (11.8%) が TS 細胞樹立の目安となる P5 に到達することができ 4 系統の TS 細胞が樹立された。しかし、供試した 55 個の mtB-M 胚は継代 5 回目以降にコロニー形成が確認できず、TS 細胞が樹立されなかった。P3 および P4 において出現した mtB-M TS 様コロニーから mtDNA を抽出し、PCR 法により mtDNA にコードされる遺伝子であるウシ *ND5* およびマウス *ND5* の増幅および検出を試みた。ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールにはマウス肝臓およびウシ子宮由来の mtDNA を用いた。P3、P4 の mtB-M

胚由来細胞でウシ *ND5* 遺伝子の増幅が確認された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Reciprocal regulation of *TEAD4* and *CCN2* for the trophectoderm development of the bovine blastocyst. Akizawa H., Kobayashi K., Bai H., Takahashi M., Kagawa S., Nagatomo H. and Kawahara M. *Reproduction*, 155: 563-571, 2018. 査読有

Evaluating the electrical impedance and mucus-related gene expression of uterine endometrial tissues in mares. Kikuchi K., Kozai K., Hojo T., Sakatani M., Okuda K., Bai H., Kawahara M., and Takahashi M. *Journal of Reproduction and Development*, 64: 193-197, 2018. 査読有

Identification and expression analysis of cDNA encoding insulin like growth factor 2 in horse. Kikuchi K., Sasaki K., Akizawa H., Tsukahara H., Bai H., Takahashi M., Nambo Y., Hata H. and Kawahara M. *Journal of Reproduction and Development*, 64: 57-64, 2018. 査読有

Enhancement of sperm motility and viability by turmeric by-product dietary supplementation in roosters. Yan W., Kanno C., Oshima E., Kuzuma Y., Kim S.W., Bai H., Takahashi M., Yanagawa Y., Nagano M., Wakamatsu J.I., and Kawahara M. *Animal Reproduction Science*, 185: 195-204, 2017. 査読有

Estrous cycle stage-dependent manner of type I interferon-stimulated genes induction in the bovine endometrium. Shirozu T., Iwano H., Ogiso T., Suzuki T., Balboula A.Z., Bai H., Kawahara M., Kimura K., Takahashi H., Rulan B., Kim S.W., Yanagawa Y., Nagano M., Imakawa K., and Takahashi M. *Journal of Reproduction and Development*, 63: 211-220, 2017. 査読有

Pyridoxine supplementation during oocyte maturation improves the development and quality of bovine preimplantation embryos. Aboelenain M., Balboula A.Z., Kawahara M., El-Monem Montaser A., Zaabel S.M., Kim S.W., Nagano M., and Takahashi M. *Theriogenology*, 91: 127-133, 2017. 査読有

The Influence of Polyploidy and Genome Composition on Genomic Imprinting in Mice. Yamazaki W., Amano T., Bai H., Takahashi M., and Kawahara M. *Journal of Biological Chemistry*, 291: 20924-20931,

2016. 査読有

Conserved roles of fibroblast growth factor receptor 2 signaling in the regulation of inner cell mass development in bovine blastocysts. Akizawa H., Nagatomo H., Odagiri H., Kohri N., Yamauchi N., Yanagawa Y., Nagano M., Takahashi M., and Kawahara M. *Molecular Reproduction and Development*, 83: 516-525, 2016. 査読有

Requirement for nuclear autoantigenic sperm protein mRNA expression in bovine preimplantation development. Nagatomo H., Kohri N., Akizawa H., Hoshino Y., Yamauchi N., Kono T., Takahashi M., and Kawahara M. *Animal Science Journal*, 87: 457-461, 2016. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

ウシ-マウス間ミトコンドリアヘテロプラスミー胚の栄養膜細胞形成能. 詫間光, 小松雅也, 唄花子, 高橋昌志, 小川英彦, 川原学. 日本生殖発生医学会 第13回学術集会 (東京), 2018.

Intracellular localizations of *CDX2*, *TEAD4*, and *YAP* proteins during preimplantation development in cattle. Nanami Kohri, Shinjiro Kagawa, Hanako Bai, Masashi Takahashi and Manabu Kawahara. 50th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Washington D.C. (USA), 2017.

Effects of downregulating connective tissue growth factor transcripts on preimplantation development of bovine embryos. Hiroki Akizawa, Ayari Sada, Hiroaki Nagatomo, Hanako Bai, Masashi Takahashi and Manabu Kawahara. 50th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Washington D.C. (USA), 2017.

発情期及び妊娠認識時のウシ子宮組織におけるオートファジー-カテプシン関連因子の発現動態. 鈴木惇文, 白水貴大, 岩野弘暉, 小木曾貴季, 山内伸彦, 柳川洋二郎, 永野昌志, 唄花子, 川原学, 高橋昌志. 日本繁殖生物学会 (神奈川県相模原市), 2016.

マウス胎子の倍数性変化がインプリント遺伝子発現とDMRメチル化状態に及ぼす影響. 山崎渉, 天野朋子, 唄花子, 高橋昌志, 川原学. 日本繁殖生物学会 (神奈川県相模原市), 2016.

サブユニット特異的なI型インターフェロン(IFN)受容体発現抑制によるIFN-シグナル関連遺伝子発現への影響. 白水貴大, 鈴木惇文, 岩野弘暉, 小木曾貴季, 金星佑, 唄花子, 川原学, 木村康二, 高橋昌志. 日本繁殖生物学会 (神奈川県相模原市), 2016.

MII 期核置換による再構築卵母細胞由来マウスの出生後の生存性. 椎名浩己, 唄花子, 高橋昌志, 川原学. 日本卵子学会 (新潟県新潟市), 2016 年.

Pryidoxine supplementation during oocyte maturation improves the development and quality of bovine preimplantation embryos. Mansour Aboelenain, Ahmed-Zaky Balboula, Manabu Kawahara, Abd El-Monem Montaser, Samy MoawadZaabel, Sung-WooKim, Masashi Nagano, Masashi Takahashi. 日本繁殖生物学会 (神奈川県相模原市), 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等  
<http://lab.agr.hokudai.ac.jp/anim/breed/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川原 学 (KAWAHARA, Manabu)  
北海道大学大学院農学研究院・准教授  
研究者番号 : 70468700

(2) 研究分担者

小川 英彦 (OGAWA, Hidehiko)  
東京農業大学応用生物科学部・教授  
研究者番号 : 20339089

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

( )