

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15702

研究課題名（和文）ラットの着床前胚におけるミトコンドリア活性に関する研究

研究課題名（英文）Studies on mitochondrial activity in rat preimplantation embryos

研究代表者

中村 和臣（NAKAMURA, Kazuomi）

鳥取大学・医学部・特命助教

研究者番号：90598137

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリア外膜透過性促進遺伝子（Bax, Bak1）に焦点を当て、体外培養したラット胚と体内発生したラット胚におけるこれらの遺伝子発現をqPCR解析により比較したところ、体外培養胚において、両遺伝子とも有意に高発現していた。さらに、ゲノム編集によって、これらの遺伝子を破壊したラット胚を作製し、DNAの断片化を観察したところ、Bak1を破壊しても体外培養によって誘導されるDNAの断片化は抑制されないが、Baxを破壊すると抑制された。これにより、体外培養したラット着床前胚においては、Bax依存性のミトコンドリア経路アポトーシスが起きていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体外培養したラット着床前胚においては、Baxの高発現がアポトーシスを誘導し、著しいDNAの断片化が起こることがわかった。今後は、Baxの高発現を誘導しているさらに上流の要因を探ることが重要である。これを解明することができれば、体外培養してもその後の発生が阻害されることのない新たな培養法の確立へ繋がり、さらには遺伝子組換えラットの作製効率の向上によって、医学・生命科学研究の発展に寄与する。

研究成果の概要（英文）：Focusing on genes that promote mitochondrial outer membrane permeabilization (Bax, Bak1), the expression of these genes in in vitro cultured and in vivo developed rat embryos was compared by qPCR analysis. The results showed that both genes were significantly up-regulated in rat embryos cultured in vitro. Furthermore, DNA fragmentation was assessed in rat embryos in which these genes were disrupted by genome editing technique. Disruption of Bax suppressed DNA fragmentation induced by in vitro culture, but Bak1 did not. This revealed that Bax-dependent mitochondrial apoptosis pathway was activated in rat preimplantation embryos cultured in vitro.

研究分野：発生工学

キーワード：ラット着床前胚 アポトーシス Bax 体外培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ラットの着床前胚の体外培養は難しい。ラット着床前胚は、1細胞期から胚盤胞期まで体外培養によって発生させることができる。しかし、体外培養によって得られた胚盤胞を仮親の子宮に戻した際の発生(着床後の発生)が著しく阻害される。この原因は未だに解明されていない。それまでの研究におけるコメットアッセイの結果、体外培養したラット着床前胚においては、著しいDNAの断片化が引き起こされていることが確認されていた。このDNAの断片化の程度は非常に高度であり、着床後の発生に不利であることは想像に難くない。さらに、次世代シーケンサー(next generation sequencing: NGS)を用いた網羅的遺伝子発現解析から、体外培養したラット着床前胚において、アポトーシス関連遺伝子の発現変動が確認された。一般的に、アポトーシスには、2つの経路が存在することが知られている。一つは、細胞外からのアポトーシスシグナル(所謂デスリガンド)を受け取り、アポトーシス執行者たるカスパーゼに伝達するExtrinsic pathwayである。二つ目は、酸化ストレスなどの刺激を受けてミトコンドリア外膜の透過性が増し(mitochondrial outer membrane permeabilization: MOMP)、ミトコンドリア内のシトクロムCが放出され、カスパーゼにアポトーシスシグナルを伝達するIntrinsic pathway(ミトコンドリア経路)である。体外培養胚においては、特にミトコンドリア経路に関与し、アポトーシス促進的に働く*Bax*, *Bak1*, *Bid*などの発現が上昇していることがNGS解析によって確認されていた。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、体外培養しても着床後の発生が阻害されないラット着床前胚の体外培養法の確立である。研究代表者のこれまでの研究知見から「ミトコンドリア」に着目した。

(1) 上述のミトコンドリア経路アポトーシスに関連する遺伝子群の発現変動と、DNAの断片化との関連性を明らかにするために、同経路アポトーシスに関連する遺伝子群の詳細な遺伝子発現解析を行い、さらに、アポトーシスによるDNAの断片化を検出するTUNEL染色解析を行う。高発現しているミトコンドリア経路アポトーシス関連遺伝子をCRISPR/Cas9システムによって破壊し、TUNEL解析を行うことで、アポトーシスのトリガーとなっている遺伝子を同定する。

(2) ミトコンドリア経路アポトーシスと体外培養胚にて観察されるDNAの断片化に関連性があるとして、その要因について探るため、体外培養胚におけるエネルギー代謝(ミトコンドリア機能)を解析する。ATPの存在を蛍光によって検出するFRETシステムを利用し、ミトコンドリアの機能を可視化する。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア経路アポトーシスに関連する遺伝子群のqPCR解析

Wistarラットを交配させ、妊娠0.5日目に受精卵(1細胞期)を採卵した。受精卵を96時間以上培養した後、qPCR解析まで-80度に保存した。同様にWistarラットを交配させ、妊娠3.5日目に胚盤胞を採卵した後、-80度に保存した。RNA抽出キットを利用し、Total RNAを抽出・精製し、逆転写酵素によってcDNAを合成した。このcDNAをqPCR解析に供した。*Bax*, *Bak1*, *Bid*, *Aifm1*, *Bcl2*, *Cttd*, *Cycc*, *Tp53*遺伝子の発現を解析し、体内発生胚と体外発生胚を比較した。

(2) TUNEL解析によるDNAの断片化の解析

Wistarラットを交配させ、妊娠0.5日目に受精卵(1細胞期)を採卵した。受精卵を96時間以上培養した後、4%パラホルムアルデヒドで固定した。同様にWistarラットを交配させ、妊娠3.5日目に胚盤胞を採卵した後、4%パラホルムアルデヒドで固定した。固定した胚をTUNEL染色に供した。染色した胚は、共焦点顕微鏡によって撮像した。得られたz-stack画像から3D画像を作成し、TUNEL染色領域の体積を測定し、体内発生胚と体外培養胚を比較した。

(3) CRISPR/Cas9システムを利用した遺伝子破壊実験によるアポトーシス誘導因子の同定

*Bax*および*Bak1*をターゲットとして、両遺伝子のCRISPR guideRNA(gRNA)を作成した。Wistarラットを交配させ、妊娠0.5日目に受精卵(1細胞期)を採卵した。gRNAとCas9ヌクレアーゼを受精卵の前核に顕微注入した後、96時間培養した。比較対照として、gRNAを含まないCas9溶液を顕微注入し、同様に96時間培養した。培養した胚は、qPCR解析のために-80度に保存、または、TUNEL解析のために4%パラホルムアルデヒドで固定した。

CRISPR/Cas9システムによって*Bax*, または*Bak1*遺伝子が破壊されているか確認するため、両遺伝子のqPCR解析を行った。

*Bax*または*Bak1*を破壊することによって、体外培養したラット着床前胚で起こるDNAの断片化がどのように変化するかをTUNEL染色によって検討した。

(4) FRETシステムを利用したATPの可視化によるミトコンドリア機能の解析

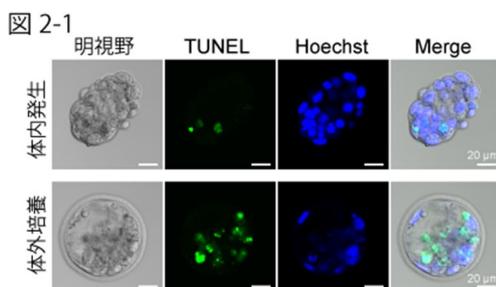
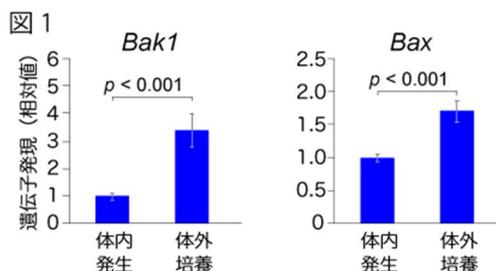
ATPの可視化が可能なFRETシステム(cDNA encoding ATeam biosensor proteins, Imamura H

et al., PNAS 2009) を入手し、CAG プロモーターで ATeam がドライブされるトランスジーンコンストラクトを作製した。Wistar ラットを交配させ、妊娠 0.5 日目に受精卵 (1 細胞期) を採卵した。受精卵の前核にトランスジーンを注入し、受精卵を仮親の卵管に戻し、ATEam-Tg ラットを作成した。

4. 研究成果

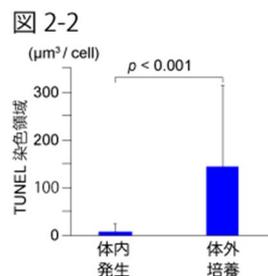
(1) ミトコンドリア経路アポトーシスに関連する遺伝子群の qPCR 解析

体外培養胚において、*Bax*, *Bak1*, *Aifm1*, *Cttd* の発現が有意に上昇していた。*Bcl2* の発現は検出限界以下であった。また、*Tp53* の発現は、体外培養胚において、有意に低下していた。*Bid* および *Cycc* の発現に差はなかった。Korsmeyer の提唱した "rheostat model" によれば、pro-apoptotic member (*Bak1*, *Bax*) と anti-apoptotic member (*Bcl2*, *Bcl2l1*) の化学量論的比率によって、MOMP が制御される (Korsmeyer SJ et al., Semin Cancer Biol 1993, Oltval ZN et al., Cell 1993)。*Bcl2* の発現が両群とも極めて低いため、pro-, anti-apoptotic member のバランスが崩れ、アポトーシスが誘導されている可能性が考えられるが、両メンバー遺伝子は他にも何種類か存在するため、この点はさらに詳細な遺伝子発現解析が必要である。一方、MOMP の制御に直接関わる *Bax*, *Bak1* の遺伝子発現は明らかに体外培養胚にて高発現であったため (図 1)、この二つの遺伝子に着目して研究を進めた。



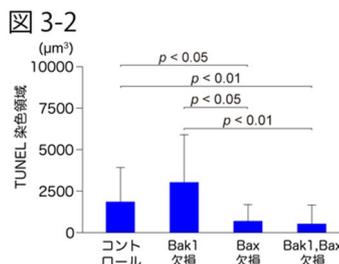
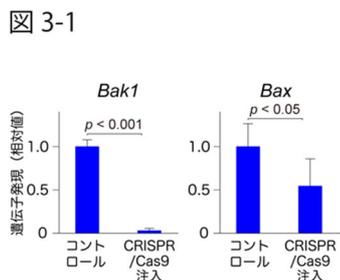
(2) TUNEL 染色による DNA の断片化の解析

体外培養胚と体内発生胚の TUNEL 染色領域を比較すると、明らかに体外培養胚にて DNA の断片化が亢進していた (図 2-1, 2-2)。上記の遺伝子発現解析の結果からも、体外培養胚においては、ミトコンドリア経路アポトーシスによる DNA 損傷が引き起こされている可能性が高まった。



(3) CRISPR/Cas9 システムを利用した遺伝子破壊実験によるアポトーシス誘導因子の同定

CRISPR gRNA と Cas9 ヌクレアーゼの注入による *Bax*, および *Bak1* の破壊を試み、qPCR 解析した結果、両遺伝子の発現は低下していた (図 3-1)。これは、CRISPR/Cas9 システムによって両遺伝子破壊が成功していることを示唆した。TUNEL 解析の結果、*Bak1* を破壊しても体外培養胚にみられる高度な DNA の断片化が抑制されることはなかったが、*Bax* を破壊すると抑制された (図 3-2)。このことは、体外培養胚において、*Bax* 依存のアポトーシスが引き起こされていることを示唆した。



(4) FRET システムを利用した ATP の可視化によるミトコンドリア機能の解析

トランスジーンを受精卵の前核に注入して Tg ラットの作成を数回試みたが、トランスジーンがインテグレートされた Founder ラットは確認できたものの、早期 (Germline transmission の確認前) に死亡した。一般的にトランスジェニック動物では、トランスジーンがゲノムのどこか 1 箇所に、タンデムに複数コピー導入される。研究代表者が試みた作成法では、多コピー導入により毒性が強く、胚または個体にダメージがあったのではないかと考察している。改善策として、今後、トランスジーンの入力濃度を下げるか、CRISPR/Cas9 システムを利用したノックインによる 1 コピー導入等が有効策になるのではないかと考えられる。

総括

本研究において、ラット着床前胚を体外培養すると、*Bax*の高発現によるアポトーシスが誘導され、DNAの断片化が引き起こされることが明らかになった。一方、アポトーシス自体は胚の正常発生に必要な生命現象である。したがって、*Bax*の高発現は「異常」なものではなく、むしろ、体外培養環境の何らかの悪影響によって「正常」に*Bax*の高発現が誘導されたと考えることが妥当である。つまり、*Bax*の高発現によるアポトーシスは、体外培養胚に起こる発生阻害の「原因」ではなく、「結果」であるということである。今後、*Bax*の高発現を誘導するさらに上流の経路・要因を探ることが重要であり、これが解明できれば、体外培養してもその後の発生が阻害されることのない新たな体外培養法を見出せるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村和臣, 妹尾美砂子, 吉村祐貴, 鈴木治
2. 発表標題 ラット着床前胚における網羅的遺伝子発現解析
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村和臣, 妹尾美砂子, 吉村祐貴, 鈴木治
2. 発表標題 体外培養環境はラット着床前胚のミトコンドリア経路アポトーシスを誘導する
3. 学会等名 第70回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2023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
---------	---------