

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860184

研究課題名(和文)哺乳類卵子及び受精卵の代謝調節機構と老化メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanism of metabolic regulation and aging in mammalian eggs

## 研究代表者

河村 悠美子(Kawamura, Yumiko)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：70599779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：代謝調節関連因子であるSirt3に注目し、本研究ではマウスの老化卵子やSirt3欠損卵子、Sirt3過剰発現卵子を解析に用いて代謝と遺伝子発現と卵子の質との関係を明らかにすること、さらにSirt3機能補助による老化卵子の質の改善の可能性を検討すること、Sirt3の活性化方法を探索することを目的とし、発生物学的な手法及び分子生物学的な手法を用いて研究を行った。

研究期間を通じて、Sirt3の発現制御の一端を明らかにするとともに、Sirt3が卵子の老化の抑制に機能し、Sirt3の補助により胚発生能を改善できる可能性を見いだした。この結果は生殖補助医療技術の改善に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed to unveil the relation between the alteration in metabolism and gene expression and the deterioration of oocyte quality with increasing maternal age. For this purpose, we focused on Sirt3, which regulates mitochondrial functions in mouse early embryos. We used Sirt3 knockout, Sirt3 overexpression and wild type mice of varying age and compared the aging related phenotypes in oocytes and zygotes. During the study period, although we could not reveal the metabolic and transcriptional alterations by originally intended methods because of the limitation of sample number, nonetheless we found that mitochondrial functions declined with aging but excessive Sirt3 could compensate the decline and keep the oocyte quality with high developmental competency even after getting older. We revealed also a part of Sirt3 expression regulation mechanisms. These results would help us understand oocyte physiology and contribute to improving reproductive technology.

研究分野：Reproductive biology

キーワード：Mitochondria Sirtuin Aging

## 1. 研究開始当初の背景

近年の女性のライフスタイルの変化に伴う晩婚化・晩産化の傾向は、我が国をはじめ先進諸国における少子化の大きな要因であると考えられている。晩産化により生涯出産数が少なくなるのみならず、年齢とともに正常出産率が低下することも顕在化してきている。このような状況において、体外受精をはじめとする生殖補助医療の高い年齢層における需要が増加してきているが、その成功率は母体の年齢とともに低下することが知られる。こうした加齢に伴う妊娠成立や正常出産率の低下、さらにはトリソミーなどの染色体異常性の増加は卵子の質の低下が主な原因と考えられており、その質的低下に活性酸素種 (ROS) やミトコンドリアの機能低下などの関与が指摘されているが、その具体的な分子メカニズムに関しては不明な点が多く残されている。

NAD<sup>+</sup>依存性脱アセチル化酵素 Sirtuin はエネルギー代謝状態と細胞機能との橋渡し分子として老化・代謝調節・発癌などさまざまな生命現象に関与することが明らかにされてきている。これまでに申請者は Sirtuin ファミリーのうちミトコンドリアで主に機能を発揮することが知られる Sirt3 に注目し、マウス着床前胚発生における役割を追求してきた。その結果、Sirt3 がミトコンドリアの機能調節を介して、体外受精・培養に伴って生じる ROS による細胞傷害性酸化ストレスに対して防御的に機能し、初期胚発生の進行に寄与していることを示してきた。(Kawamura Y et al., J Clin Invest, 2010)。また、申請者は卵子における Sirt3 発現レベルが母体の加齢とともに低下すること、卵子に Sirt3 mRNA を顕微注入すると過酸化水素水 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 処理による酸化ストレス刺激下での受精後胚発生率が改善すること、老化卵子に Sirt3 mRNA を顕微注入することによって受精後の胚盤胞形成率が有意に改善することを見出している。

ミトコンドリアの最も重要な機能としてはエネルギー代謝が挙げられる。初期胚においてエネルギー代謝状態は厳密に調節されており、体細胞と同様に初期胚においてもミトコンドリアはエネルギー代謝に役割を担う。その機能異常はミトコンドリアからの ROS の産生の増加につながるという観点からも、初期胚にとってミトコンドリアが正常に機能することは必須と言える。Sirt3 はミトコンドリア機能調節に非常に密接に関与している分子であることから、Sirt3 遺伝子を欠損、強制発現させることで、ミトコンドリア機能を人為的に変化させることが可能であると考えられた。そこで申請者は Sirt3 を組織特異的に過剰に発現させることが可能なマウス系統の樹立を行ってきた。

本研究はこれらの成果と知見を背景に、加齢マウスや Sirt3 遺伝子改変マウスを用いて、卵子老化に伴う質的变化のメカニズムを探

り、その改善により正常な妊娠成立と出産を可能にする道筋を開拓することを目標として計画されたものである。

## 2. 研究の目的

本研究では前述の背景を基に、加齢マウスや Sirt3 遺伝子改変マウスを用いて、卵子老化に伴う質的变化のメカニズムを探り、その改善により正常な妊娠成立と出産を可能にする道筋を開拓することを目的とした。具体的には以下の3点に焦点を当てた。

### (1) 卵子の老化と細胞内代謝状態及びミトコンドリア機能との関連の解明:

排卵後の卵子はピルビン酸を主体とした嫌気性の呼吸をしており、8 細胞期以降にグルコースを利用した代謝を開始する。一方、電子伝達系を利用した好気性代謝は、機能はしているが、非常に低いレベルに抑えられている。この代謝変化は厳密に調節されており、異常をきたすと胚発生が阻害されることが知られている(Wakefield, S. L. et al., Biol Reprod., 2010)。加齢卵子と若齢卵子、排卵後老化卵子、Sirt3 過剰発現卵子及び各々の受精卵で代謝状態の比較を行い、老化と代謝、ミトコンドリア機能との関連を明らかにする。

### (2) 卵子の老化に伴う遺伝子発現変化の検討:

老化卵子と若齢卵子を比較して、どのような遺伝子に変化があるのかを網羅的に検討する。特に代謝に関わる遺伝子群の変動に注目する。作成した Sirt3 を過剰に発現させた加齢マウス由来の卵子が高い発生能を有する場合には、野生型老化卵子と比較して発現量や発現パターンが顕著に異なる遺伝子は、初期胚発生に重要であることが示唆される。

### (3) Sirt3 の発現制御機構の解明:

マウス個体及び初期胚における Sirt3 機能補助(発現増強)による老化卵子の質の改善、胚発生能の改善の可能性を検討するとともに、改善するならば、生殖補助医療等への応用を視野にいれて内因性の Sirt3 の遺伝子発現調節機構を明らかにし、薬剤など介入による活性化方法を探索することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 卵子の老化とミトコンドリア機能との関連の解明:

Cre 依存性 Sirt3 高発現ノックインマウス表現型の卵子形成期及び着床前期における解析を行い、野生型加齢マウス、野生型若齢マウス、Sirt3 遺伝子欠損マウスにおける表現型との比較を行う。

具体的には作成した Cre タンパク質依存性 Sirt3 発現マウスを卵特異的 Cre 発現マウスである ZP3-Cre ラインと交配し、ノックインアリルおよび Cre アリル両方を有する雌マウ

スにおける卵子の加齢変化を検討する。さらにその次世代である全身で Sirt3 を高発現するマウスに関しても同様に加齢変化を検討する。排卵数の加齢変化、ミトコンドリアの活性、分布、ミトコンドリア DNA の加齢変化、初期胚発生率などが比較項目である。

排卵数に関してはこれまでの研究から 12 ヶ月齢を越えると野生型の C57BL/6N マウスでは一匹あたりの過排卵後の平均排卵数が 10 個を下回ることが分かっている。本研究においては 13 ヶ月齢において加齢群の排卵数を比較する。

ミトコンドリアの活性及び細胞内分布に関してはミトコンドリアプローブである MitoTracker および JC-1 で卵を染色し、蛍光観察によりその蛍光輝度及び分布を観察する。

ミトコンドリア DNA の変異に関しては既報の論文において、高頻度に欠失が起こるとされている領域を PCR 法で検出する。また、ミトコンドリア DNA に関しては、加齢に伴いその数が減少することが示唆されていることから、卵においても同様であるか比較的頑強な領域を鋳型として PCR 法で検出、定量する。

#### **(2) 卵子の老化と細胞内代謝状態との関連の解明:**

老化卵子、若齢卵子、Sirt3 欠損卵子、Sirt3 過剰発現卵子及び各々の受精卵における細胞内代謝状態を、Flux アナライザーを用いて測定する。Flux アナライザーは細胞培養培地中の酸素濃度と水素イオン濃度を検知し、主要なエネルギー代謝経路である解凍系、ミトコンドリアによる好気呼吸の状態を無侵襲・好感度に経時的に計測することが可能であるとされている (Qian et al., Methods., 2010)。

#### **(3) 加齢に伴う卵子内遺伝子発現変化の検討:**

卵子における遺伝子発現レベル及び発現遺伝子を RNA-sequencing 法で網羅的に検出する。特に加齢マウスから採集できる卵子数に限りがあるため、1細胞レベルでの解析を目標として出来るかぎり少数細胞での実施を行う。

#### **(4) Sirt3 の発現制御の解明。**

UCSD Genome Bioinformatics のデータベースから、Sirt3 のゲノム上流領域で種間の保存性の高さを基に転写制御標的配列を絞り込む。また、東京大学 先端科学技術研究センター ゲノムサイエンス分野(油谷研究室)の協力のもと、既存の ChIP-Seq データベースからも結合転写因子の候補を絞り込む (Xiaohui et al., PNAS., 2007)(Jolma et al., Cell., 2013)。

BAC ライブラリーからクローニングした候補配列を Luciferase ベクターに組み込み Luc アッセイを行い、転写の活性または抑制に重要な配列を特定する。絞り込んだ候補結合転写因子が実際に結合し、Sirt3 の発現制御に関与しているのかを ChIP 及び RT-PCR 法で検討する。

#### **4. 研究成果**

##### **(1) 卵子の老化とミトコンドリア機能との関連の解明:**

Sirt3 過剰発現マウスの過排卵処理後の排卵数を 13 ヶ月加齢マウスで評価した結果、コントロール群である野生型加齢マウスと比較して、卵細胞特異的過剰発現マウス及び全身性過剰発現マウスともに、平均で約3倍の個数の卵を排卵するという結果を得た。また、13 ヶ月齢の野生型マウスでは全く排卵しないマウスが多数存在するが、過剰発現マウスでは、排卵数に個体差はあるものの、全く排卵しないマウスは存在しなかった。

ミトコンドリアの分布及び活性においても過剰発現マウス卵子において質的劣化が抑制されているという結果を得た。野生型加齢卵子では活性の低下及び細胞質内での散在した分布及びミトコンドリアのアグリゲーションが観察されるのに対し、過剰発現卵子では染色体近傍への集積及び活性を示す蛍光が観察された。

ミトコンドリア DNA の変異に関しては 1 卵子レベルでの検出が十分可能であったが、必ずしも特定の部分にのみ欠失が起きるとは限らないこと、小規模な欠失や塩基の変異などは検出できないことなどから精度の高い結果を得られなかった。複数の部位の検討およびさらに詳細な解析に関しては次世代シーケンシングなど別の手法を選択する必要が考えられた。

##### **(2) 卵子の老化と細胞内代謝状態との関連の検討:**

Flux アナライザーの感度に期待したが、卵子及び受精卵の培養環境、及び加齢卵子の量的限界から本手法の適用が困難であることが分かった。しかしながら (1) - (1) において野生型加齢卵子においてはミトコンドリアの活性が低下していることから、ミトコンドリアを介した代謝が加齢の影響を受けて若齢とは異なっていることが推測された。

##### **(3) 加齢に伴う卵子内遺伝子発現変化の検討:**

採取した卵子から抽出した RNA をバイオアナライザーで品質検査したところ、特に野生型加齢卵子サンプルにおいて RNA の分解が進んでいた。RNA 抽出法を様々検討し、解析可能な量と質を確保できるようになった。現在、

解析準備中である。

#### (4) Sirt3の発現制御の解明:

Sirt3の転写を制御すると考えられるゲノム上流領域に対してLuciferaseアッセイを行い、発現制御に関わるゲノム領域を見いだした。*in silico*解析により絞り込んだ当該領域に結合すると考えられる転写因子群からさらに4因子に候補を絞り込み、その過剰発現によりSirt3の発現が活性化もしくは抑制されるかを検討した。その結果、4因子いずれもSirt3の発現の抑制または上昇に関わる因子であると考えられる結果を得た。しかしながら結合配列に変異をいれた場合でもその効果が相殺されなかったことから、別の協働する因子の存在が示唆された。過去の知見から、PGC1がその一つとして考えられたことから、PGC1と当該遺伝子が制御領域に結合し作用を及ぼしうるかをChIP-qPCR法により検討した。更なる詳細な検討が必要であるが、その結果は、候補因子とPGC1がSirt3発現制御領域上において相互作用し、Sirt3の発現制御に関与していることを示唆するものであった。

以上より、依然実験の細密化が必要な点が残されているが、一方でSirt3の発現制御の一端を明らかにし、またSirt3と卵子の加齢変化との関連を示し、Sirt3の量的補助による加齢卵子の質的改善の可能性を見いだしたことは、特に生殖補助医療技術の更なる向上への貢献という点において意義深いと考えられる。

#### 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 2 件)

Fu H, Wada-Hiraike O, Hirano M, Kawamura Y, Sakurabashi A, Shirane A, Morita Y, Isono W, Oishi H, Koga K, Oda K, Kawana K, Yano T, Kurihara H, Osuga Y, Fujii T., 「SIRT3 positively regulates the expression of folliculogenesis- and luteinization-related genes and progesterone secretion by manipulating oxidative stress in human luteinized granulosa cells」, *Endocrinology*., 査読あり, Aug;155(8):3079-87 (2014)., DOI : 10.1210/en.2014-1025.

Kitazawa T, Fujisawa K, Narboux-Nême N, Arima Y, Kawamura Y, Inoue T, Wada Y, Kohro T, Aburatani H, Kodama T, Kim KS, Sato T, Uchijima Y, Maeda K, Miyagawa-Tomita S, Minoux M, Rijli FM, Levi G, Kurihara Y, Kurihara H., 「Distinct effects of Hoxa2 overexpression in cranial neural crest populations reveal that the mammalian hyomandibular-ceratohyal

boundary maps within the styloid process.」, *Developmental Biology*., 査読あり, Jun 15;402(2):162-74., (2015)., DOI : 10.1016/j.ydbio.2015.04.007.

〔学会発表〕(計 2 件)

栗原裕基、「Role of Sirt3 in early embryogenesis」, IFFS/JSRM International Meeting 2015、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

河村 悠美子、「腫瘍形成における Sirt3 の二面的役割」, 第12回 東京呼吸器リサーチフォーラム、霞ヶ関コモンゲート西館 (東京都千代田区)

〔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://www.bio.m.u-tokyo.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

河村 悠美子 (KAWAMURA, Yumiko)  
東京大学・大学院医学系研究科・研究員  
研究者番号: 70599779

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

栗原 裕基 ( KURIHARA, Hiroki )  
東京大学大学院医学系研究科・教授  
研究者番号： 20221947

和田 洋一郎 ( WADA, Yoichiro )  
東京大学アイソトープセンター・教授  
研究者番号： 10322033

栗原 由紀子 ( KURIHARA, Yukiko )  
東京大学大学院医学系研究科・講師  
研究者番号： 80345040

内島 泰信 ( UCHIJIMA, Yasunobu )  
東京大学大学院医学系研究科・助手  
研究者番号： 90272426

大里 直樹 ( OSATO, Naoki )  
東京大学先端科学技術研究センター・研究員  
研究者番号： 50509536