

東京農業大学

博士論文

体外成長・体外成熟卵母細胞における
発生支持能制御因子に関する研究

指導教員 尾畑 やよい

2021年

バイオサイエンス専攻

高島 友弥

目次

第一章 序論	1
付表および付図	
第二章 マウス IVG 至適酸素条件の決定とミトコンドリア動態の解析	
第一節 緒言	8
第二節 材料および方法	11
付表および付図	
第三節 結果	25
1. マウス IVG における至適酸素濃度の決定	
2. IVG 卵母細胞におけるミトコンドリア動態解析	
3. IVG 卵母細胞におけるミトコンドリア機能解析	
4. IVG 卵母細胞におけるマイトファジーと発生能解析	
5. 母性ミトコンドリアが発生能に与える影響の解析	
第四節 考察	35
付表および付図	
第三章 卵母細胞の発生能に寄与しうる分子経路の同定	
第一節 緒言	60
第二節 材料および方法	62
第三節 結果	68
1. 5%、7%、10%および 20%酸素条件 IVG 卵母細胞および <i>in vivo</i> 卵母細胞の 遺伝子発現プロファイル解析	
2. 20%酸素条件 IVG 卵母細胞に特異的な発現異常遺伝子の解析	
3. ミトコンドリア関連遺伝子の発現解析	
4. 卵母細胞セラミド含有量の定量解析	
5. セラミド合成阻害剤およびスフィンゴシンーリン酸の添加 IVG 卵母細胞の 発生能解析	
第四節 考察	75

付表および付図

第四章 正常な卵母細胞の遺伝子発現プロファイルを導くマスター遺伝子の推定

第一節 緒言 92

第二節 材料および方法 94

第三節 結果 95

1. IVG 卵母細胞において共通して異常発現を示す遺伝子
2. *in vivo* 様遺伝子発現プロファイルを有する IVG 卵母細胞の解析
3. *Nobox* が卵母細胞遺伝子発現プロファイルに与える影響の解析

第四節 考察 100

付表および付図

第五章 総合考察 113

第六章 総括 118

Summary 126

謝辞 141

参考文献 142

第一章 序論

哺乳動物における生命の連続性は堅牢な配偶子形成、受精および胚発生により支持される。雌性生殖細胞である卵子の前駆細胞にあたる始原生殖細胞は、マウスにおいて胎齡 6.25 日 (embryonic days 6.25; E 6.25) 胚近位エピブラスト領域において *Blimp1* および *Prdm14* 共陽性細胞として出現する (Ginsburg *et al.* 1990, Saitou *et al.* 2005, Saitou *et al.* 2012, Matsui & Mochizuki 2014)。その後、体細胞分裂により増殖しながら予定生殖巣へ移動する (Saitou *et al.* 2012, Tanaka & Nishinakamura 2014)。胚体の性決定が生じる E12.5 までにほとんどの始原生殖細胞は移動を完了し、生殖巣環境の性に従って性特異的分化を開始する (Albrecht & Eicher 2001, Adams & McLaren 2002)。性特異的分化後の E14.5 卵巣では中腎から分泌されたレチノイン酸を雌性始原生殖細胞が受容することで、体細胞分裂から減数分裂へと細胞分裂様式が移行し、卵母細胞へと分化する (McLaren 1984, Oulad-Abdelghani *et al.* 1996, Koubova *et al.* 2006)。その後、複数の卵母細胞を扁平な支持細胞が囲うシスト構造が見られるようになる (Pepling & Spradling 2001)。出生後、このシスト構造が崩壊し、一つ一つの卵母細胞が支持細胞に囲まれた原始卵胞が形成され、生涯において卵母細胞成長が誘起されるまで休眠状態を維持する (Pepling & Spradling 1998, 2001)。また、原始卵胞が形成されるまでには全ての卵母細胞は第一減数分裂前期で停止する。一方、出生後まもなく、一群の原始卵胞が成長期へと移行すると、一次卵胞、二次卵胞および胞状卵胞へと順次発育していき、最終的に成長を完了したグラフ卵

胞へと至る。この卵胞成長と同調して卵母細胞の成長も進行し、非成長期卵母細胞は、成長期卵母細胞を経て、十分に成長した卵核胞 (Germinal vesicle: GV) 期卵母細胞に至る。非成長期卵母細胞が GV 期卵母細胞へと成長する過程は卵母細胞成長過程と呼ばれ、マウスではおよそ 3 週間、ヒトではおよそ 3 か月に及ぶ。グラーフ卵胞内の GV 期卵母細胞は、ホルモン刺激に応じて、排卵され、第一減数分裂を再開させ、第二減数分裂中 (Metaphase in the second meiosis; MII) 期まで減数分裂が進行し、受精可能な MII 期卵子へと成熟する。この GV 期卵母細胞が MII 期卵子へ移行する過程は卵母細胞成熟過程と呼ばれ、マウスでは半日、ヒトではおよそ 2 日を要する。

卵子は受精後の初期発生を保障する能力 (発生能) を有しており、この発生能の獲得は、卵母細胞への分化とは独立して、卵母細胞成長過程において生じる。そのため非成長期卵母細胞は発生能を有しておらず、成長を完了した GV 期卵母細胞においてはじめて完全な発生能が保障される。卵母細胞成長過程において細胞質中に貯蔵されるミトコンドリアなどの細胞小器官や様々な遺伝子の mRNA・タンパク質の卵母細胞成熟や胚発生能への寄与が報告されており、これらの因子は母性因子と総称されている (Zhang & Smith 2015)。卵母細胞成長に伴う細胞サイズの増加は、この母性因子の貯蔵を支持すると考えられており、マウス卵母細胞では成長を経ることで、細胞直径が 15 μm から 75 μm まで巨大化する (Hirao & Miyano 2008)。また細胞質への母性因子の貯蔵のみならず、正常な受精および胚発生に不可欠な卵子の構造的特徴である透明帯や細胞骨格も、この卵母細胞成長過程において獲得される。発生能獲得に向けて、成長期

卵母細胞では、母性因子として知られる *Nlrp5* や *Zar1*、*Ooep*、*Tle6* および透明帯や細胞骨格の構成タンパク質をコードする *Zp1* や *Zp2*、*Zp3*、*Actb* などの遺伝子が活発に転写および翻訳されることが知られる。他方で、母性因子として機能する代表的な細胞小器官であるミトコンドリアは、卵母細胞成長過程で積極的なミトコンドリア DNA の複製を行い、その一方で胚発生期間においてミトコンドリア DNA 複製を抑制することで、遺伝子的浮動によるミトコンドリア DNA 変異に伴ったヘテロプラスミーの危険性を最小限に抑えている (Cao *et al.* 2007)。このように卵母細胞成長過程はダイナミックな細胞の変化を伴い、大規模かつ堅牢な遺伝子発現制御ネットワークにより進行することが考えられる。しかしながら、母性因子や構造的タンパク質をコードする遺伝子の発現制御機構や、ミトコンドリア増殖の堅朗性を支持する分子機構は明らかとなっていない。これまでに母性因子である *Nlrp5* や *Zar1* などの遺伝子が、NOBOX や FIGLA に代表される卵母細胞成長期移行を制御する転写ネットワークの活性化後、透明帯タンパク質をコードする *Zp1* や *Zp2*、*Zp3* と同様に卵母細胞成長期特異的発現を誘導されたことから、卵母細胞における母性因子や構造的特徴の獲得などの卵母細胞成長過程における特異的遺伝子発現を中心的に制御する転写ネットワークの存在が示唆された (Hamazaki *et al.* 2021)。

他方で、これまでに卵母細胞・卵子の発生能獲得の起源の特定およびその体外再現を目的に卵母細胞の体外培養系が報告されてきた。その試みとしてまず卵母細胞成熟過程を体外再現する体外成熟培養 (*in vitro* maturation; IVM) が報告された。IVM は、ウサギ卵母細胞を用いて 1935 年に初めて報告され、次い

で、マウスやラット、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヒトなど様々な動物種における IVM が報告された (Pincus & Enzmann 1935, Eppig 1977, Hirao *et al.* 1994, Harada *et al.* 1997, Torre *et al.* 2006) その後、IVM と体外受精 (*in vitro* fertilization; IVF) および体外胚培養 (*in vitro* culture; IVC) を組み合わせることで、卵母細胞が有する成熟能および発生能の解析が可能となり、出生後 9 日齢マウス由来の初期成長期卵母細胞から出生後 21 日齢マウス由来の GV 期卵母細胞に至るまで、様々な成長段階における卵母細胞のコンピテンシーが検証され、卵母細胞成長に従った成熟能および発生能獲得の獲得が示された (Cross & Brinster 1970, Sorensen & Wassarman 1976, Wickramasinghe *et al.* 1991)。その一方で、Eppig は出生後 8 日齢マウス卵巣に由来する卵胞の 7 日間の体外培養により、成熟能を有する GV 期卵母細胞を作出する体外成長培養 (*in vitro* growth; IVG) を報告した (Pincus & Enzmann 1935, Eppig 1977, Hirao *et al.* 1994, Harada *et al.* 1997, Torre *et al.* 2006)。その後、ヒト、ウサギ、ウシおよびブタなどで IVG を用いた *in vitro* 卵母細胞の作出が報告された (Pincus & Enzmann 1935, Eppig 1977, Hirao *et al.* 1994, Harada *et al.* 1997, Torre *et al.* 2006)。これまでに IVG 培養法の検討も報告されてきており、その中で、培養酸素条件の低酸素化および IVG 培地への高分子化合物ポリビニルピロリドンの添加により顕著な発生能改善が示された (Eppig & Wigglesworth 1995, Hirao *et al.* 2004, Hirao *et al.* 2012, Mizumachi *et al.* 2018)。IVG をはじめとする IVM、IVF および IVC は通常 20%酸素濃度環境下で実施される。これは生殖器内酸素濃度 2 - 9%と比較すると高酸素状態であると考えられ、培養酸素環境による卵母細胞成長への悪影響が懸念されるが、現

在までに至適 IVG 培養酸素濃度の決定には至っていない (Fischer *et al.* 1992, Basini *et al.* 2004, Clark *et al.* 2006, de Castro *et al.* 2008, Redding *et al.* 2008)。

当研究室では、第一減数分裂前期移行前の E12.5 マウス胎仔期卵巣を *in vivo* における出生後 10 日齢 (post-partum 10 days; P10) に相当する 17 日間の器官培養を通して二次卵胞を獲得し、IVG と組み合わせることで機能的卵母細胞および産仔の作出に成功した (Morohaku *et al.* 2016)。また近年、マウスにおいて胚性幹細胞および人工多能性幹細胞より始原生殖細胞様細胞の分化誘導法が確立された (Hayashi *et al.* 2011, Hayashi *et al.* 2012)。分化誘導された始原生殖細胞様細胞とマウス胎仔期卵巣支持細胞を再凝集させ、器官培養および IVG に供試することにより機能的卵母細胞が作出され、これにより卵母細胞・卵子形成過程の全期間における体外再現が可能となった (Hayashi *et al.* 2017)。しかしこのような *in vitro* 卵母細胞の発生能は *in vivo* 卵母細胞と比較して低い (Morohaku *et al.* 2016)。これまでに当研究室では、E12.5 マウス胎仔に由来する培養 17 日目の卵巣、P0 マウスに由来する培養 10 日目の卵巣、および P10 マウス卵巣のそれぞれから二次卵胞を採取し、12-14 日間の IVG に続いて、17 時間の IVM を実施することにより成熟卵子を生産してきた。培養期間の長期化に伴った発生能の低下が予想されたが、これらの IVF により得られた受精卵はいずれの場合も 20%程度しか胚盤胞期胚まで発生できず、*in vivo* 卵母細胞の発生率 59%と比較して一様に低い発生能を示した (Figure1-1)。このことから *in vitro* 卵母細胞の発生率低下は、培養期間によらず、現行の IVG における卵母細胞の発生能獲得機構の

不完全性に起因することが示唆され、IVG 卵母細胞の発生能改善による *in vitro* 卵子作出全体における効率改善が期待された。

そこで本研究はマウス IVG の至適培養酸素濃度の検討およびその発生能改善を支持する分子生物学的制御機構の理解を目的とし、解析を実施した。

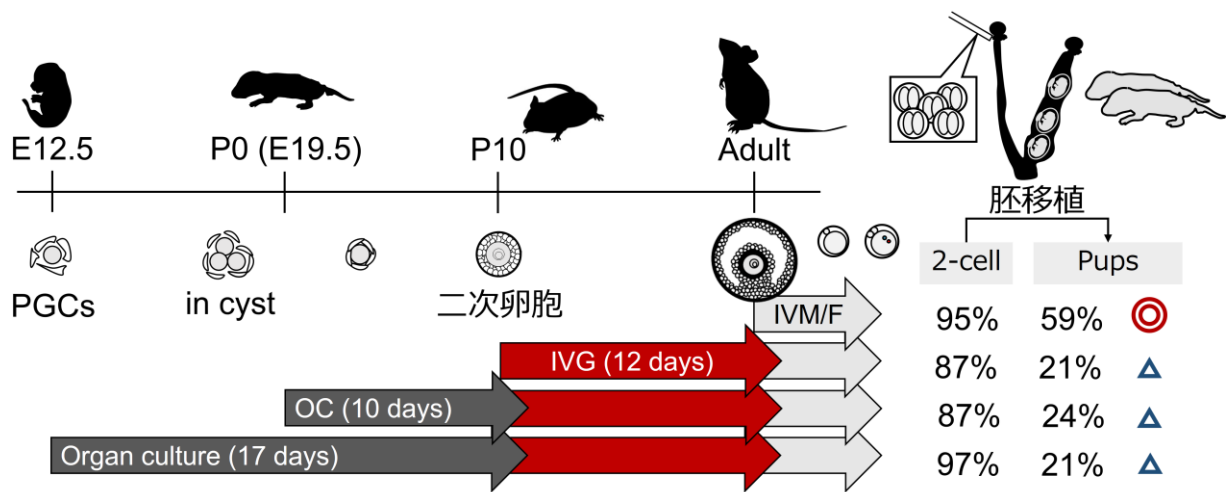


Figure 1-1. *in vitro*卵子の発生能解析

第二章 マウス IVG 至適酸素条件の決定とミトコンドリア動態の解析

第一節 緒言

マウス卵巣より採取した二次卵胞を体外で成長培養する IVG は卵母細胞成長過程を体外再現し、発生能を持たない成長期卵母細胞から機能的卵母細胞作出を可能とする。しかしながら IVG により作出された IVG 卵母細胞の成熟能および発生能は *in vivo* 卵母細胞と比べて有意に劣ることが報告された (Morohaku *et al.* 2016)。このことから、現行の IVG 卵母細胞の多くは、生殖に寄与する能力を有する完全な卵母細胞とは異質の不完全なものであることが示唆された。

IVG をはじめとし、IVM、IVF および IVC は通常 20%酸素濃度環境中で実施されるが、これは生殖器環境中における酸素濃度 2 - 9 %と比較すると高酸素状態であると言える。また、これまでに卵胞成長に伴った卵胞内酸素濃度の低下が報告されている (Fischer *et al.* 1992, Basini *et al.* 2004, Clark *et al.* 2006, de Castro *et al.* 2008, Redding *et al.* 2008)。卵胞成長に伴った卵胞周辺毛細血管の成長・複雑化が報告され、これらの血管網は卵胞内部への栄養やホルモン供給および不要物の排出の効率化を通じた卵母細胞成長への寄与が知られる。卵胞環境の低酸素化は顆粒膜細胞における Hypoxia inducible factor (HIF) 安定性を向上させ、HIF 下流の Vascular endothelial growth factor (VEGF) 発現誘導、およびそれに伴った成長卵胞への血管新生の誘起が報告されており、低酸素環境化は血管新生を介して卵母細胞成長へ寄与すると理解されている (Neeman *et al.* 1997)。一

方で、血管構造を有さないマウス二次卵胞の IVG において通常培養条件 20%酸素濃度と比較し、5%酸素濃度条件下における IVG 卵母細胞の成熟能および発生能の改善が報告された (Eppig & Wigglesworth 1995, Neeman *et al.* 1997, Hirao *et al.* 2012)。これにより血管新生を介さない別の機構によって低酸素環境が卵母細胞の成熟能および発生能獲得に寄与することが示唆された。一方で、雌性生殖器環境中の酸素濃度 2 - 9%に相当する範囲での詳細な培養酸素条件の検討は行われておらず、また発生能改善を支持する要因も不明である。

他方で母性因子として卵子細胞質を介して胚へ継承される細胞小器官の一つであるミトコンドリアは、卵母細胞成長過程において増殖し、その後の卵母細胞成熟過程で活発な ATP 合成を通して卵母細胞成熟の進行に寄与する (Yuan *et al.* 2016)。また胚へ継承されたミトコンドリアは将来の胎盤となる栄養外胚葉系列において強い酸化的リン酸化活性を示し、胚盤胞形成に寄与する (Houghton 2006)。

ミトコンドリアは ATP 生産時に電子供与体として酸素を利用するため、培養酸素環境とミトコンドリア活性は密接に関連する (Sung *et al.* 2010, Tiede *et al.* 2011)。これまでに様々な動物種の卵母細胞および胚で、低酸素培養によるミトコンドリア機能の改善を伴った成熟能および発生能の改善が報告されている (Pabon *et al.* 1989, Legge & Sellens 1991, Umaoka *et al.* 1992, Li & Foote 1993, Kitagawa *et al.* 2004, Iwamoto *et al.* 2005)。

そこで本実験では IVG 卵母細胞の発生能が最大化する至適酸素条件を検討するとともに、IVG 卵母細胞およびそれに由来する IVG 卵子におけるミトコンドリアの機能解析を行った。

第二節 材料および方法

1. 供試動物

本解析で用いたすべての成熟 BDF1 マウス（出生後 8 週目以降）は日本クレアより購入し、一週間以上の馴化後、解析に供試した。また DBA/2N と交配した妊娠 C57BL/6N マウスを日本クレアより購入し、飼育することで解析に供試する新生仔 BDF1 マウスを得た。これらすべてのマウスは午前 8 時点灯午後 8 時消灯 12 時間明暗周期、温度 20 - 26°C および湿度 40 - 60% 条件下の東京農業大学高次生命機能解析センターの SPF 区画にて飼育した。餌は滅菌済み固形飼料を、水は滅菌済み水道水を不断給餌し、自由摂取させた。本研究における全実験は、東京農業大学の動物実験指針に従った（動物実験計画承認番号：2020048）。

2. GV 期卵母細胞および MII 期卵子の採取

発情周期間期の成熟雌 BDF1 マウスに 5 IU pregnant mare serum gonadotropin (PMSG、ASKA) を腹腔内注射し、PMSG 処理を施した。PMSG 処理 44 - 48 時間後のマウスを頸椎脱臼により安楽死処理した。外科的手法を用いて卵巣を採取、240 μ M Dibutyryl-cAMP (dbcAMP、Sigma) 添加 M2 培地内で膨大化した卵胞からシリンジ針 (NIPRO) およびガラスキャピラリーを用いて未成熟 Cumulus Oocyte Complex (COC) を回収した。ガラスキャピラリーを用いたピペッティングにより卵丘細胞を完全に除去した GV 期卵母細胞のみを解析に供

試した。また PMSG 処理 44 - 48 時間後、5IU human chorionic gonadotropin (hCG、ASKA) を腹腔内注射することで過剰排卵処理を行った。hCG 腹腔内注射 15 - 17 時間後に頸椎脱臼により安楽死処理した過剰排卵処理マウスより外科的手法を用いて卵管を採取した。0.3 mg/ml ヒアルロニダーゼ / M2 培地内 (Sigma) でシリンジ針を用いて卵管膨大部より成熟 COC を採取した。ガラスキャピラリーを用いたピペッティングにより卵丘細胞を完全に除去し、第一極体放出が認められたものを MII 期卵子として解析に供試した。

3. 二次卵胞の単離および成長期卵母細胞の採取

直剪刀を用いた断頭により安楽死処理した P10 BDF1 マウスより外科的手法を用いて卵巣を摘出した。0.4%ポリビニルピロリドン (PVP、K36,000、Sigma) 添加 L15 培地中において、27G 注射針 (NIPRO) を用いて二次卵胞を単離した。採取した二次卵胞は、パラフィンオイルで覆った 0.1%コラゲナーゼ / L15 培地 200 μ l の微小滴にガラスキャピラリーを用いて移し、消化した (90 分、37°C)。ガラスキャピラリーを用いたピペッティングの後、可能な限りの培地を破棄し、新たに 0.05% トリプシン-EDTA (Sigma) 200 μ l を加え、消化した (10 分、37°C)。その後、ガラスキャピラリーによるピペッティングを行いながら、二次卵胞より露出した成長期卵母細胞を回収、十分量の M2 培地で洗浄した。採取した成長期卵母細胞は写真撮影および画像解析ソフトウェア ImageJ (Schneider *et al.* 2012) による解析を行い、採取した成長期卵母細胞のうち、GV が確認されたものを解析に供試した。

4. 体外成長培養 (IVG)

単離した二次卵胞を 0.1% コラゲナーゼ / L15 培地 (Sigma) により 28 分間の酵素処理後、十分量の 0.4% PVP 添加 L15 培地で洗浄した。処理後の二次卵胞を Transwell collagen-coated (Transwell-COL) インサートメンブレン (Corning) 上に整列させ、5% ウシ胎仔血清 (Fetal Bovine Serum; FBS, Sigma)、2% PVP、0.1 IU/mL 卵胞刺激ホルモン (FSH, MSD)、1.5 mM アスコルビン酸 (Tokyo Chemical Industry)、10 units/ml ペニシリンおよび 10 µg/ml ストレプトマイシン (Sigma) 添加 minimum essential medium alpha (alpha-MEM, Gibco) 中にて 12 日間培養し、培養 3、5、7、9 および 11 日目に半量の培地交換を実施した。培養に用いたインキュベーターは通常培養条件 20% 酸素濃度 (37°C、5% CO₂、95% Air) に加え、窒素充填による酸素分圧制御によって 5%、7% および 10% 酸素条件を設け、培養を行った。各酸素条件による作出卵母細胞は、その後の体外培養 (IVM、IVF および IVC) は IVG と同環境条件下で実施した。培養条件および試薬は過去の報告を参考にした (Morohaku *et al.* 2017)。なお本研究では IVG により作出された卵母細胞を IVG 卵母細胞と呼称し、その培養酸素条件に応じて、5%-IVG、7%-IVG、10%-IVG および 20%-IVG 卵母細胞とそれぞれ呼称した。

5. 体外成熟培養 (IVM)

採取した未成熟 COC を体外成熟培養培地; 5% FBS、0.1 IU/mL FSH、1.2 IU/mL hCG (ASKA)、4 ng/mL 上皮成長因子 (EGF、Gibco)、1.5 mM アスコルビン酸、10 units/ml ペニシリンおよび 10 µg/ml ストレプトマイシン添加 α-MEM にガラスキャピラリーを用いて移し、ウェル間の移動による洗浄を 2 回行った後、体外成熟培養培地 400 µl を加えた 4-well プレートにて 17 時間培養した。培養はインキュベーター内で行った。

6. 体外受精および胚培養 (IVF および IVC)

頸椎脱臼により安楽死処理した成熟 BDF1 マウス精巣状態尾部を採取した。脂肪組織や血液を除去した後、前培養用ディッシュのオイル中へピンセットを用いて沈め、シリンジ針を用いて精子塊を回収、TYH 培地 (LSI メディエンス) 微小滴 200 µl 中で 90 分間の前培養を実施した。精子添加直前にガラスキャピラリーを用いて成熟 COC を体外受精用 TYH 培地微小滴 (100 µl) に移した。前培養後の精子液をピペットマンによる Swim-up 法により回収し、体外受精用微小滴に添加した。添加精子量は、IVG 由来卵子の場合 1.5×10^5 、IVM 由来卵子の場合 2×10^5 、*in vivo* 由来卵子の場合 4×10^5 sperm / ml となるように調整した。インキュベーター内で 4 時間の IVF の後、TYH 微小滴中にて支持細胞および精子をガラスキャピラリーにより除去した。胚発生用 KSOM+AA (Merck) 微小滴 15 µl に卵子を移し、ガラスキャピラリーを用いた微小滴間の移動による洗浄

を三回以上行った。その後、2前核が見られたものを受精卵とし、KSOM+AA 1 μ l あたり 1-2 個となるように胚発生用培地に移動し、5 日間の培養および 24 時間おきの胚の形態観察を実施し、胚発生能を解析した。微小滴は 35 mm dish (Falcon) に作成し、十分量のオイル (ナカライテスク) で覆った。本実験に用いた全ての微小滴培地は前日より気相平衡し、使用した。発生成績は Tukey-kramer 法により検定を行った。

7. 蛍光プローブを用いたミトコンドリア機能の解析

GV 期卵母細胞および MII 期卵子のミトコンドリア局在およびミトコンドリア膜電位、ROS 蓄積量を MitoTracker DeepRed FM (Thermo)、JC-1 (cayman) および CellRox Green (Thermo) による特異的蛍光プローブ染色および共焦点顕微鏡を用いた蛍光輝度値測定により解析した。MitoTracker DeepRed は 100 nM、JC-1 は 10^{-2} 倍、CellRox Green は 500 nM となるように M2 培地で希釈し、染色用微小滴 30 μ l を調整、パラフィンオイルを被せ染色用微小滴を作成した。卵母細胞および卵子を染色用微小滴にガラスキャピラリーを用いて移し、MitoTracker DeepRed および CellRox Green は 1 時間、JC-1 は 15 分間インキュベーター内で静置した。静置後、十分量の M2 培地で洗浄し、ガラスボトムディッシュ (MatTek) に作成した観察用 M2 培地微小滴 5 μ l に移し、Nikon A1 共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon) および 20 倍対物レンズ CFI プランアポクロマート Lambda 20X (Nikon) を用いて z 軸 2.5 μ m ごとの蛍光画像を取得した。各サンプルの断

面積が最大となる z 軸における蛍光シグナルを画像解析ソフトウェア NIS-elements (Nikon) により解析し、ピクセルあたりの蛍光輝度値を取得した。各実験回の *in vivo* 群平均値で除算することで相対値を算出し、比較解析に供試した。全実験回を通して同一蛍光画像取得条件によりデータを取得した。なお GV 期卵母細胞を解析する際は M2 培地の代わりに 240 μ M dbcAMP 添加 M2 培地を使用し、染色・観察中の成熟を阻害した。また染色後の卵母細胞および卵子の操作は極力遮光環境化で行った。定量結果は Tukey-kramer 法により検定を行った。

8. GV 期卵母細胞のミトコンドリア局在のパターン解析

GV 期卵母細胞におけるミトコンドリア局在パターンを GV 周辺部 (perinuclear) および細胞膜周辺部 (cortical) の平均輝度値の比率をもとに分類した。MitoTracker DeepRed で染色した GV 期卵母細胞の蛍光観察データにおいて卵母細胞面積が最大化する z 軸を対象とした。ImageJ により単一卵母細胞を円形 ROI で指定し、crop したデータを解析した。ImageJ を用いて各卵母細胞のピクセルごとの輝度値、および GV 中心座標および GV 直径を取得した。これらのデータをもとに以下の計算式を参考に R を用いて解析領域の平均輝度値を算出した (Figure 2-1)。

9. GV 期卵母細胞のミトコンドリア DNA 抽出

単一のGV期卵母細胞およびMII期卵子から QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN) を用いてミトコンドリア DNA 含むトータル DNA を抽出した。プロナーゼ処理により透明帯を除去した卵母細胞および卵子を十分量のM2培地で洗浄後、ATL Lysis バッファー 15 μ l を含む 1.5 ml loBind tube (Eppendorf) にガラスキャピラリーを用いて移し入れた。proteinase K 10 μ l を加え、混和後、56°Cで90分間静置した。ATL Lysis バッファー 50 μ l、AL Lysis バッファー 25 μ l および 1 μ g/ μ l career RNA in AE バッファー 1 μ l を加え、混和した。さらに 100%エタノール 50 μ l を添加および混和し静置(5分、室温)後、全量を QIAamp MinElute column にアプライし、8,000 rpm で1分間遠心した。Flow-through を破棄した QIAamp MinElute column を AW1 および AW2 バッファー 500 μ l により洗浄した。14,000 rpm、3分間の遠心により乾燥させた QIAamp MinElute column に 40 μ l ddH₂O をアプライし、静置(2分、室温)した後、14,000 rpm で3分間の遠心を行い、ミトコンドリア DNA 抽出液を回収した。調整したミトコンドリア DNA 抽出液は使用まで-30°Cで保存した。

10. ミトコンドリア DNA コピー数定量解析

Taqman アッセイを用いた絶対定量法により単一卵母細胞および卵子におけるミトコンドリア DNA コピー数を測定する (Cao *et al.* 2007)。1サンプルあたり TaqMan Universal Master Mix II, with UNG (Thermo) 10 μ l、2.5 μ M Taqman probe 2 μ l、10 mM ミトコンドリア DNA 特異的フォワードプライマー 1 μ l および 10 mM ミトコンドリア DNA 特異的リバースプライマー 1 μ l を混和し 14 μ l の

qPCR 反応液 (20 μ l 反応系) を調整した。ここに 6 μ l の mtDNA 抽出液を添加し、PCR 反応に供試した (Table2-1)。サンプルと同時に増幅配列をクローニングしたプラスミドを用いて調整した希釈系列 (10^{-6} から 10^{-3} コピー) を供試した。PCR 反応 (50°C 2 分、95°C 10 分、95°C 10 秒・60°C \times 40、4°C ∞) およびデータ採取は QuantStudio 3 (Thermo) により実行した。スタンダードおよびサンプルは反復数 2 で解析し、平均 Ct 値を解析に用いた。反復間の Ct 値が 1 以上離れているサンプルは解析対象から除外した。定量結果は Tukey-kramer 法により検定を行った。

11. ミトコンドリア DNA 解析用プラスミドの調整

ミトコンドリア DNA コピー数解析においてスタンダードとして用いるプラスミドベクターを TA クローニングにより構築し、大腸菌への形質転換および培養、プラスミド抽出によって調整した。ミトコンドリアゲノムコピー数解析プライマーセットを用いて ddH₂O 27 μ l、10 \times PCR Buffer for KOD -Plus- Neo 5 μ l、2 mM dNTP 5 μ l、25 mM MgSO₄ 3 μ l、10 mM 特異的フォワードプライマー 1.5 μ l、10 mM 特異的リバースプライマー 1.5 μ l、KOD -Plus- Neo (1.0U/ μ l) 1 μ l および *in vivo* GV 期卵母細胞由来 mtDNA 抽出液 6 μ l と混和し、PCR 反応液 (50 μ l 反応系) を調整した。余熱したサーマルサイクラーを用いた PCR 反応 (94°C 2 分、98°C 10 秒・60°C 30 秒・68°C 20 秒 \times 25、4°C ∞) により得た PCR 産物のうち 45 μ l を 10 \times A-attachment mix (TOYOBO) 5 μ l と混和し、60°C 30 分間静置により DNA 断片両端に A 付加を行った。反応産物を 2%アガロースゲルによる電

気泳動（100V、30分）およびエチジウムブロマイド染色（30分）に供試し、特異的増幅の評価後、360 nm 紫外線下で目的バンドを切り出し、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up（TaKaRa）を用いてゲル抽出を行い、ddH₂O に溶出した。その後、Nanodrop 1000（Thermo）を用いて DNA 濃度測定を行い、T-easy vector 1 μl に対して等 mol 量となるように精製 DNA 量を ddH₂O で調整、2 × Rapid Ligation Buffer、T4 DNA Ligase（3 Weiss units/μl）と混和して、4°C overnight でライゲーション反応を実施した。コンピテントセル 50 μl にライゲーション反応液 2 - 4 μl 加え、氷上 30 分静置後、ウォーターバスを用いて 42°C、35 秒のヒートショックを与え、すぐに氷上に戻すことで形質転換を行った。形質転換大腸菌をアンピシリン添加 LB 平板上に播種し、37°Cにて培養した。翌日、colony PCR により目的 DNA 断片のインサーションが確認されたコロニーをアンピシリン添加 LB 液体培地にピックアップし、震盪培養（37°C、200 rpm、16 時間）を実施した。培養により得られた菌液は、GenElute Plasmid Miniprep Kit（Sigma）により 50 μl ddH₂O へ抽出した。Nanodrop1000 による濃度測定の後、SP6 プライマーおよび T7 プライマーを用いたサンガーシーケンスによりインサート配列の確認を行った。サンガーシーケンスは FASMAC に委託し、得られた配列データは、ATGC（GENETYXS）を用いて解析した。

12. ATP 定量解析

単一の成長期卵母細胞、GV 期卵母細胞および MII 期卵子から Intracellular ATP 測定キット Ver.2（東洋ビーネット）を用いて細胞内 ATP 含有量を定量解析した。

分取した卵母細胞・卵子を十分量の 0.1%ポリビニルアルコール (PVA、Sigma) 添加 PBS を用いて洗浄し、少量 (1 - 2 μl) の 0.1%PVA / PBS と共に 8 連チューブに移した。すぐに ATP 抽出試薬 100 μl を添加し、6 回のピペッティングによる混和後、室温・5 分静置した。静置後、再度 6 回のピペッティングを行い、ATP 抽出液を調整、以降は氷上で操作した。また同時に付属の ATP 標準試薬 ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$) を用いて希釈系列 (10^{-4} から 10^{-10} M) を調整した。白色 96 穴プレートに 10 μl ずつサンプルを加え、その後すぐにあらかじめ調整した ATP 発光試薬 100 μl を添加、SpectraMax i3 (モレキュラーデバイス) を用いて輝度値を解析した。スタンダードおよびサンプルは反復数 2 あるいは 3 で解析した。定量結果は Tukey-kramer 法により検定を行った。

13. 2細胞期胚におけるミトコンドリア膜電位解析

第二章二節-7 (蛍光プローブを用いたミトコンドリア機能の解析) 同様にして JC-1 プローブを用いて IVF 開始から 31 時間後における 2 細胞期胚を解析した。定量結果は t-検定により検定を行った。

14. 2細胞期胚におけるミトコンドリア量解析と発生能の解析

IVF 開始から 31 時間後における 2 細胞期胚を解析に供試した。100 nM MitoTracker Green FM / M2 培地 60 μl 中で 1 時間の染色後、十分量の M2 培地を用いて洗浄を行った。これらの胚を 35 mm dish (Falcon) に調整した観察用 M2 培地微小滴 5 μl に移し、BTX-Z 蛍光顕微鏡 (KEYENCE) で蛍光画像を、

NIS-Element (Nikon) により蛍光輝度値を取得し、MitoTracker シグナルをミトコンドリア量とした。データ取得後の胚は、個別化し、LinKID® micro25 培養用ディッシュ (DNP) に移し、IVF 開始 100 時間後まで胚培養を行い、胚発生能を蛍光輝度値とひも付けて追跡した。また IVF 開始 100 時間後における桑実期胚および胚盤胞期胚を 2 細胞期胚で計測したミトコンドリア量の平均値に対する多寡によって二群に分別し、レシピエント ICR マウスへの子宮移植を行った。性成熟 ICR 雌マウスを精管結紮 ICR 雄マウスと交配させレシピエントマウスとした。交尾後 18 日目にレシピエントマウスを頸椎脱臼により安楽死処理し、子宮を摘出後、着床痕および生存胚をカウントし、移植胚数に対する着床率および個体発生率を解析した。実験は二回行った。*in vivo* 胚と *in vitro* 胚に着目した解析では student の t-検定を、胚発生能は Tukey-kramer 法を、胚発生能は X^2 検定を用いて行った。

15. ラパマイシンおよび 3-メチルアデニン添加 IVM

IVM およびその後の発生能解析は、第二章二節-5 および第二章二節-6 に従って行った。培養は全て通常条件培養酸素 20%条件で実施し、供試した *in vitro* 卵母細胞は通常条件培養酸素 20%条件下の IVG 卵母細胞に由来した。ラパマイシン (Adipogen Life Sciences) は DMSO (nacalai) により溶解し、10 mM ストックを調整、3-メチルアデニン (3-MA、Sigma) は ddH₂O により 100 mM ストックを調整し、使用まで -30°C で暗所保存した。添加薬剤溶媒濃度が 1%以下と

なるよう溶媒を調整した薬剤添加 IVM 培地を用いて IVM を実施した。発生成績は Tukey 法により検定を行った。

Table 2-1. ミトコンドリア DNA コピー数解析に使用したプライマー

Oligo name	Sequence (5' to 3')
B6-for	AACCTGGCACTGAGTCACCA
B6-rev	GGGTCTGAGTGTATATATCATGAAGAGAAT
probe-B6	(FAM)-TCTGTAGCCCTTTTTGTCCACATGATC-(TAMRA)

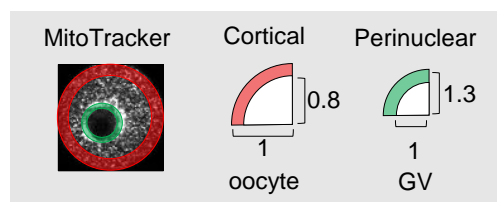


Figure 2-1. GV期卵母細胞におけるミトコンドリア局在解析手法の概略

MitoTracker染色および共焦点顕微鏡解析により得たGV期卵母細胞の蛍光画像から細胞膜周縁部（Cortical）およびGV周縁部（Perinuclear）それぞれの平均輝度値を取得した。cortical領域は卵母細胞直径80%-100%が描く円環領域を、perinuclear領域はGV直径の100%-130%が描く円環領域を解析対象とした。DOI: 10.1530/REP-21-0209

第三節 結果

1. マウス IVG における至適酸素濃度の決定

これまでにマウス IVG において培養酸素環境の低酸素化が作出卵母細胞の発生能向上へ寄与することが示された一方で、より詳細な至適酸素条件は検討されていない (Eppig & Wigglesworth 1995)。そこで通常酸素条件 (20%) に加え、5%、7%および 10%酸素環境下で IVG 卵母細胞を作出し、発生能解析を実施した。作出した IVG 卵母細胞を IVM および IVF に供試し、MII 期卵子への成熟能および胚盤胞期までの発生能を比較した。成熟率 (MII 期卵子数/培養卵胞数) は、5%酸素群で 76% (277/366)、7%酸素群で 83% (181/218)、10%酸素群で 94% (215/228)、20%酸素群で 93% (273/294) となり、5%酸素群および 7%酸素群において通常培養条件 20%群と比較して有意な成熟能の低下が認められた ($p<0.01$) (Figure2-2A)。その一方で発生率 (胚盤胞期胚数/受精卵数) は、5%酸素群は 77% (103/133)、7%酸素群は 84% (58/69)、10%酸素群は 54% (45/84)、20%酸素群は 60% (70/117) と、5%酸素群および 7%酸素群において他の群より有意な発生能改善が見られた ($p<0.01$) (Figure2-2B)。成熟率および発生率の乗算より得られる胚作出効率は、通常条件 20%酸素群の 56%と比較し、7%酸素群で 70%に及んだ。一方で 5%酸素群では 7%酸素群同様の胚発生能向上が認められたにもかかわらず、同時に成熟率の深刻な低下が生じ、胚の作出効率は 59%と通常条件と同程度だった。以上より二次卵胞の培養酸素環境は IVG 卵母細胞のコンピテンシーに影響し、今回の試験群において IVG 至適酸素濃度は 7%であることが示された。次に通常酸素濃度 20%条件群、至適酸素濃度 7%条件群

および *in vivo* 群において胚培養期間を IVF 後 132 時間まで延長し、胚発生段階ごとの発生率を比較した。培養期間中の生存率（回収卵母細胞数/供試二次卵胞数）および成熟率は、20%酸素群において 84% (326/387)、86% (205/238)、7%酸素群において 86% (325/379)、95% (216/223) と有意な差は見られなかった (Table2-2)。その一方で、胚発生率は 20%酸素群で 40% (50/125)、7%酸素群で 77% (85/111) と 7%酸素条件における有意な発生能改善を示した ($p<0.05$) (Table2-3)。

また各群の発生段階ごとの発生率を比較すると、桑実胚期までは *in vivo* 群では 99%、20%酸素群で 73% (91/125) および 7%酸素群で 80% (89/111) と同程度の発生能を示した。これらの桑実期胚は *in vivo* 群で 100%および 7%酸素群で 96%が胚盤胞期へ移行するのに対し、20%酸素群では 55%のみが胚盤胞期へと移行した (Figure2-3)。

以上より通常酸素濃度 20%条件に由来する胚は、桑実胚期から胚盤胞期胚への移行期に発生率が大幅に低下し、至適酸素濃度 7%条件ではこの胚盤胞期移行障害が改善することが明らかとなった。

2. IVG 卵母細胞におけるミトコンドリア動態解析

ミトコンドリアは ATP 生産時の電子供与体として酸素を利用し、培養酸素環境とその活性の密接な関連性が知られる (Sung *et al.* 2010, Tiede *et al.* 2011)。そこで培養酸素条件が IVG 卵母細胞のミトコンドリア動態に与える影響に着目し、通常酸素濃度 20% 条件群、至適酸素濃度 7% 条件群および *in vivo* 群の GV 期卵母細胞および MII 期卵子を解析した。

第一に MitoTracker 染色によるミトコンドリア局在解析を実施した。*in vivo* の GV 期卵母細胞では卵核周縁部へのミトコンドリア局在が見られるのに対し、IVG 群では異常局在を示す卵母細胞が多数見られた (Figure2-4)。細胞膜周縁部 (cortical) に対する GV 周縁部 (perinuclear) の単位面積あたりの相対輝度値を用いた局在傾向解析を行い *in vivo* に見られる正常な卵核周縁部への局在 (normal)、異常な卵核周縁部への局在 (perinuclear) および細胞膜周縁部への局在 (cortical) に分類した (Figure2-5)。その結果、卵母細胞における normal の割合は *in vivo* 群 (62%、32/52) に比較して、20% 酸素群 (36%、28/78) および 7% 酸素群 (27%、15/56) で低下した。また異常局在傾向は培養酸素条件により異なっており、20% 酸素群では perinuclear (50%、39/78) が、7% 酸素群では cortical (55%、31/56) が多数を占めた (Figure2-4)。MII 期では *in vivo* 群で細胞質全体に、もしくは中心部が抜けるようにミトコンドリアが分布した一方で、20% 群ではゲノム DNA 近傍へミトコンドリアの凝集を示す卵子が多数見られた (Figure2-5)。また *in vivo* 卵母細胞の 20% 酸素環境下 IVM により得られた IVM

卵子では *in vivo* 同様のミトコンドリア局在傾向が見られ、異常なミトコンドリア局在は IVG に起因すると考えられた。

次に qPCR を用いたミトコンドリア DNA コピー数の定量解析を実施し、量的なミトコンドリア動態を評価した。解析の結果、IVG 前の成長期卵母細胞では $23.1 \pm 6.5 \times 10^4$ コピー (n=46) を含有しており、GV 期卵母細胞では 3.0 倍にあたる $69.2 \pm 49.4 \times 10^4$ コピー (n=34)、さらに MII 期卵子では 1.2 倍に当たる $82.4 \pm 38.5 \times 10^4$ コピー (n=34) までミトコンドリア DNA は増加した (平均値 \pm S.D.)。これらは過去の報告に符合した (Figure2-6) (Mahrous *et al.* 2012)。一方で IVG 卵母細胞では *in vivo* 群と比較して 20%群で $49.0 \pm 22.8 \times 10^4$ コピー (n=43) および 7%群で $44.1 \pm 22.8 \times 10^4$ コピー (n=43) と有意なミトコンドリア DNA コピー数の低下が見られた ($p < 0.05$)。また MII 期卵子においては 20%群で $33.4 \pm 12.9 \times 10^4$ コピー (n=31) および 7%群で $22.1 \pm 9.6 \times 10^4$ コピー (n=37) とミトコンドリア DNA は顕著に低下し、卵母細胞成熟前後でそれぞれ 0.7 倍および 0.5 倍もの大規模なミトコンドリア DNA 削減が見られた。コントロールとなる IVM 群においては $66.6 \pm 29.3 \times 10^4$ コピー (n=39) となり卵母細胞成熟におけるミトコンドリア DNA の増加は 1.0 倍と緩やかであり削減は認められなかったものの、*in vivo* で成熟した MII 期卵子より有意に低下した ($p < 0.05$)。以上より IVG および IVM はそれぞれ卵母細胞成長過程および成熟過程におけるミトコンドリア DNA の増加に対して負の影響を与え、特に IVG 卵母細胞は成熟過程において顕著なミトコンドリア DNA の削減が生じることが明らかになった。

続いて、質的ミトコンドリア動態を評価するために JC-1 によるミトコンドリア膜電位差解析を行った。GV 期卵母細胞では *in vivo* 群 (1.0 ± 0.52 , $n=46$) に対し、20%群 (0.4 ± 0.49 , $n=68$, $p<0.05$) でミトコンドリア膜電位が顕著に低下し、7%群 (0.7 ± 0.80 , $n=40$) においても低下傾向にあった (平均値 \pm S.D.) (Figure2-7A)。また 20%群は 7%群と比較した場合においても有意な膜電位の低下を示した ($p<0.05$)。MII 期卵子では 20%群 (0.2 ± 0.14 , $n=52$, $p<0.05$) および 7%群 (0.5 ± 0.37 , $n=55$, $p<0.05$) で *in vivo* 群 (1.0 ± 0.51 , $n=44$) より顕著なミトコンドリア膜電位の低下が見られた (Figure2-7B)。以上よりミトコンドリア活性およびミトコンドリア損傷を示すミトコンドリア膜電位は *in vivo* 卵母細胞と比較し、IVG 卵母細胞において顕著な低下が認められた。また GV 期および MII 期において 7%群では 20%群と比較してミトコンドリア膜電位の低下が軽減しており、発生能改善への関与が示唆された。

3. IVG 卵母細胞におけるミトコンドリア機能解析

IVG 卵母細胞におけるミトコンドリア膜電位の低下によって、ミトコンドリア機能低下による ATP 生産能低下および ROS 生産量増加の誘起が示唆された。そこで ATP 含有量の定量解析および ROS 量の比較解析を実施した。

まず ATP 含有量の定量解析をルシフェラーゼアッセイにより実施した。in vivo 群では IVG 前の成長期卵母細胞で 0.39 ± 0.20 pmol (n=24)、GV 期卵母細胞で 0.46 ± 0.15 pmol (n=24) および MII 期卵子で 0.30 ± 0.14 pmol (n=24) と卵母細胞成長に伴って増加し、卵母細胞成熟過程で減少することが明らかとなった (平均値 \pm S.D.) (Figure2-8)。一方、GV 期卵母細胞において 20%群では 0.57 ± 0.07 pmol (n=24) および 7%群では 0.65 ± 0.09 pmol (n=24) と、予想に反して in vivo 群と比較して顕著に ATP 量が高かった ($p < 0.05$)。しかし MII 期においては 20%群で 0.32 ± 0.15 pmol (n=36) および 7%群で 0.33 ± 0.13 pmol (n=36) となり、ATP 量は in vivo 群と同程度まで減少した。in vivo 由来 GV 期卵母細胞の 20%酸素濃度条件下 IVM による IVM 群では 0.28 ± 0.12 pmol (n=24) となり、in vivo 由来 MII 期卵子と同程度の ATP 量を示した。

次に ROS 特異的蛍光プローブにより ROS 量を相対解析した。その結果、GV 期では in vivo 群 (1.0 ± 0.4 , n=40) に対して、20%群で 1.1 ± 0.34 倍 (n=34) および 7%群で 1.3 ± 0.42 倍 (n=29) となった (平均値 \pm S.D.)。また MII 期では in vivo 群 (1.0 ± 0.2 , n=33) に対して、20%群で 1.1 ± 0.2 倍 (n=68) および 7%群で 1.3 ± 0.4 倍 (n=76) となった。以上の結果より 20%群において ROS 量は増

大せず、一方で発生能改善が見られた 7%群における有意な ROS 量増大が見られた (Figure2-9)。

4. IVG 卵母細胞におけるマイトファジーと発生能解析

IVG 卵母細胞に由来する MII 卵子および胚のミトコンドリア異常の一因として卵母細胞成熟過程におけるマイトファジー活性に着目した。そこで IVG 卵母細胞ならびに *in vivo* 卵母細胞の IVM 培地へのマイトファジー活性化および抑制作用を有する薬剤の添加が胚発生に与える影響を解析した。

まずラパマイシン添加 IVM によるマイトファジー活性化 IVM を実施した。ラパマイシンはオートファジー抑制に寄与する mTOR 阻害を通してオートファジーを誘導する (Li *et al.* 2014)。*in vivo* 卵母細胞および通常培養酸素濃度 20% 条件群に由来する *in vitro* 卵母細胞を 0、1、10 および 100 nM ラパマイシン添加条件で IVM に供試した。ミトコンドリア特異的蛍光プローブ MitoTracker を用いたミトコンドリア相対定量解析の結果、*in vivo* 群ではラパマイシン添加濃度に応じたミトコンドリア量の有意な低下が見られ、100 nM 添加区では 0.5 ± 0.08 (n=11) と *in vitro* 群 0 nM 区と同程度まで低下した ($p < 0.05$) (Figure2-14A)。しかしながら *in vitro* 群ではラパマイシン添加濃度に依存したミトコンドリア量の変化は認められなかった。またラパマイシン添加に伴ったミトコンドリア局在変化も見られず、*in vitro* 卵子の異常なミトコンドリア動態はラパマイシン添加により改善しなかった (Figure2-14B)。また発生能解析の結果、すべてにおいて成熟率 97 - 100%、正常受精率 47 - 65%と有意な変化は認められなかった

(Figure2-15)。同様に胚盤胞発生率においても 0 nM 区と比較して有意な改善は認められず、*in vivo* および *in vitro* 両群に共通してラパマイシン添加濃度に応じて発生能は低下傾向にあった (Figure2-15)。

次に 3-メチルアデニン (3-MA) 添加 IVM によるマイトファジー抑制 IVM を実施した。3-MA はオートファジーの上流制御を担う非典型クラス III PI3K を阻害することでオートファジーを抑制する (Xu *et al.* 2012)。*in vivo* 卵母細胞を 0、1 および 10 mM 3-MA 添加 IVM に供試した。卵母細胞成熟率は 0 mM 区で 91.9% (n=57/62) および 1 mM 添加区で 90.3% (n=28/31) を示すのに対し、10 mM 添加区で 0% (n=0/10) と顕著に低下した (Figure2-16B)。高濃度 3-MA 処理は卵母細胞成熟を制御する典型クラス I PI3K の活性を阻害することが知られており、10 mM 添加区ではこの影響により卵母細胞成熟率が低下したと考えられた。

ミトコンドリア特異的蛍光プローブ MitoTracker を用いたミトコンドリア相対定量解析の結果、0 mM 添加区 1.0 ± 0.2 (n=11) に対して 1 mM 添加区では 1.3 ± 0.3 (n=10) と顕著な増加が認められた ($p < 0.05$) (Figure2-16A)。しかし *in vivo* 卵母細胞および通常培養酸素濃度 20% 条件群に由来する *in vitro* 卵母細胞を 0 および 1 mM 3-MA 添加条件で IVM に供試し、発生能解析を行った結果、0 mM 添加区に対して成熟率および発生率の改善は見られなかった (Figure2-16C)。

5. 母性ミトコンドリア動態が発生能に与える影響の解析

これまでのミトコンドリア動態および機能解析の結果、IVG 卵母細胞の異常なミトコンドリア特性が、受精を介して胚へ継承され、母性ミトコンドリアの機能不全による発生能低下が示唆された。そこで IVG 卵母細胞に由来する *in*

in vitro 胚における母性ミトコンドリアの健全性を理解するために、過排卵処理成熟雌マウスより採取した MII 期卵子に由来する *in vivo* 胚および至適培養酸素濃度 7% 条件により作出された 7%-IVG 卵母細胞に由来する *in vitro* 胚の 2 細胞期におけるミトコンドリア膜電位の解析を実施した。まず JC-1 プローブを用いたミトコンドリア膜電位測定の結果、*in vivo* 胚 (1.0 ± 0.22 , $n=54$) と比較し、*in vitro* 胚では 0.4 ± 0.23 倍 ($n=78$) となり、GV 期卵母細胞および MII 期卵子同様にミトコンドリア膜電位が顕著に低下した ($p<0.001$) (平均値 \pm SD) (Figure2-10A)。次に MitoTracker プローブを用いたミトコンドリア相対定量解析においても *in vivo* 胚 (1.0 ± 0.10 , $n=78$) と比較し、*in vitro* 胚では 0.8 ± 0.08 倍 ($n=105$) となり、有意な低下が見られた ($p<0.05$) (Figure 2-10B)。またミトコンドリア局在に関しても核膜周辺部へのミトコンドリア局在傾向の弱い胚が *in vitro* 胚で見られた (Figure2-11)。以上より、*in vitro* 群では卵母細胞・卵子同様に *in vivo* 群に対する質的・量的なミトコンドリアの異常が見られ、IVG 卵母細胞における異常なミトコンドリア特性が受精を介して消去されず、初期胚へ継承されたことが示唆された。

次にミトコンドリア相対定量解析後の 2 細胞期胚の IVF 開始 100 時間後までの胚培養を実施し、母性ミトコンドリア量が胚発生に与える影響を解析した (Figure2-12)。なお *in vivo* 群においてミトコンドリア量解析後胚の 98.6% ($n=72/73$) が胚盤胞期胚まで発生したことから、ミトコンドリア量解析が胚発生に与える影響は無視できるものと考え、IVF 開始 100 時間後における発生状態ごとに 2 細胞期時点におけるミトコンドリア量を比較した。その結果、胚盤

胞期に発生することができた 2 細胞期胚 (1.02 ± 0.072 , $n=39$) と比較して、桑実胚期までしか発生しなかった 2 細胞期胚のミトコンドリアプローブの輝度値は 0.99 ± 0.078 ($n=43$)、また 2 細胞期で発生を停止した胚ではミトコンドリアプローブの輝度値が 0.95 ± 0.059 ($n=11$, $p<0.05$) となり、有意にミトコンドリア量が低かった (Figure2-13)。このうち胚盤胞期または桑実胚期まで発生した胚を 2 細胞期時点におけるミトコンドリアプローブの輝度値が *in vitro* 群平均より高い高ミトコンドリア量群と、平均より低い低ミトコンドリア量群に分別し、レシピエントマウスへの胚移植実験を通してミトコンドリア量が個体発生能に与える影響を解析した。着床率および個体発生率を比較した結果、妊娠満期での個体発生率は高ミトコンドリア量群 (10%、 $n=4/41$) と低ミトコンドリア量群 (8%、 $n=3/40$) 間において有意な差は見られなかった。しかしながら着床率は高ミトコンドリア量群 46% ($n=19/41$) と比較し、低ミトコンドリア量群で 23% ($n=9/40$) と有意に低下した ($p<0.05$) (Table2-4)。

以上の結果から、卵母細胞におけるミトコンドリアの正常性は、胚のミトコンドリア正常性に影響を与え、また母性ミトコンドリア量が発生能へ影響しうることを示され、*in vitro* 胚の低発生能の一因が母性ミトコンドリア異常であることが示唆された。

第四節 考察

これまでに通常培養条件である 20%酸素濃度条件より低い培養酸素条件下における IVC、IVM および IVG により胚発生能や成熟能の向上が報告されてきた。IVC でマウス、ヒト、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ウシおよびハムスターなどの多様な動物において、低酸素条件下による胚発生率の向上が示された (Tervit *et al.* 1972, Quinn & Harlow 1978, Pabon *et al.* 1989, McKiernan & Bavister 1990, Thompson *et al.* 1990, Batt *et al.* 1991, Legge & Sellens 1991, Umaoka *et al.* 1992, Li & Foote 1993, Noda *et al.* 1994, Watson *et al.* 1994)。また IVM ではマウス、ハムスターおよびブタにおいて低酸素環境が成熟能と発生能を向上させることが報告された (Haidri *et al.* 1971, Gwatkin & Haidri 1974, Kitagawa *et al.* 2004, Banwell *et al.* 2007)。そして IVG ではマウスにおいて 5%、10%、15% および 20% 酸素濃度条件において培養酸素濃度の低下に伴った発生能の改善が示された (Eppig & Wigglesworth 1995)。本研究においては 5%、7%、10% および 20% 酸素濃度条件における IVG 卵母細胞の発生能解析を実施した結果、マウス二次卵胞の IVG 至適酸素濃度が 7% であることが明らかとなった。生殖器環境中における酸素濃度は 1.5 – 8.7 % であり、今回の至適酸素条件の解析結果と矛盾しなかった。(Fischer *et al.* 1992, Basini *et al.* 2004, Clark *et al.* 2006, de Castro *et al.* 2008, Redding *et al.* 2008)。低酸素環境におけるコンピテンシーの改善は、培養酸素濃度を生体内環境へと近づけることによって、*in vivo* における完全な卵母細胞成長、成熟および胚発生プロセスの *in vitro* における再現性を増したためと考えられた。しかしながら一部の報告では低酸素環境がコンピテンシーに対し、負に作用することが報告され

ている。ブタ IVM では低酸素培養環境に伴った成熟率の変化は見られず、ウシ IVM では成熟率が低下した (Pinyopummintr & Bavister 1995, Hashimoto *et al.* 2000, Park *et al.* 2005)。また IVG においてもウシでは培養酸素濃度 20%条件に比べ、5%酸素濃度条件で成熟率および発生率の低下が示されたが、IVG 期間の中期において培養酸素濃度を 5%から 20%へ切り替えることで発生能が 20%酸素濃度条件よりも改善することが報告された (Hirao *et al.* 2012)。さらに本研究や Eppig らの報告と異なり、コラゲナーゼ処理による莢膜細胞の除去を行わずに実施されたマウス IVG では 5%酸素濃度条件における成熟能および発生能の低下が示された (Smitz *et al.* 1996)。以上より、動物種や細胞種で至適培養酸素条件は異なり、また卵母細胞成長段階においてもその酸素要求性が異なっていることが示唆され、マウス二次卵胞における至適酸素条件の更なる改善が期待された。

また、5%酸素条件よりも 7%酸素条件で胚作出効率が高い理由として、5%群における卵胞細胞増殖能の低下が考えられた。5%-IVG において培養卵胞の大きさは同培養日数の 20%-IVG 培養卵胞と比較して、顕著に小さく、低酸素培養条件では支持細胞増殖速度の低下が示唆され、培養酸素環境に対して卵母細胞のミトコンドリア品質管理と卵胞細胞増殖がトレードオフの関係にあることが考えられた。

至適培養酸素濃度 7%酸素条件における発生能改善は、20%酸素条件で見られた桑実期からの胚盤胞期移行率の改善によることが分かった。胚盤胞形成後、栄養外胚葉系列においてそれまで低活性化状態だったミトコンドリアの活性化

が知られ、このミトコンドリア活性化は、胚盤胞形成に寄与する (Houghton 2006)。そのため 20%酸素条件 IVG 卵母細胞に由来する胚における胚盤胞期移行障害の一因としてミトコンドリア機能低下が示唆され、一方で発生能改善が見られた 7%酸素条件においてはミトコンドリアの機能改善が示唆された。

in vivo 卵母細胞に対する通常培養酸素濃度 20%および至適培養酸素濃度 7%条件 IVG 卵母細胞のミトコンドリア動態を解析した。その結果、培養酸素条件によらず IVG 卵母細胞およびそれに由来する MII 期卵子では *in vivo* 群と比較して異常なミトコンドリアの局在が見られ、ミトコンドリア膜電位およびミトコンドリア DNA コピー数の有意な低下も明らかとなった。これまでにミトコンドリア局在やミトコンドリア膜電位、そしてミトコンドリア DNA コピー数の発生能への関与が報告されており、IVG 卵母細胞における異常なミトコンドリアは発生能低下の一因となりうることが示唆された (Nagai *et al.* 2006, Ge *et al.* 2012, St John 2014)。その一方で 7%-IVG 卵母細胞で 20%-IVG 卵母細胞と比較し、ミトコンドリア膜電位低下の軽減が見られ、ミトコンドリア膜電位の発生能改善への寄与が示唆された。

IVG 卵母細胞における異常なミトコンドリア動態によって、ミトコンドリア機能低下による ROS 生産量増加および ATP 生産量低下が示唆された。これまでに IVM および IVC を用いて報告された低酸素環境の成熟能・発生能への寄与は、ミトコンドリアによる ROS 生産量の低減に伴うことが報告されている (Pabon *et al.* 1989, Legge & Sellens 1991, Umaoka *et al.* 1992, Li & Foote 1993, Kitagawa *et al.* 2004, Iwamoto *et al.* 2005)。しかしながら本研究では、20%-IVG 卵

母細胞および卵子における ROS 量の増加は見られず、予想に反して 7%-IVG 卵母細胞および卵子において顕著に増加した。また ATP においても卵子 ATP 含有量と胚発生能の関連性が報告されている一方で、IVG 卵母細胞では培養酸素条件によらず、*in vivo* 群と比較して有意な ATP 量増加が見られた (Van Blerkom *et al.* 1995, Ge *et al.* 2012, Yuan *et al.* 2016)。これらのことから本研究において見られた 7%-IVG 卵母細胞の発生能改善に対して ATP 量および ROS 量の寄与は小さいことが考えられた。

IVG 卵母細胞は *in vivo* 由来の卵母細胞と比較して大量の ATP を含有していた。これまでに卵母細胞成長過程における卵母細胞ミトコンドリアの ATP 生産や支持細胞から卵母細胞への ATP 供給に関する報告は無い。しかし卵母細胞成長過程で細胞質中に蓄積される母性因子の転写、翻訳および修飾に大量の ATP を要求することは自明であり、IVG 卵母細胞において母性因子の蓄積に代表される ATP 要求性の高い生物学的経路の活性が低下している可能性が示唆された。またその一方、IVG 卵母細胞は *in vivo* 卵母細胞と比較して大量の ATP を含有するにも関わらず、成熟後、MII 期ではこの量的差が無くなっていた。これまでに卵母細胞成熟過程における ATP 生産および消費が知られている (Yuan *et al.* 2016)。IVG 卵母細胞ではミトコンドリア機能低下により卵母細胞成熟過程における ATP 生産が消費に追い付かなかったものと考えられ、その後の初期発生期間におけるミトコンドリア機能の深刻な低下が示唆された。

IVG 卵母細胞に由来する *in vitro* 胚の低発生能の一因として、異常な卵母細胞・卵子ミトコンドリアが異常な母性ミトコンドリアとして次世代に継承され

ることが示唆された。*in vitro* 胚では *in vivo* 胚と比較し、ミトコンドリア膜電位およびミトコンドリア量の低下が生じており、GV期卵母細胞およびMII期卵子で見られたミトコンドリア異常が回復せず、受精を介して継承されたことが考えられた。

受精後、卵子から胚へ継承されたミトコンドリアは胚盤胞期まで低活性状態を示し、胚は嫌氣的代謝により ATP 生産を行う。その後、胚盤胞期では栄養外胚葉系列においてミトコンドリアが再活性化することが知られ、この再活性化は腔形成、胚盤胞期移行に寄与することが知られる (Babayev & Seli 2015)。また近年、マウス胚において二細胞期移行の発生に必須である胚性ゲノム活性化へのミトコンドリア内代謝酵素の寄与が見出された (Nagaraj *et al.* 2017)。これらの知見は、胚盤胞まで発生した胚は、2 細胞期時点でミトコンドリア量が多く、特に 2 細胞期胚停止を示した胚と比較して有意な差が認められたことと符合した。また 2 細胞期時点でのミトコンドリア量が多い胚で有意な着床率の増加が認められ、胎盤の起源となる栄養外胚葉系列の正常な分化および機能獲得におけるミトコンドリアの寄与が示唆された。

ミトコンドリア DNA コピー数の定量解析の結果、IVG 群では卵母細胞成熟過程における大規模なミトコンドリア DNA コピー数の削減が生じた。これまでにマウスおよびヒト IVM 卵子におけるミトコンドリア DNA コピー数測定では *in vivo* 卵子と比較した *in vitro* 卵子ミトコンドリア DNA コピー数の低下が報告されており、これは本解析における IVM 卵子の定量結果と符合した。しかしいずれにおいても GV 期卵母細胞時点でのミトコンドリア DNA コピー数を大幅に下

回る結果は見られず、IVG 卵母細胞特異的な積極的ミトコンドリア消去機構の活性化が示唆された (Zeng *et al.* 2007, Ghorbanmehr *et al.* 2018)。損傷ミトコンドリアのオートファジー、すなわちマイトファジーによる能動的かつ選択的除去機構が知られ、これまでにマウス卵母細胞成熟過程においてマイトファジーが機能的であることが示唆されている。しかし、卵母細胞成熟過程におけるマイトファジーに関する知見は乏しい (Kim *et al.* 2019)。本研究において行われた *in vivo* 卵母細胞のオートファジー活性化作用を有するラパマイシン添加 IVM では、作出卵子のミトコンドリア量が有意に低下し、反対にオートファジー抑制作用を有する 3-MA 添加 IVM では作出卵子ミトコンドリア量の有意な増加が認められ、これらは卵母細胞成熟過程におけるマイトファジー機構の存在を支持した。IVG 卵母細胞におけるマイトファジー活性の発生能に対する過不足を評価するため、ラパマイシンおよび 3-MA 添加 IVM を実施し、作出卵子の発生能を評価した。しかし、*in vivo* 卵母細胞および IVG 卵母細胞に関係なく、薬剤添加により発生能は改善しなかった。これは発生能に対して、各群卵母細胞のオートファジー活性は過剰でも不足でもないことが示唆された。また過去の報告ではオートファジー不全により見られたミトコンドリアの異常凝集がラパマイシン添加により改善したことから、IVG 卵母細胞におけるミトコンドリア異常局在の改善が期待されたが、IVG 卵母細胞に由来する MII 期卵子でラパマイシン添加に伴ったミトコンドリア異常局在の改善は認められず、また *in vivo* 群で見られたようなミトコンドリア量の減少も見られなかった。*in vivo* 卵母細胞で見られるようなラパマイシン添加に応じたミトコンドリア量の低下が IVG 卵

母細胞では見られなかったことから、IVG 卵母細胞ではミトファジー経路に異常が生じている可能性が示唆された。

Table 2-2. 20%および7%-IVG卵母細胞の生存率および成熟率

O ₂ condition	No. of follicles		No. of oocytes		
	subjected to IVG	survived	subjected to IVM	undergoing GVBD	matured into MII
20%	387	326 (84.2%) ^a	238	235 (98.7%) ^a	205 (86.1%) ^a
7%	379	325 (85.8%) ^a	228	223 (97.8%) ^a	216 (94.7%) ^a
<i>in vivo</i>	-	-	128	122 (95.3%) ^a	115 (89.8%) ^a

Tukey-kramer法により有意差検定を行った。

Table 2-3. 20%および7%-IVG卵子の受精率および発生率

O ₂ condition	No. of oocytes		No. of embryos developed to			
	subjected to IVF	normally fertilized	2-cell	4-cell	morula	blastocyst
20%	222	125 (56.3%)	104 (83.0%) ^b	96 (76.8%) ^b	91 (72.8%) ^b	50 (40.0%) ^c
7%	237	111 (46.8%)	101 (91.0%) ^a	100 (90.1%) ^a	89 (80.2%) ^b	85 (76.6%) ^b
<i>in vivo</i>	158	72 (45.6%)	71 (98.6%) ^a	71 (98.6%) ^a	71 (98.6%) ^a	71 (98.6%) ^a

Tukey-kramer法により有意差検定を行った。

Table 2-4. 2細胞期胚時点でのミトコンドリア量と着床率および個体発生率

		MitoTracker intensity (average \pm S.D.)	No. of embryos transferred	No. of	
				implanted embryos	living pups
2-cell derived from 7%-IVG oocytes	High intensity at 2-cell	1.06 \pm 0.05 *	37	19 * (51.4%)	4 (10.8%)
	Low intensity at 2-cell	0.95 \pm 0.04	40	9 (22.5%)	3 (7.5%)

*は有意差あり ($p < 0.05$)

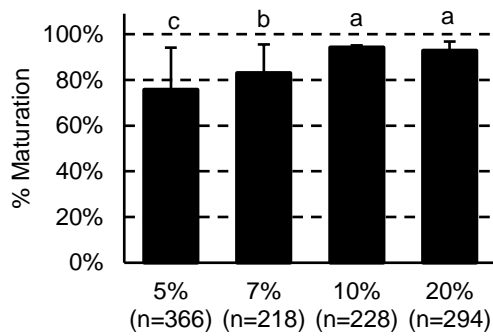
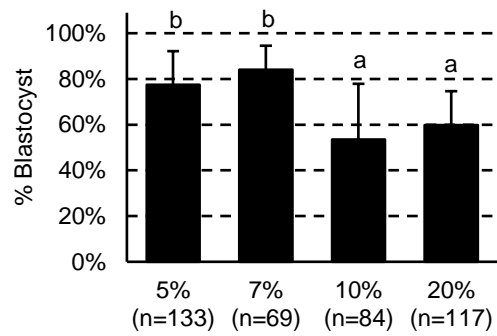
A**B**

Figure 2-2. 5%、7%、10%および20%酸素条件IVGにより得られたIVG卵母細胞の成熟率および発生率

5%、7%、10%および20%酸素条件IVGにより得られたIVG卵母細胞の成熟率（MII期卵子/培養卵胞）（A）および発生率（胚盤胞期胚/供試受精卵）（B）。TukeyのWSD検定を用いて有意差検定を行い、異なるアルファベットは有意な差を示す（ $p < 0.01$ ）。

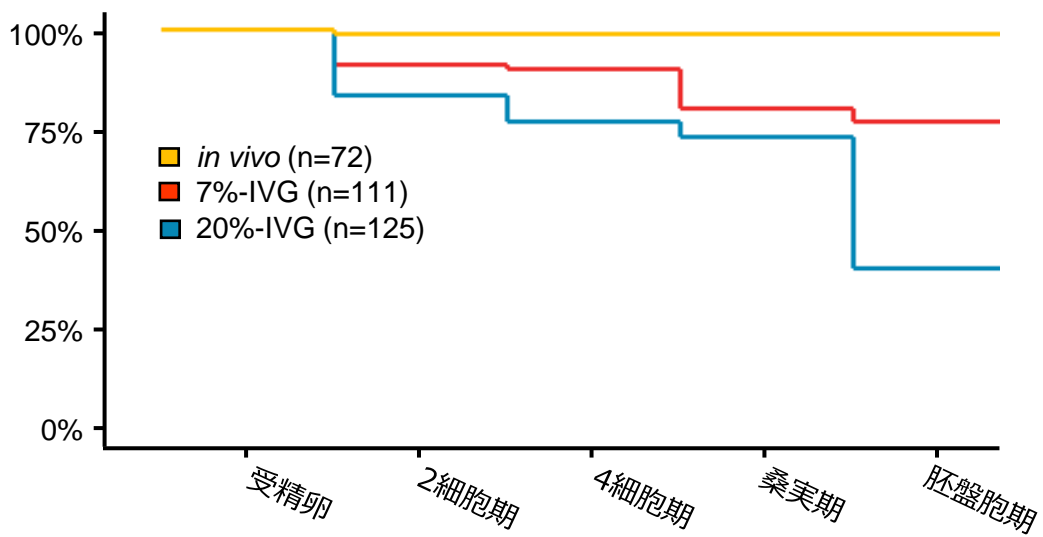


Figure 2-3. 20%および7%-IVG卵子および*in vivo*卵子に由来する胚の発生段階ごとの発生率

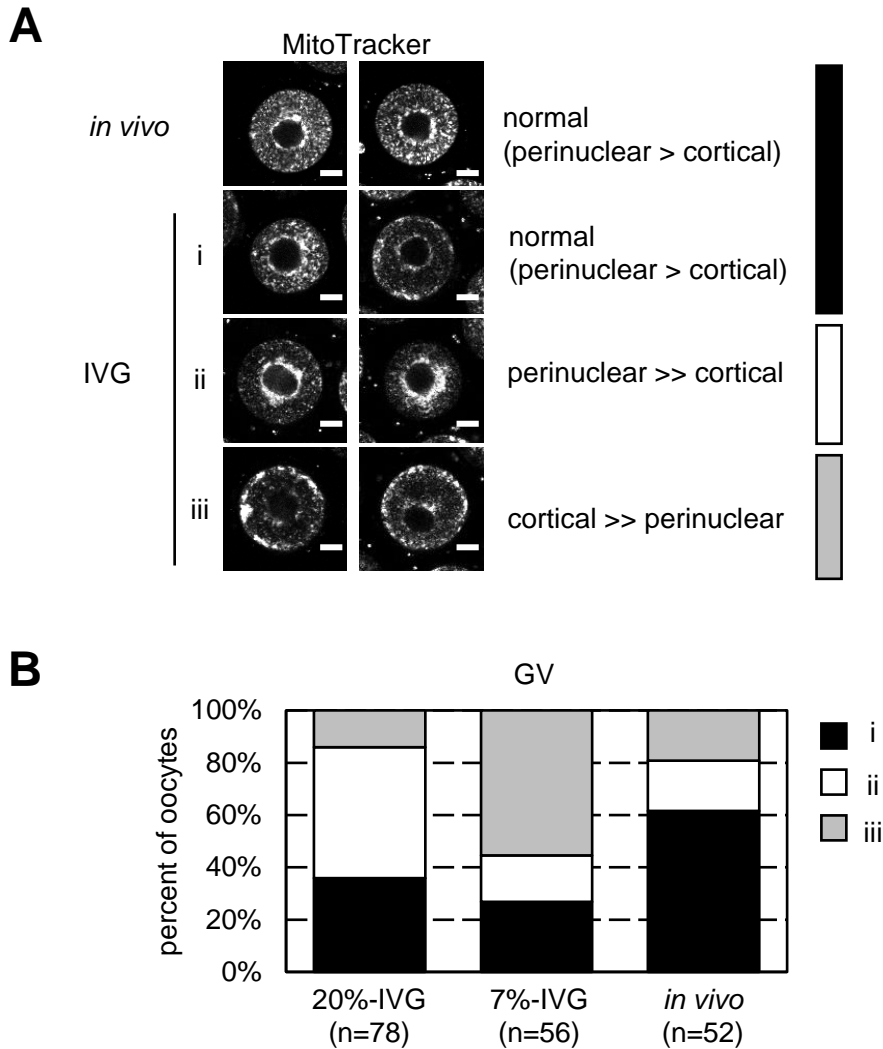


Figure 2-4. IVG卵母細胞におけるミトコンドリアの局在

MitoTrackerにより得られた20%群 (n=78)、7%群 (n=58) および *in vivo* 群 (n=52) GV期卵母細胞のミトコンドリア局在傾向をcortical領域とperinuclear領域の平均輝度値の相対値により分別した。*In vivo*群では相対値が 1.39 ± 0.39 を示した(平均値 \pm S.D.)。

(A) これを参考に相対値が $1.0 - 1.8$ (平均値 \pm 1S.D.以内)となる典型的なものをclass i、相対値が1.8より高い(>平均値+1S.D.)GVへのミトンドリア凝集を示すものをclass ii、相対値が1未満なもの(<平均値-1S.D.)を細胞膜周縁部に脱局在を示したclass iiiとして分類した。(B) 各classが各群卵母細胞集団に占める割合。DOI: 10.1530/REP-21-0209

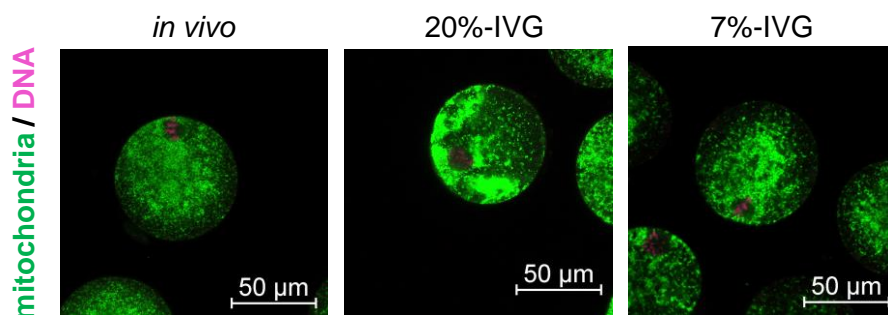


Figure 2-5. IVG卵子におけるミトコンドリアの局在

MII期卵子におけるMitoTracker DeepRed（緑色）およびHoechst333421（マゼンタ）の染色画像。共焦点顕微鏡で撮影。

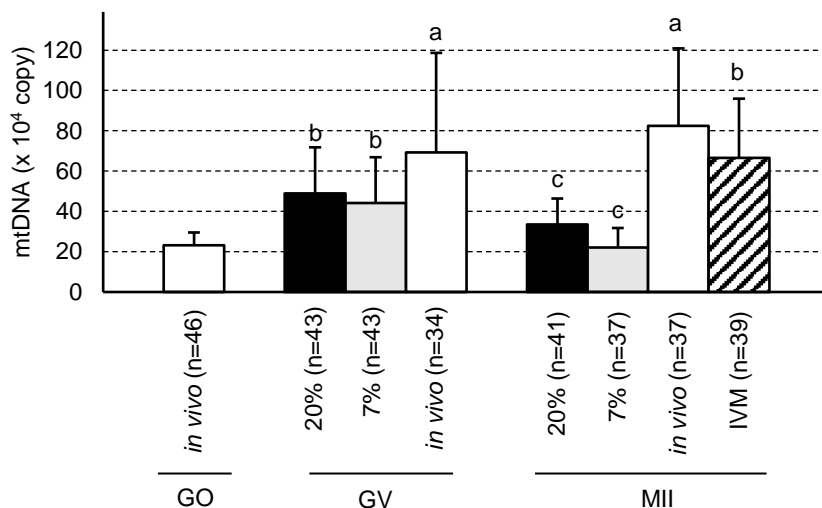


Figure 2-6. IVG卵母細胞およびIVG由来卵子のミトコンドリアDNAコピー数

定量解析により得られたミトコンドリアDNAコピー数の各群平均値を示した（誤差範囲: +S.D.）。成長期卵母細胞（Growing Oocyte; GO、n=46）およびGV期における20%-IVG群（n=43）、7%-IVG群（n=43）および*in vivo*群（n=34）、そしてMII期における20%-IVG群（n=41）、7%-IVG群（n=37）、*in vivo*群（n=37）および*in vivo*群GV期卵母細胞のIVMに由来するIVM群（n=39）の合計8群、320サンプルの定量解析を実施した。同じ発生段階において、Tukey-kramer法を用いた有意差検定を実施した。異なるアルファベットは有意な差を示す（ $p < 0.05$ ）。DOI: 10.1530/REP-21-0209

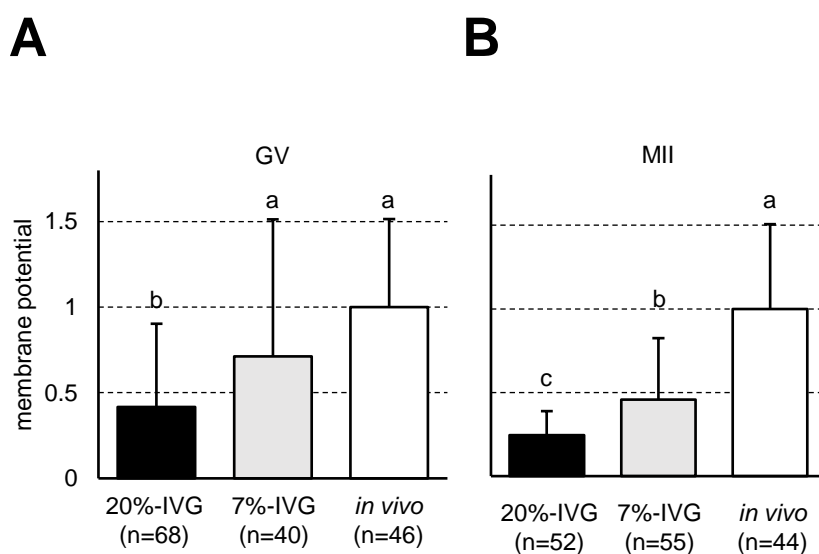


Figure 2-7. IVG卵母細胞およびIVG卵子のミトコンドリア膜電位

蛍光輝度値解析により得られたミトコンドリア膜電位の各群平均値を示した（誤差範囲: +S.D.）。GV期における20%-IVG群（n=68）、7%-IVG群（n=40）および*in vivo*群（n=46）、そしてMII期における20%-IVG群（n=52）、7%-IVG群（n=55）、*in vivo*群（n=44）の合計6群、305サンプルの定量解析を実施した。同じ発生段階において、Tukey-kramer法を用いた有意差検定を実施した。異なるアルファベットは有意な差を示す（ $p < 0.05$ ）。DOI: 10.1530/REP-21-0209

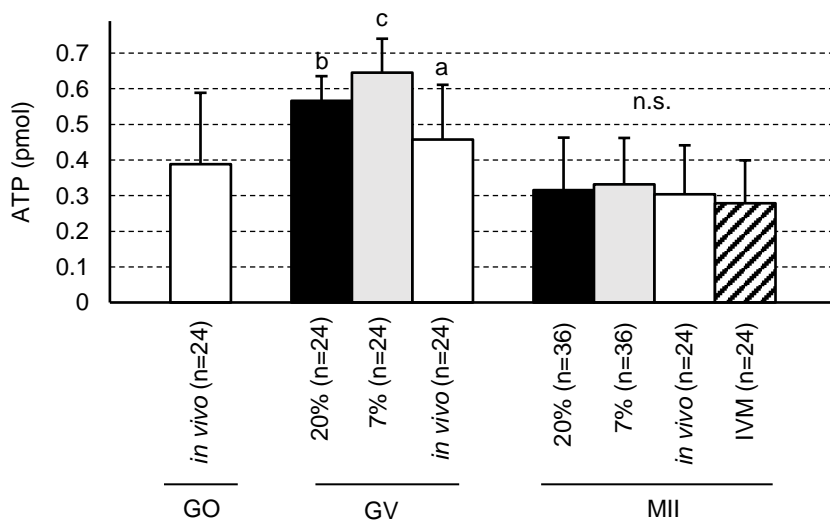


Figure 2-8. IVG卵母細胞およびIVG卵子のATP含有量

定量解析により得られたATP量の各群平均値を示した（誤差範囲: +S.D.）。成長期卵母細胞（GO、n=24）およびGV期における20%-IVG群（n=24）、7%-IVG群（n=24）および*in vivo*群（n=24）、そしてMII期における20%-IVG群（n=36）、7%-IVG群（n=36）、*in vivo*群（n=24）および*in vivo*群GV期卵母細胞のIVMに由来するIVM群（n=24）の合計8群、216サンプルの定量解析を実施した。同じ発生段階において、Tukey-kramer法を用いた有意差検定を実施した。異なるアルファベットは有意な差を示す（ $p < 0.05$ ）。DOI: 10.1530/REP-21-0209

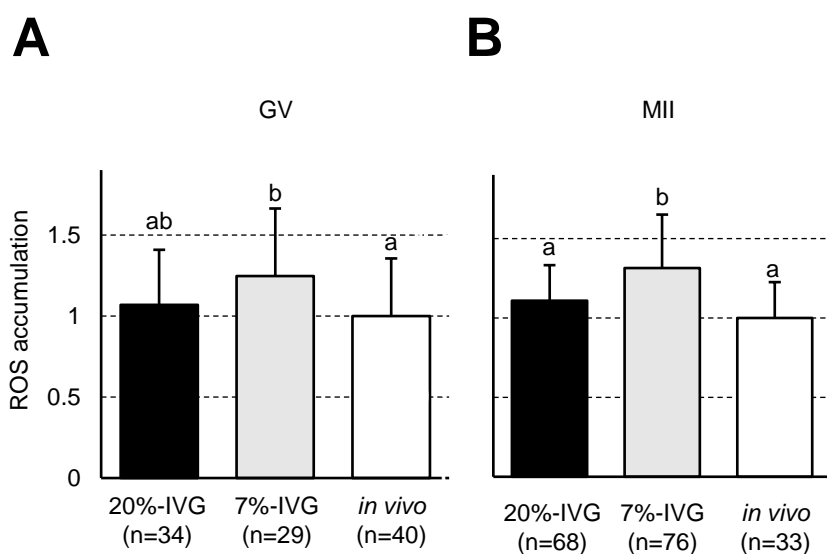


Figure 2-9. IVG卵母細胞およびIVG卵子のROS活性量

定量解析により得られたROS量の各群平均値を示した（誤差範囲: +S.D.）。GV期における20%-IVG群（n=34）、7%-IVG群（n=29）および*in vivo*群（n=40）、そしてMII期における20%-IVG群（n=68）、7%-IVG群（n=76）、*in vivo*群（n=22）の合計6群、280サンプルの定量解析を実施した。同じ発生段階において、Tukey-kramer法を用いた有意差検定を実施した。異なるアルファベットは有意な差を示す（ $p < 0.05$ ）。DOI: 10.1530/REP-21-0209

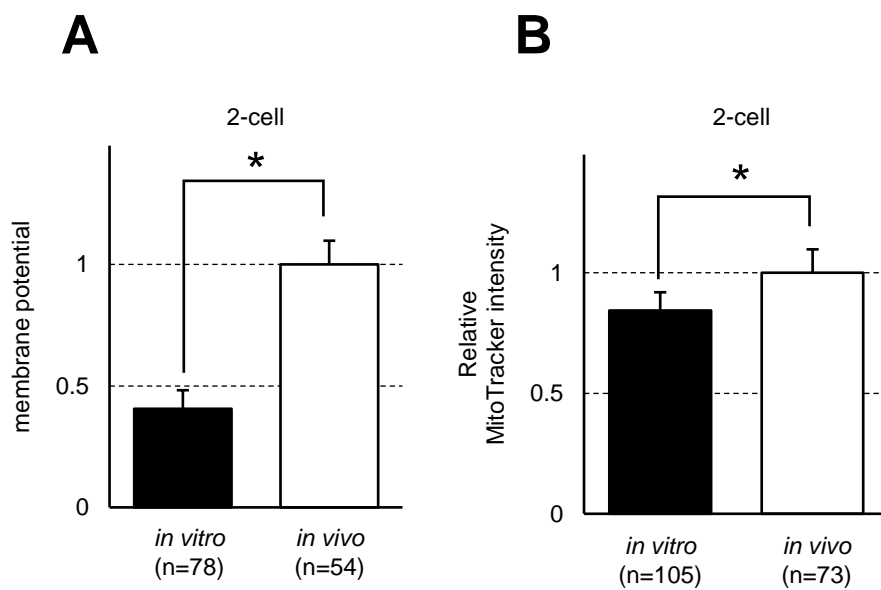


Figure 2-10. *in vivo*および*in vitro* 2細胞期胚におけるミトコンドリア膜電位およびミトコンドリア量

IVF開始31時間後の*in vivo*および*in vitro* 2細胞期胚におけるJC-1によるミトコンドリア膜電位 (A) およびMitoTrackerによるミトコンドリアの相対定量 (B) (平均値+S.D.)。Student t-testにより有意差検定を実施した ($p < 0.001$)。

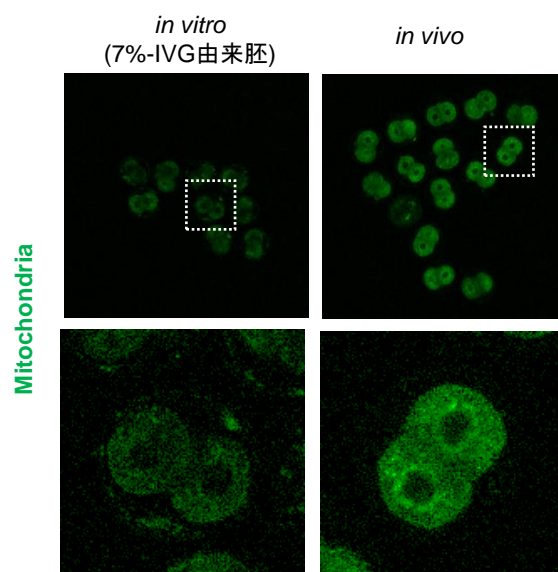


Figure 2-11. *in vivo*および*in vitro* 2細胞期胚におけるミトコンドリア局在

IVF開始31時間後の*in vivo*および*in vitro* 2細胞期胚におけるMitoTracker Green（緑色）の染色画像。共焦点顕微鏡で撮影。

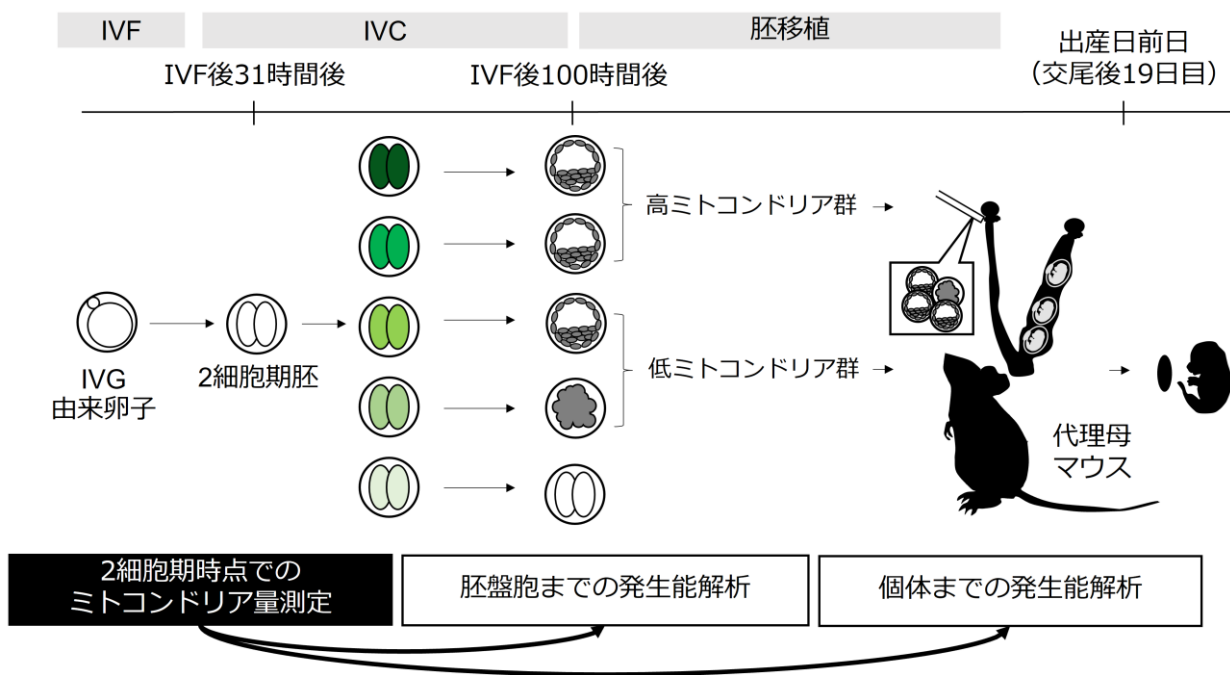


Figure 2-12. 2細胞期胚におけるミトコンドリア量と発生能解析

IVF開始31時間後の2細胞期胚をMitoTrackerによるミトコンドリア定量解析に供試した後、IVF開始100時間後までの発生能を追跡した。その後、胚盤胞期胚あるいは桑実胚期胚まで発生した胚をレシピエントマウスへ、胚移植し、個体発生能を解析した。

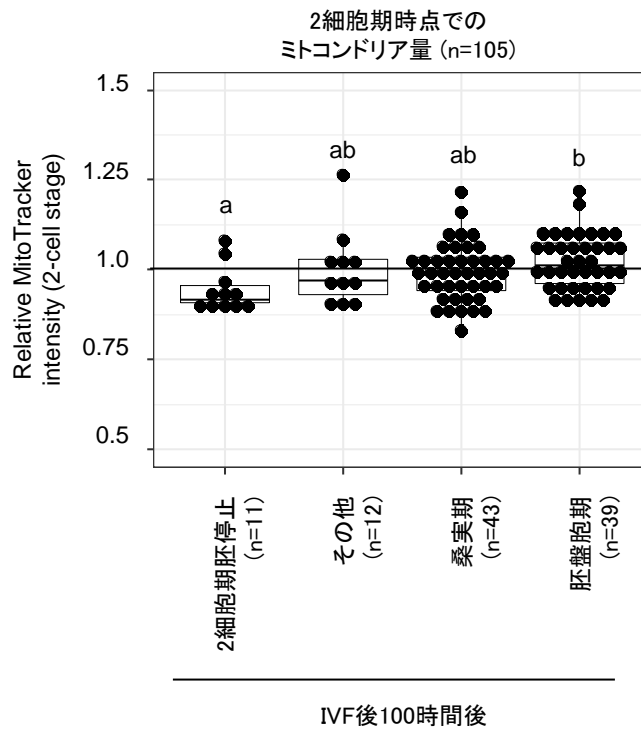


Figure 2-13. *in vitro*由来胚におけるミトコンドリア量と発生能

IVF開始100時間後における各胚の進行と2細胞期におけるミトコンドリア量を示した。Tukey-kramer法により有意差検定を行い、異なるアルファベットは有意な差を示す ($p < 0.05$)。

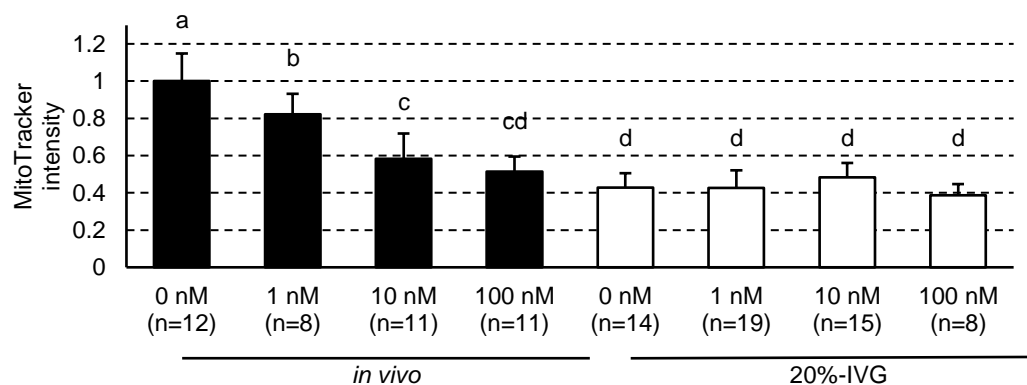
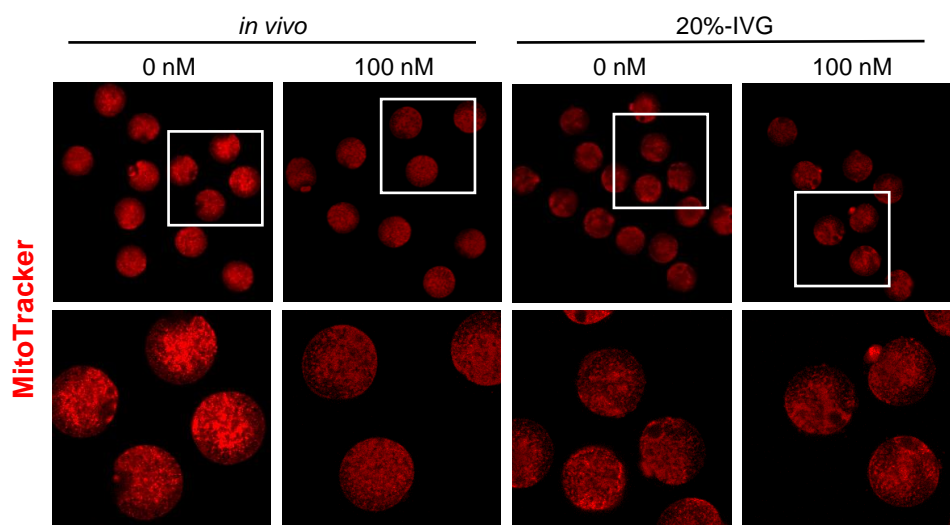
A**B**

Figure 2-14. ラパマイシン添加がIVG卵子のミトコンドリア量と局在に及ぼす影響

*in vivo*卵母細胞およびIVG卵母細胞をラパマイシン添加条件でIVMに供試した。IVM後のMitoTracker輝度値によるミトコンドリア相対定量解析結果 (A) とミトコンドリア局在の観察 (B)。Tukey-kramer法により有意差検定を行い、異なるアルファベットは有意な差を示す ($p < 0.05$)。

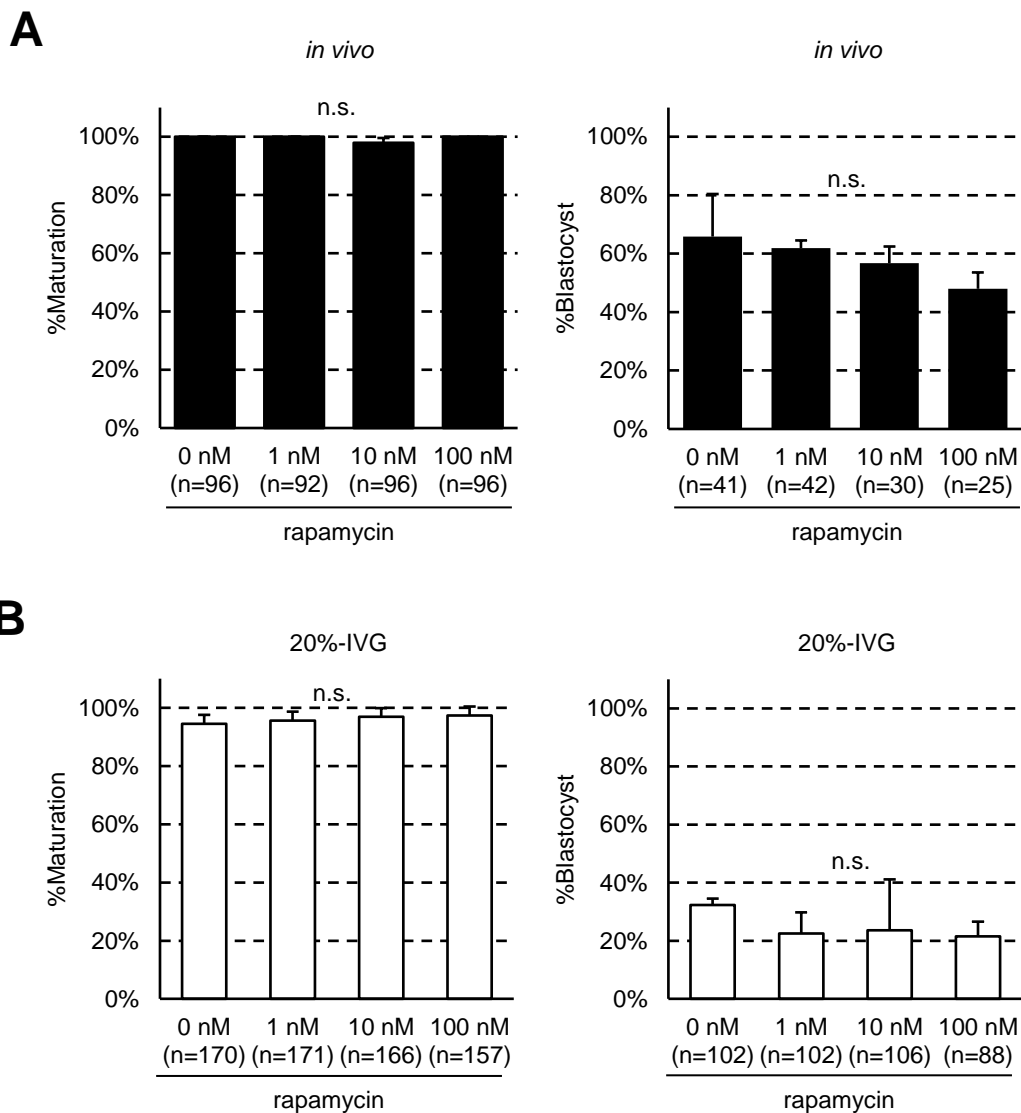


Figure 2-15. ラパマイシン添加がIVG卵子の成熟能および発生能に与える影響

ラパマイシン添加IVM卵子の発生能解析を*in vivo* (A) および20%-IVG卵母細胞ごとに解析した (B)。成熟率 (MII期卵子/供試COC) および発生率 (胚盤胞期胚/供試受精卵) はTukeyのWSD法を用いて有意差検定を実施した ($p < 0.05$)。

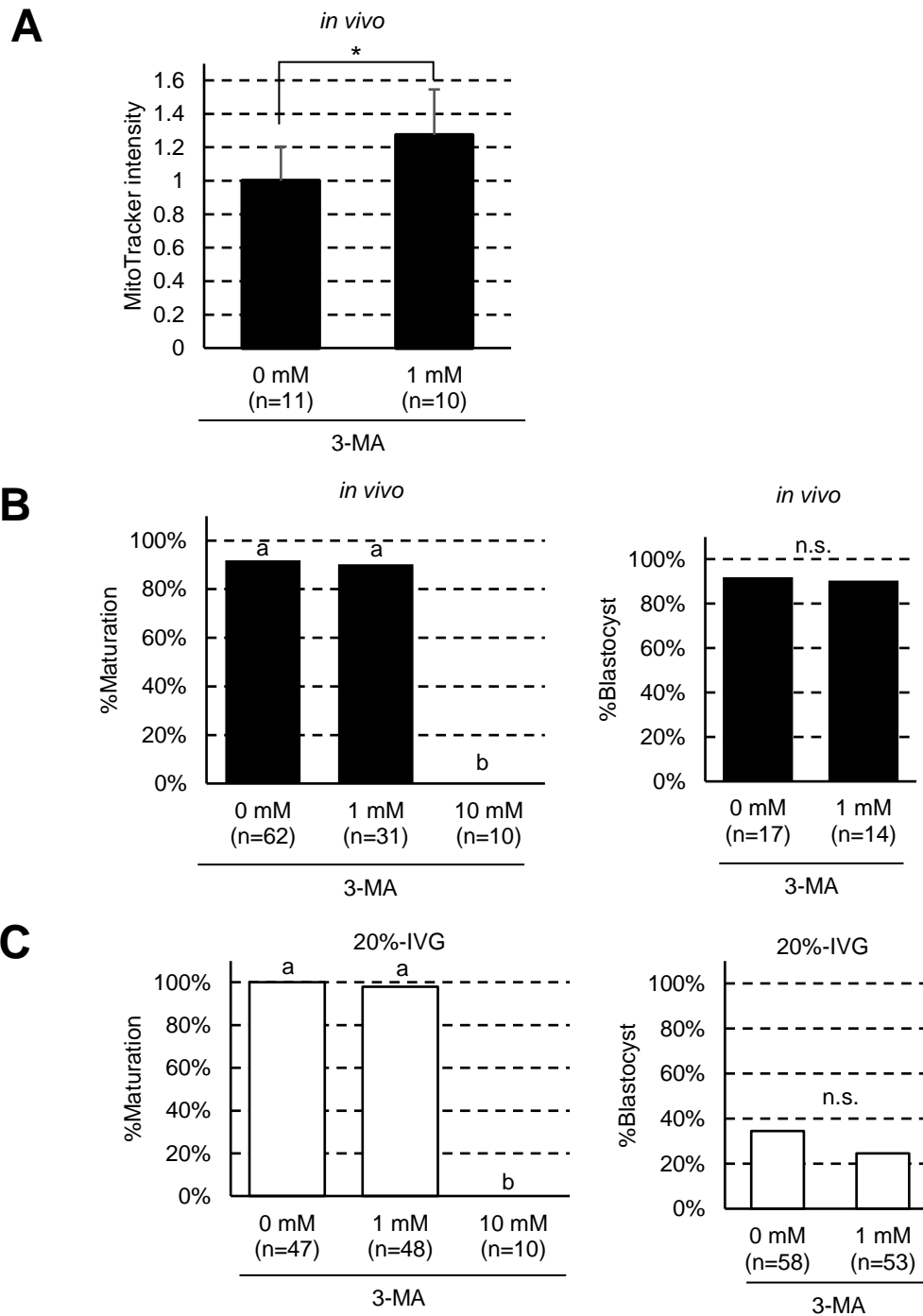


Figure 2-16. 3-MA添加IVM卵子のミトコンドリアおよび発生能解析

*in vivo*卵母細胞およびIVG卵母細胞を3-MA添加IVMに供試した。IVM後の*in vivo*卵子におけるMitoTracker輝度値を用いたミトコンドリア相対定量解析 (A)、*in vivo* (B) および20%-IVG卵母細胞 (C) の成熟能および発生能解析結果。ミトコンドリア量はStudent t-testにより有意差検定を実施した ($p < 0.01$)。成熟率 (MII期卵子/供試COC) および発生率 (胚盤胞期胚/供試受精卵) はTukeyのWSD法を用いて有意差検定を実施した ($p < 0.05$)。

第三章 卵母細胞の発生能に寄与する分子経路の同定

第一節 緒言

発生能を持たない非成長期卵母細胞は卵母細胞成長過程において卵母細胞成熟や初期発生を保障する様々な因子を卵細胞質中に貯蔵することで発生能を獲得する。これらは母性因子と呼ばれ、ミトコンドリアなどの細胞小器官や様々な遺伝子の mRNA・タンパク質など知られている (Zhang & Smith 2015)。subcortical maternal complex 構成する PADI6 や NLRP2、NLRP6 はタンパク質として胚に継承される代表的な母性因子である (Monk *et al.* 2017)。これらの発現制御を担う明確な上流因子は明らかになっていないものの、*Nobox* や *Figla*、*Lhx8* などの卵母細胞成長期移行において中心的役割を担う転写因子の遺伝子発現に伴って発現上昇することが知られ、*Figla* および *Lhx8* 欠損成長期卵母細胞において発現低下することが報告されている (Wang *et al.* 2020, Hamazaki *et al.* 2021)。また mRNA の状態で貯蔵され、卵母細胞成熟で選択的に翻訳されることで機能する遺伝子として *Btg4*、*Zfp3612* および *Cnot6l* などが知られる (Sha *et al.* 2018)。以上のように、発生能を保障する母性因子は多岐に渡り、その全容は未だ明らかになっていない。またこれらの母性因子が卵母細胞成長期移行に関与する転写因子の発現に伴って発現誘導されることは明らかになっているが、発生能獲得に関する明確な上流因子や制御動態などは未だ不明である。

その一方で、これまでに低酸素濃度培養により IVG 卵母細胞の成熟能・発生能改善が報告されており (Eppig & Wigglesworth 1995)、当研究においても通常

培養酸素濃度 20%条件 IVG 卵母細胞と比較して、至適培養酸素濃度 7%条件 IVG 卵母細胞で発生能の改善を明らかにした。この培養酸素条件の最適化により IVG 卵母細胞のミトコンドリア膜電位の低下の軽減が認められたが、培養酸素環境がどのようにして卵母細胞の発生能に寄与したかは依然として不明である。

そこで、*in vivo* 卵母細胞および 5%、7%、10%および 20%酸素条件 IVG 卵母細胞の遺伝子発現解析を実施し、発生能に寄与する分子経路の同定を行った。

第二節 材料および方法

1. シングルセル RNA-seq (scRNA-seq) ライブラリ構築

GV 期卵母細胞から QIAseq FX Single Cell RNA Library Kit (QIAGEN) により scRNA-seq ライブラリを調整し、NextSeq500 によるシーケンシングによりリードデータを得た。ミトコンドリアゲノム抽出同様に卵母細胞を採取した。透明帯除去し、十分量の PBS (-) で洗浄、ガラスキャピラリーを用いて 1×10^{-7} 倍希釈 ERCC RNA Spike-In Mix 1 μ l および PBS (-) 6 μ l を加えた低吸着 0.2 ml チューブ (TaKaRa) に移し入れた。Lysis buffer 4 μ l を加え、タッピングによる混和後、スピンドウンし、余熱したサーマルサイクラーにて溶解反応 (24°C 5 分、95°C 3 分、4°C ∞) に供試した。反応後サンプルに gDNA wipeout Buffer 2 μ l を加え、ゲノム除去反応 (42°C 10 分) に供試した。1 サンプルあたり RT/polymerase Buffer 4 μ l、Oligo dT primer 1 μ l、Quantiscript RT Enzyme mix 1 μ l を混和し 6 μ l の逆転写反応液 (12 μ l 反応系) を調整し、ゲノム除去反応後サンプル 6 μ l を混和し、逆転写反応 (42°C 60 分、95°C 3 分) を実施した。1 サンプルあたり Ligase Buffer 8 μ l、Ligase Mix 2 μ l を混和し 10 μ l の cDNA ライゲーション反応液 (20 μ l 反応系) を調整した。cDNA ライゲーション反応液 10 μ l を逆転写反応後 cDNA サンプル 10 μ l と混和し、cDNA ライゲーション反応 (24°C 30 分、95°C 5 分、4°C ∞) に供試し、cDNA 同士のライゲーションを行った。1 サンプルあたり REPLI-g scReaction Buffer 29 μ l と REPLI-g SensiPhi DNA polymerase 1 μ l を混和することで等温増幅反応液 (60 μ l 反応系) を調整し、cDNA ライゲ-

ション反応後サンプル 30 μl を添加、等温増幅反応（30 $^{\circ}\text{C}$ 2 時間、65 $^{\circ}\text{C}$ 5 分、4 $^{\circ}\text{C}$ ∞ ）により cDNA 増幅を行った。得られた cDNA 等温増幅反応産物 1 μl を ddH₂O で希釈し、Qubit dsDNA HS Assay（Thermo）を用いて cDNA 等温増幅反応産物量を解析した。調整および定量した cDNA 等温増幅反応産物はライブラリ構築に供試するまで−30 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

1 サンプルあたり 10 \times Fx Buffer 5 μl 、 ddH₂O 25 μl 、 Fx Enzyme mix 10 μl を混和し、cDNA 断片化反応液 40 μl （50 μl 反応系）を調整した。これを Qubit の測定値に基づき ddH₂O を用いて 50 ng/ μl に希釈した cDNA 等温増幅反応産物 10 μl と混和し、断片化反応（4 $^{\circ}\text{C}$ 1 分、32 $^{\circ}\text{C}$ 10 分、65 $^{\circ}\text{C}$ 30 分、4 $^{\circ}\text{C}$ ∞ ）に供試した。断片化反応産物に対して Adapter Plate の対応するウェルからアダプター溶液 5 μl を加え、さらに 1 サンプルあたり 5 \times DNA Ligase Buffer 20 μl 、 ddH₂O 15 μl および DNA Ligase 10 μl を混和し調整したアダプターライゲーション反応液 55 μl （100 μl 反応系）を加え、混和する。アダプターライゲーション反応（20 $^{\circ}\text{C}$ 15 分）後、すぐに GeneRead Size Selection Kit（QIAGEN）を用いてライブラリの精製を行った。アダプターライゲーション反応産物全量を 1.5 ml loBind チューブに移し、SB1 Buffer 400 μl を添加後、MinElute spin column に全量供試した。15,000 rpm、1 分の遠心後、Flow-through を破棄し MinElute spin column を 80%エタノールにより二回洗浄した。再度 15,000 rpm、1 分遠心により乾燥させた MinElute spin column に TE Buffer 90 μl を加え、静置（室温、1 分）した。遠心後、回収した Flow-through 90 μl に SB1 Buffer 360 μl 加え、再び同じ MinElute spin column を全量供試し、15,000 rpm で 1 分遠心後、Flow-through を破棄し MinElute

spin column を 80%エタノールにより二回洗浄した。15,000 rpm で 1 分の遠心により乾燥させた MinElute spin column に EB Buffer 17 μ l を加え、静置（室温、1 分）した。遠心後、Flow-through を scRNA-seq ライブラリとして 1.5 ml loBind チューブに回収し、クオリティチェックおよびシーケンシングに供試するまで-30°Cで保存した。scRNA-seq ライブラリを Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) および Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent) による定性評価に供試し、目的とする 500 bp を頂点としたライブラリ分子の分布が見られるか評価した。また KAPA Library Quantification Kits (Roche) および QuantStudio 3 (Thermo) を用いたライブラリ分子の定量解析を実施し、ライブラリ収量の評価およびマルチプレックスライブラリ溶液の調整を実施した。調整したマルチプレックスライブラリ溶液は NestSeq 500 (illumina) および NextSeq 500/550 High Output Kit (illumina) を用いてシーケンシングおよび bcl2fastq (v. 2.18.0.12) を用いたベースコールを実施し、75 nt \times 2 のペアドエンドリードデータ (fastq 形式) を得た。本研究において培養酸素濃度 5%、7%および 10%酸素条件卵母細胞からのライブラリ構築およびシーケンスを実施した。解析に用いた *in vivo* 群および 20%群卵母細胞のシーケンスデータにおいては当研究班において過去に同手法を用いて構築されたライブラリのシーケンシングデータを用いた (2019 年修了藤丸)。供試卵母細胞のうち 10%群のみ一回、それ以外は 2 回の独立した IVG により供試卵母細胞を作出した。

2. GV 期卵母細胞のシングルセル RNA-seq データの解析

得られたリードデータのうち Read1 のみを解析に供試した。TrimGalore!(https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/)を用いて低クオリティ塩基のトリミングおよび短いリードのフィルタリング (35nt) を実施した。各処理段階におけるリードオリティは FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) により可視化した。クオリティコントロール後リードデータの Hisat2 (v2.1.0) (Kim *et al.* 2015) を用いたリファレンスゲノムへのアライメントにより得られたアライメントデータから featureCounts (Liao *et al.* 2014) (v1.6.5) によってリファレンスアノテーション情報にもとにしたリードカウントデータを得た。

本解析で用いたリファレンスデータは、iGenomes (https://jp.support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/igenome.html) よりダウンロードした GRCm38 (Ensembl) を用いた。featureCounts が出力した各遺伝子に対するリードカウントおよび転写産物長を参照し CPM (counts per million) 法により正規化した遺伝子発現量を算出した。遺伝子発現プロファイルの比較解析として hclust を用いた最隣法による階層的クラスタリング解析、cor を用いたピアソンの積率相関係数の算出および prcomp による主成分分析を実施した。これらの解析にはいずれかのサンプルで発現 (CPM>0) が認められた遺伝子の $\log_2(\text{CPM}+1)$ を元の実施した。また R (v3.5.1、<https://www.R-project.org/>) および DESeq2 (v1.20) (Love *et al.* 2014) による ward 法を用いて発現変動遺伝子 (padj<0.05) を検出した。エンリッチメント解

析は DAVID (v6.8、<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>) により実施した ($q\text{-value}<0.05$)。

3. シーケンスデータの公開

解析に用いたデータセットのうち、20%群、7%群および *in vivo* 群のシーケンスデータはアーカイブ上 DRA011982 で公開し、5%群および 10%群のデータセットに関しては未公開とした。

4. LC-MS によるセラミド定量解析

卵母細胞からクロロホルム法により脂質抽出を実施し、LC-MS を用いて各群 GV 期卵母細胞のスフィンゴ脂質含有量を解析した。ミトコンドリアゲノム抽出同様の手法を用いて透明帯を除去した各群卵母細胞 (110-181 個) を 0.1%PVA/PBS で洗浄後、スクリーキャップチューブに ddH₂O 15 μ l と共に移し入れ、液体窒素で凍結後、脂質抽出まで -80°C で冷凍暗所保存した。脂質抽出は、チューブにメタノールおよびクロロホルムを加え、浸とう後、上清を回収し、遠心濃縮機を用いて遠心乾固した。これをクロロホルム 10 μ l、メタノール 90 μ l を加え、浸とうすることで脂質抽出溶液を調整した。これを Nexera XR (島津製作所) および QTRAP5500 (エービーサイエックス) を用いて LC-MS 解析した。カラムには L-column2 (C8 メタルフリー、50 mm \times 2.0 mm、3 μ m) を使用し、内部標準には C16 セラミド (d18:1/16:0) (Merc) を用いて実施した。本解析には独立 3 回の IVG およびサンプリングにより卵母細胞を得た。また脂

質抽出以降は、一般財団法人化学物質評価研究機構に委託した (<https://www.cerij.or.jp/>)。得られた測定値は Tukey-kramer 法により検定した。

5. フモニシン B1 およびスフィンゴシンーリン酸添加 IVG

第二章二節-4、5、6 同様にして IVG 卵母細胞の作出およびその発生能の解析を行い、通常培養 20%酸素濃度条件下でセラミド合成酵素阻害剤フモニシン B1 およびスフィンゴシンーリン酸添加 IVG を実施した。フモニシン B1 (cayman) はメタノール (富士フィルム) に溶解し、1 mM ストックを調整した。スフィンゴシンーリン酸 (cayman) はメタノールに溶解し 1 mM ストックを調整した。使用まで -30°C で暗所保存した。添加培地調整時には、添加薬剤溶媒濃度が 1%以下となるよう溶媒を調整した。

第三節 結果

1. 5%、7%、10%および20%酸素条件 IVG 卵母細胞および *in vivo* 卵母細胞の遺伝子発現プロファイル解析

5%、7%、10%および20%酸素条件における IVG 卵母細胞および *in vivo* 卵母細胞の単一遺伝子発現プロファイル解析を実施した。解析の結果、5%群 (n=24)、7%群 (n=24)、10%群 (n=10)、20%群 (n=21) および *in vivo* 群 (n=23) の合計 102 卵母細胞において 25,065 遺伝子の発現を検出した。全発現遺伝子の発現量をもとにした主成分分析の結果、PC1 (寄与率 92.5%)、PC2 (寄与率 1.0%) 平面において主集団が左上にクラスタ形成した一方で、そこから外れて右下に流れるようにプロットされた亜集団 (PC1>0.5) が見られた (Figure3-1)。第一主成分に強く寄与する 204 遺伝子 (第一主成分への因子負荷量>3S.D.) のエンリッチメント解析を行った結果、「regulation of translation」や「Cell cycle」など卵母細胞における生物学的経路に関連する term が濃縮され、それらには卵母細胞で高発現する *Cpebl* や *Dazl*、*Ccno*、*Ccnb* が含まれていた (Figure3-2)。亜集団が成長過程の卵母細胞集団であった場合、成長過程で発現上昇する卵母細胞特異的遺伝子は一様に発現低下傾向を示すと考えられる。しかしながら、各卵母細胞における遺伝子発現量と第一主成分得点に着目したところ、第一主成分得点の増加に伴って *Cpebl* は増加、*Dazl* は減少傾向にあり、その他の遺伝子においても一様の発現異常が認められなかった。このことから、亜集団に属した卵母細胞は正常な卵母細胞成長過程から逸脱し、異常な遺伝子発現プロファイルを獲得した卵母細胞集団であると考えられた。

亜集団に属した卵母細胞を除き、再度主成分分析を行った結果、PC1/2 平面上に *in vivo* 群に向かい 20%、10%、7%、5%と培養酸素濃度の低下に伴って近接するようにプロットされた (Figure3-3)。5%群は至適培養酸素条件 7%群よりも *in vivo* 群に近い遺伝子発現プロファイルを有する一方で、亜集団に最も多くの卵母細胞が含まれた (33%、n=8/24)。これは 5%群において卵母細胞成熟率が低下する一方で、成熟を完了できた卵子の胚発生能が向上するという成熟前卵母細胞の不均一性と符合した。

2. 20%酸素条件 IVG 卵母細胞に特異的な発現異常遺伝子の解析

次に IVG の至適酸素条件が卵母細胞遺伝子発現プロファイルに与えた影響を明らかに、発生能改善を支持する分子生物学的制御機構を理解するため、通常培養条件 20%群、至適酸素条件 7%群および *in vivo* 群の遺伝子発現プロファイルに着目した。3 群での主成分分析の結果、PC1 (寄与率 93.7%) において *in vivo* 群、7%群および 20%群と発生能の低下に伴って左側にプロットされた (Figure3-4)。また階層的クラスタリング解析の結果、7%群は 20%群よりも *in vivo* 群に近いクラスタに分類され、発生能だけでなく遺伝子発現プロファイル規模で *in vivo* 卵母細胞に近い卵母細胞特性を獲得していた (Figure3-5)。そこでどのような遺伝子が培養酸素条件に従って発現変動し、そして発生能に寄与したのかを解明するため、*in vivo* 群に対する 7%および 20%群間の遺伝子発現変動を解析し、*in vivo* 群と 20%群間における発現変動遺伝子 4,386 遺伝子、*in vivo* 群と 7%群間における発現変動遺伝子 4,357 遺伝子を検出した ($p_{adj}<0.05$)。

得られた発現変動遺伝子のうち 1,831 遺伝子は培養酸素条件に関係なく IVG 卵母細胞で共通した発現変動を示す一方で、2,555 遺伝子は 20%群、2,526 遺伝子は 7%群において特異的に発現変動した (Figure3-6)。これらのうち 20%群において特異的に発現変動を示した 2,555 遺伝子は通常酸素条件 20%群で発現異常を示し、至適酸素条件 7%群で遺伝子発現が改善することから発現能改善に関与する分子生物学的経路の濃縮が期待された。そこでエンリッチメント解析を実施した結果、主成分分析同様に「Cell cycle」や「covalent chromatin modification」など卵母細胞における Biological process を反映した term の濃縮が見られた一方で、卵母細胞成長とは無関係に考えられる「Apoptotic process」および「Sphingolipid signal pathway」が濃縮された ($q < 0.05$) (Figure3-7)。スフィンゴ脂質代謝経路は、細胞膜成分であるスフィンゴミエリンを代謝し、また脂質メディエーターとして細胞死を誘起するセラミドならびに、細胞生存を促すスフィンゴシンーリン酸を代謝する経路として知られる。またスフィンゴ脂質代謝はスフィンゴ脂質を新規合成する *de novo* 経路とセラミド・スフィンゴシンーリン酸を相互変換し、細胞死を制御する *salvage* 経路の 2 つの経路からなり、セラミド合成が亢進された場合、アポトーシスが誘起され、ミトコンドリア損傷が生じる (Gudz *et al.* 1997, Larsen & Tennagels 2014)。濃縮されたスフィンゴ脂質代謝遺伝子に着目したところ、*de novo* 経路ではセリンおよびパルミトイル CoA よりジヒドロスフィンゴシンを合成するセリン・パルミトイル転移酵素、ジヒドロスフィンゴシンからジヒドロセラミドを合成するセラミド合成酵素およびジヒドロセラミドからセラミドを合成するジヒドロセラミド不飽和化酵素

をコードする遺伝子 *Sptlc1*、*Cers6* および *Degs1* の発現変動が見られ、いずれの場合も 20%群において発現上昇を示した (Figure3-8)。また salvage 経路ではスフィンゴミエリンからセラミドを合成するスフィンゴミエリンホスホジエステラーゼとセラミドからスフィンゴミエリンを合成するスフィンゴミエリン合成酵素をコードする *Smpd1*、*Spmd2*、*Sgms1* および *Sgms2* の 20%群における特異的な発現低下が見られた。その一方で、スフィンゴシンーリン酸からスフィンゴシンを合成するスフィンゴシンーリン酸ホスファターゼとスフィンゴシンからセラミドを合成するセラミド合成酵素をコードする *Sgpp2* および *Cers6* は 20%群特異的に発現上昇を示した。これら個々の代謝関連遺伝子の発現変動をスフィンゴ脂質代謝経路の活性状態として考えると、20%群においてセラミド合成の異常亢進が示唆された。これは「Sphingolipid signal pathway」と同時に「Apoptotic process」が濃縮したことにとも符合した。

次に「Apoptotic process」に含まれた遺伝子中で最高発現を示し、20%酸素条件 IVG 卵母細胞で発現低下を示した *Bcl2l10* に着目した。*Bcl2l10* はアポトーシスのトリガーとなる小胞体からミトコンドリアへのカルシウムイオン流入を抑制する抗アポトーシス遺伝子であり、成長期卵母細胞以降に特異的な発現を示し、受精卵まで高発現を示す一方で 2 細胞期に移行すると著しい発現低下を示すことが知られている (Yoon *et al.* 2009, Bonneau *et al.* 2016)。またオートファジー関連遺伝子でありながら BCL2 ファミリーの阻害によりアポトーシスを誘導する機能的側面が知られる *Atg5* は有意ではないものの、20%群特異的な発現上昇傾

向が認められ、*Bcl2l10* と *Atg5* の遺伝子発現量は強い負の相関を示した ($r=-0.85$) (Figure3-9)。

3. ミトコンドリア関連遺伝子の発現解析

これまでに IVG 卵母細胞において多数のミトコンドリア異常が見られたことから、ミトコンドリア制御に関係する遺伝子の発現動態に着目した解析を実施した。ミトコンドリア分裂を制御する *Drp1* およびミトコンドリア融合を制御する *Mfn1* は 7%群特異的に発現低下を示す一方でその他のミトコンドリア融合制御遺伝子 *Mfn2* および *Opal* の異常発現は認められなかった ($\text{padj}<0.05$) (Figure3-10)。またミトコンドリアゲノムに結合することでミトコンドリアゲノムの安定化に寄与し、またミトコンドリアゲノム複製への関与も知られる *Tfam* は 20%群特異的な発現低下を示した ($\text{padj}<0.05$)。しかしながらミトコンドリア増殖に関与するその他の遺伝子のうち *Pgcl1a*、*Pgcl1b* および *Nrf2* は 7%群特異的な発現低下を示した ($p<0.05$)。さらに *in vivo* 群卵母細胞と比較してミトコンドリア DNA コピー数は低下しているにも関わらず、*mt-Rnr2* や *mt-Nd1*、*mt-Cytb*、*mt-Co1*、*mt-Nd4* などのミトコンドリアゲノム上にコードされる遺伝子のほとんどが 20%群特異的な発現上昇を示した ($p<0.05$)。以上のようにミトコンドリア関連遺伝子の一部には顕著な発現変動が認められた一方で、IVG 卵母細胞におけるミトコンドリア動態の異常や発生能改善を説明しうる異常性を抽出することはできなかった。

4. 卵母細胞セラミド含有量の定量解析

遺伝子発現解析の結果、20%酸素条件 IVG 卵母細胞におけるセラミドの異常蓄積が示唆された。そこで本解析は LS-MS 解析を用いて 20%群、7%群および *in vivo* 群卵母細胞のセラミド含有量の比較解析を行った。その結果、*in vivo* 群 1.0 ± 0.02 (n=3) に対し、20%群で 1.9 ± 0.26 倍 (n=3) と顕著にセラミド含有量は増加した ($p < 0.05$) (Figure3-11)。その一方で 7%群では 1.3 ± 0.03 倍 (n=3) とセラミド量の顕著な増加は見られず、スフィンゴ脂質代謝経路の遺伝子発現傾向に符合した。また各群卵母細胞におけるセラミド含有量の増加傾向は、ミトコンドリア膜電位の解析結果と強い負の相関を示した ($r = -0.99$)。

5. セラミド合成阻害剤およびスフィンゴシンーリン酸添加 IVG により産生された卵母細胞の発生能解析

通常培養 20%酸素条件により作出された IVG 卵母細胞においてスフィンゴ脂質代謝異常およびセラミド含有量の増加が明らかになり、発生能低下の一因となっていることが示唆された。そこで IVG 卵母細胞のセラミド合成量低下による発生能改善を目的に、セラミド合成阻害剤フモニシン B1 添加 IVG を実施し、得られた卵母細胞の胚盤胞期への発生能解析を行った。フモニシン B1 は構造的特徴からセラミド合成の競争阻害剤として作用する (Wang *et al.* 1991, Bose *et al.* 1995)。0、0.1、1 および 10 mM 添加区を設けた。しかしながら試験区間においてフモニシン B1 添加による有意な発生能改善は認められなかった (Figure3-12)。またフモニシン B1 添加によって卵胞細胞が黒ずみ、また細胞の輪郭が目立つような形態的变化が見られた。次にスフィンゴシンーリン酸とセラミド間の量的

バランスの正常化による発生能改善を目的とし、スフィンゴシンーリン酸 0、10 および 100 nM 添加区を設け、スフィンゴシンーリン酸添加 IVG を実施し、作出卵母細胞の胚盤胞期への発生能を解析した。しかしながらフモニシン B1 添加同様に発生能改善は認められず、また支持細胞の退行が見られた (Figure3-12)。

第四節 考察

5%、7%、10%および20%酸素条件 IVG 卵母細胞および *in vivo* 卵母細胞の遺伝子発現プロファイルの解析により、異常な卵母細胞遺伝子発現プロファイルを有する亜集団および培養酸素濃度低下に伴って IVG 卵母細胞の遺伝子発現プロファイルが *in vivo* 群に近づくことが明らかとなった。主集団に着目した際は5%酸素条件 IVG 卵母細胞が最も *in vivo* 卵母細胞集団に近い遺伝子発現プロファイルを示した一方で、卵母細胞成長不全を示す亜集団に5%酸素濃度条件 IVG 卵母細胞が多数含まれていた。矛盾するようなこれらの特性は、20%酸素条件と比べ5%酸素条件では成熟率が有意に低下するものの、成熟を完了できた卵子の発生率は高いという5%酸素条件における成熟前卵母細胞の不均一性を反映するものと考えられた。5%酸素条件 IVG 卵母細胞では解析した卵母細胞の33% (8/24) が亜集団に属していた。これに対し、7%酸素条件 IVG 卵母細胞では、亜集団に含まれる卵母細胞は8% (2/24) とほとんど見られなかった。これにより7%酸素条件が5%酸素条件と比較してより均一な卵母細胞集団の産出に成功していることが示唆された。

次に20%酸素条件 IVG 卵母細胞、7%酸素条件 IVG 卵母細胞および *in vivo* 卵母細胞における発現変動遺伝子解析の結果、20%酸素条件 IVG 卵母細胞で特異的に発現変動を示す2,555遺伝子には、「cell cycle」や「cell division」に見られる細胞分裂関連遺伝子および「vesicle-mediated transport」や「Endocytosis」に見られる細部内輸送・細胞外分泌関連遺伝子などの卵母細胞特性を大きく反映したGO termおよびKEGG pathwayの濃縮が見られた。これらは20%酸素条件 IVG

卵母細胞における特定の分子経路や細胞生物学的経路に限定しない大規模な卵母細胞遺伝子発現プロファイルの異常が示唆された。また、これまでに卵母細胞成長に従った DNA メチル化に代表されるエピゲノム修飾パターンの確立が知られ、細胞分裂関連遺伝子や細胞内輸送、細胞外分泌関連遺伝子同様に濃縮が見られた「covalent chromatin modification」は、20%酸素条件 IVG 卵母細胞におけるエピゲノム修飾パターンの異常を示唆した (Hiura *et al.* 2006)。近年、IVG 卵母細胞は DNA メチル化レベルが *in vivo* 卵母細胞と比較して低下することが報告され、また 20%酸素条件と比較して、5%酸素条件下で作出された IVG 卵母細胞では DNA メチル化レベルの低下が部分的に改善することが報告されており、本解析結果に符合した (Naillat *et al.* 2021)。その一方で卵母細胞成長の関連性があまり知られていない「Apoptotic process」および「Sphingolipid signal pathway」の濃縮が認められた。これらの GO term および KEGG pathway に属する遺伝子の発現動態から、遺伝子発現制御レベルでの 20%酸素条件 IVG 卵母細胞におけるアポトーシス誘導およびセラミド合成経路の異常亢進が明らかとなった。「Apoptotic process」に含まれた遺伝子中で最高発現を示した *Bcl2l10* は抗アポトーシス遺伝子と知られるだけでなく、卵母細胞成熟能へ寄与することが報告されており、アポトーシス関連遺伝子発現制御機構と卵母細胞成熟との関連性が示唆されている (Yoon *et al.* 2009, Bonneau *et al.* 2016)。また、スフィンゴ脂質代謝遺伝子に着目したところ、代謝経路を構成する遺伝子群の発現変動パターンから *de novo* 経路におけるセリンおよびパルミトイル CoA からの新規セラミド合成および salvage 経路におけるスフィンゴシンーリン酸およびスフィ

ンゴシンからのセラミド変換の異常亢進が示唆され、LC-MS 解析の結果、20%酸素条件 IVG 卵母細胞に特異的なセラミド含有量の増加が見られた。セラミドはアポトーシスを誘導し、ミトコンドリア機能を阻害することが知られており、20%酸素条件 IVG 卵母細胞におけるミトコンドリア膜電位の低下やアポトーシス遺伝子の発現誘導はセラミド量の増加によるものと考えられた (Gudz et al. 1997, Larsen & Tennagels 2014)。これまでに卵母細胞におけるスフィンゴ脂質シグナル制介したアポトーシスが胎仔期卵巣において報告されている (Morita et al. 2000)。スフィンゴミエリンからセラミドを代謝するスフィンゴミエリナーゼをコードする *Smpd1* の遺伝子欠損マウス新生仔卵巣において原始卵胞、一次卵胞および二次卵胞の過形成が見られ、また野生型 E13.5 卵巣の器官培養へスフィンゴシンーリン酸を添加することで濃度依存的に卵母細胞減数の抑制が生じることが報告された。これらの報告により卵母細胞が潜在的にスフィンゴ脂質代謝を介したアポトーシス制御機構を有することが示唆された。また肥満症で報告される卵母細胞・卵子の品質低下の一部にスフィンゴ脂質の増加とミトコンドリア活性の低下の関与が示唆されている。低発生能を呈する肥満症母体由来卵子ではミトコンドリア膜電位の低下や異常局在が見られ、他方で、セラミド前駆物質であるパルミチン酸の卵胞環境中の濃度上昇が報告されている (Igosheva et al. 2010, Valckx et al. 2014, Wu et al. 2015)。近年、このパルミチン酸添加 IVM により作出された卵子でセラミド含有量の増加、ミトコンドリア機能低下および成熟能の低下が報告され、スフィンゴ脂質代謝によるミトコンドリア機能と卵子コンピテンシーの密接な関係性が示唆された (Itami et al. 2018)。

以上のことから本研究により示唆されたスフィンゴ脂質代謝遺伝子の遺伝子発現制御によるセラミド含有量、ミトコンドリア健全性および胚発生能保障の一連の制御動態は、IVG 卵母細胞に限らず、生体内における卵母細胞成長においても機能的であることが示唆された。

哺乳動物細胞におけるミトコンドリア制御機構の全容解明には未だ至っていないものの、これまでに多数のミトコンドリア制御遺伝子が同定されており、それら制御遺伝子の異常はミトコンドリア機能低下や細胞障害を誘起する。ミトコンドリア DNA の安定性に寄与し、またミトコンドリア DNA からの遺伝子発現を制御する *Tfam* やミトコンドリア増殖への関与が報告される *PGC1a*、*PGC1b*、*Nrfl* および *Nrf2* が知られる。またミトコンドリアの分裂 (fission) および融合 (fusion) を通じた形態制御においては *Drp1*、*Mfn1*、*Mfn2* および *Opal* の関与が知られている。IVG 卵母細胞における遺伝子発現解析の結果、これらミトコンドリア制御遺伝子の一部 (*Tfam* や *Drp1*、*Mfn2*) に有意な発現変動が見られた一方で、発生能改善やミトコンドリア異常などを説明しうる分子生物学的機序は見いだせなかった。また、*mt-Rnr2* や *mt-Nd1*、*mt-Cytb*、*mt-Col*、*mt-Nd4* などのミトコンドリアゲノムにコードされる遺伝子のほとんどに 20% 群特異的な発現上昇が見られた。

最後にスフィンゴ脂質代謝経路の異常が IVG 卵母細胞発生能に与える影響を検証するために、セラミド合成阻害剤フモニシン B1 およびスフィンゴシンーリン酸の添加 IVG を実施し、作出された卵母細胞の発生能解析を実施した。しかし、いずれの添加培養においても発生能改善は見られず、むしろ培養卵胞の形

態的異常が生じた。これは添加薬剤が卵母細胞のみならず、支持細胞にも影響し、予期せぬ作用が生じたためと考えられた。またフモニシン B1 は構造的類似性から CerS ファミリー遺伝子にコードされるセラミド合成酵素の活性を阻害することが報告される (Zitomer *et al.* 2009)。これまでの卵母細胞における添加実験では成熟率の低下、ミトコンドリア機能の低下および酸化ストレスの増大が報告されており、卵母細胞に対してはセラミド合成阻害活性が低く、逆に細胞毒性を有することが示唆されてきている (Wang *et al.* 1991, Bose *et al.* 1995, Morita *et al.* 2000, Li *et al.* 2021)。また、スフィンゴシンーリン酸の添加実験に関しては、スフィンゴシンーリン酸からセラミドを合成する salvage 経路が活性化しているため、結果的にセラミド合成量の増加を促進した可能性が考えられた。

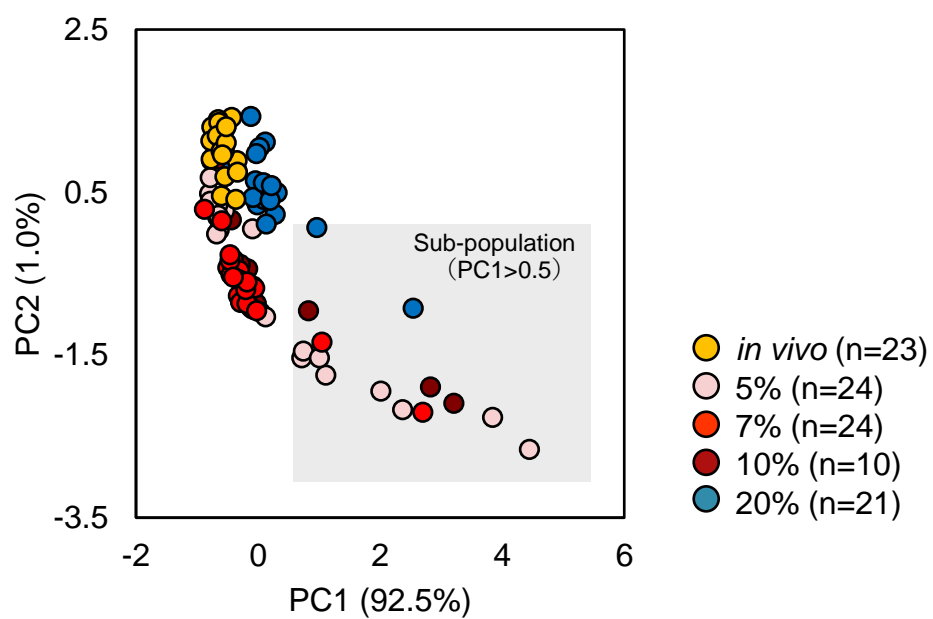


Figure 3-1. 5%、7%、10%および20%酸素条件IVG卵母細胞と*in vivo*卵母細胞の主成分分析

遺伝子発現解析により得られた各群の卵母細胞における遺伝子発現プロファイルの主成分分析結果を第一主成分および第二主成分平面上にプロットした。主集団は左上にクラスタ化し、右下に流れるようにして存在する亜集団が見られた（網掛け）。

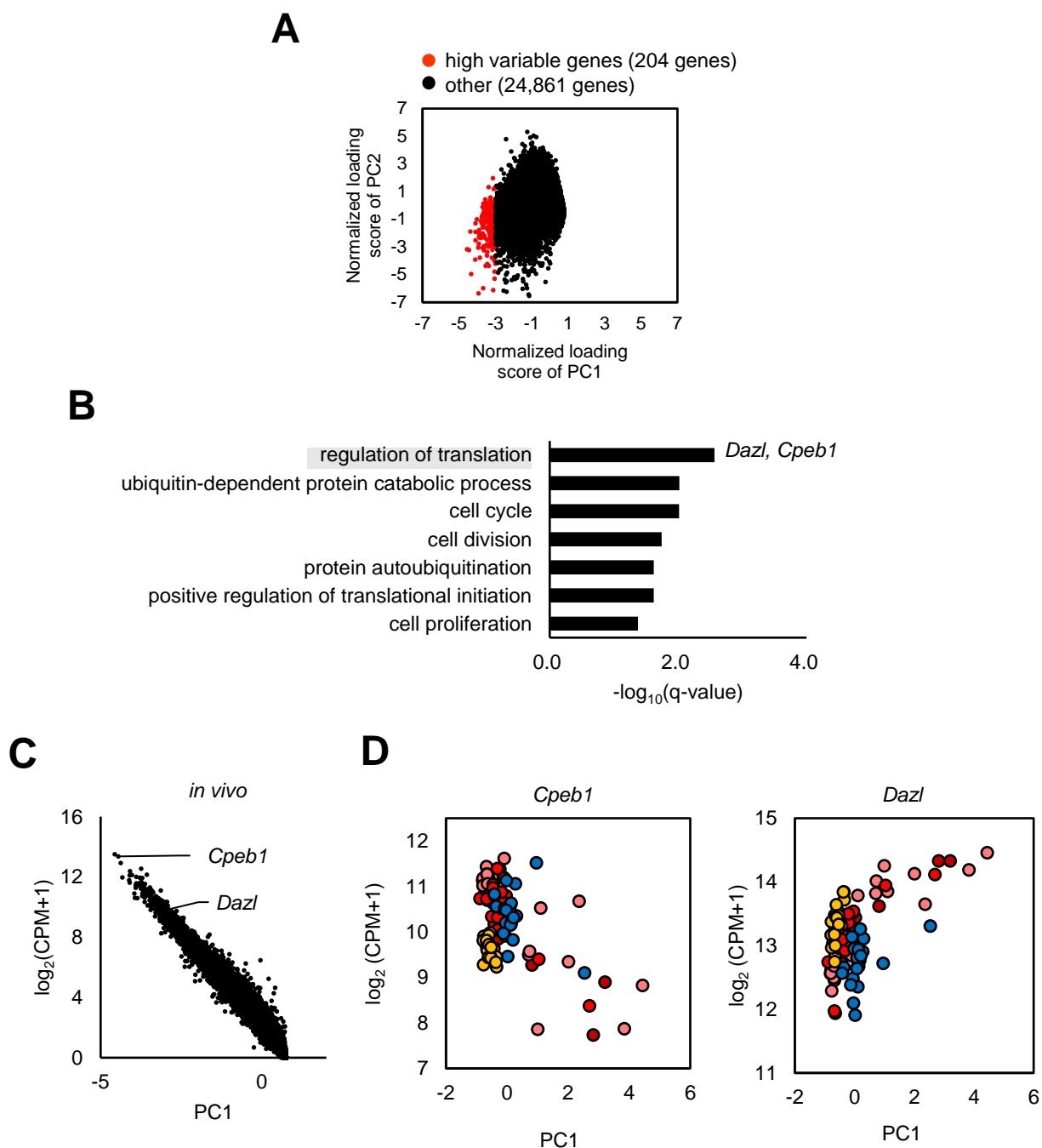


Figure 3-2. 主成分分析で見られた亜集団の解析

主成分分析で見られた亜集団のプロファイル解析を行った。(A) 第一主成分への正規化後負荷因子量が3 S.D.より大きい204遺伝子を高変動遺伝子(赤点)として同定した。(B) 高変動遺伝子のエンリッチメント解析の結果、卵母細胞成長に関するtermの濃縮が見られ、特に*Dazl*や*Cpeb1*が含まれる翻訳制御のtermが強く濃縮された(網掛け)。(C) *in vivo*群における各遺伝子発現量平均値と第一主成分への負荷因子量を示した。(D) 各卵母細胞の第一主成分得点と*Cpeb1*および*Dazl*の遺伝子発現量を示した。

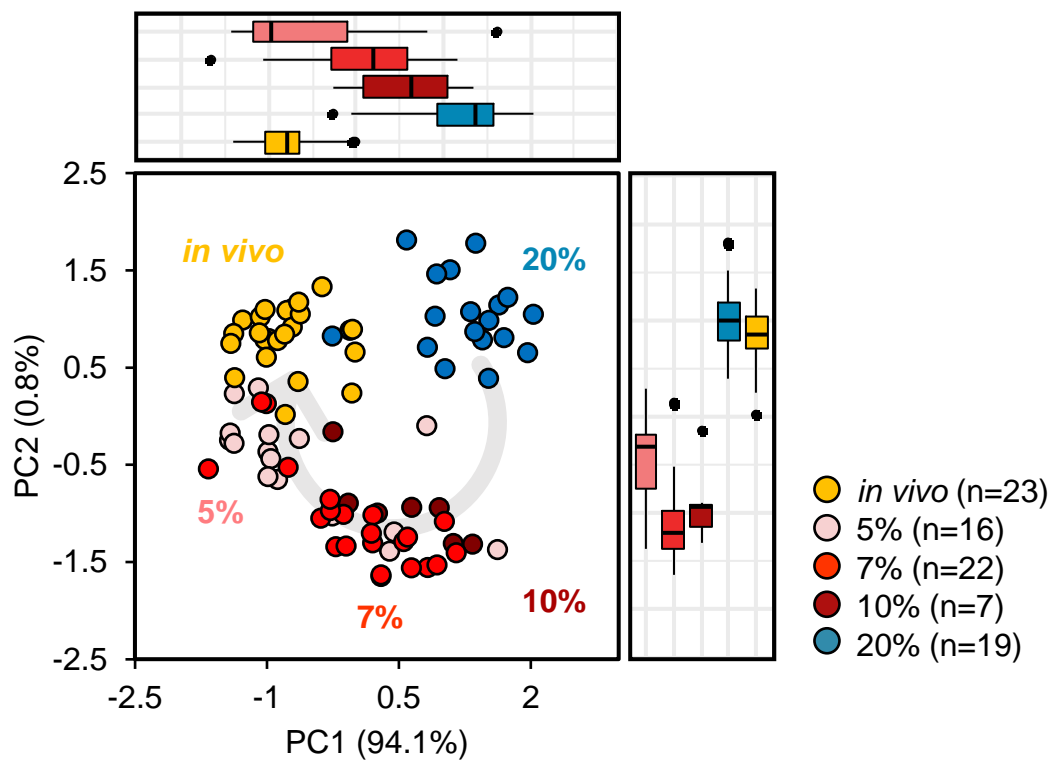


Figure 3-3. 亜集団除去後の5%、7%、10%および20%酸素条件IVG卵母細胞と *in vivo*卵母細胞の主成分分析

亜集団に属した5%-#24、#30、#33、#23、#22、#27、#34、#32、7%-#56、#40、10%-#10、#3、#7、20%-#1、#11の15卵母細胞は除外した。(中央) 亜集団除去後の各群の卵母細胞における遺伝子発現プロファイルの主成分分析結果を第一主成分および第二主成分平面上にプロットし、(右・上) 各主成分における主成分得点の分布を箱ひげ図で表した。

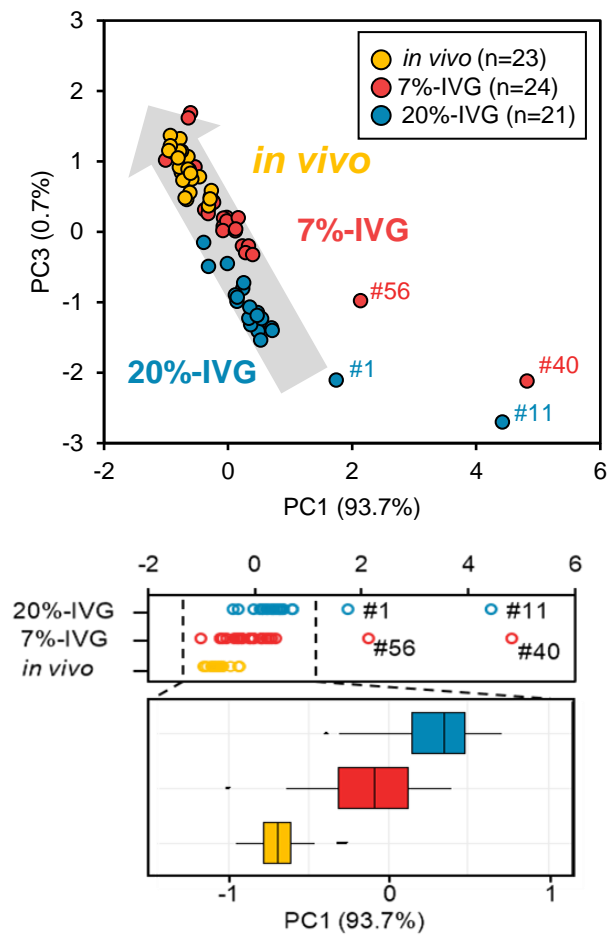


Figure 3-4. 7%および20%酸素条件IVG卵母細胞と*in vivo*卵母細胞の主成分分析

(上段) 7%および20%酸素条件IVG卵母細胞と*in vivo*卵母細胞の主成分分析の結果を第一主成分および第二主成分平面に示した。亜集団に属した7%群2検体 (#40、#56) および20%群2検体 (#1、#11) は、本解析においても大きく外れた箇所に位置した。(下段) 第一主成分得点の各群の分布を示した。DOI: 10.1530/REP-21-0209

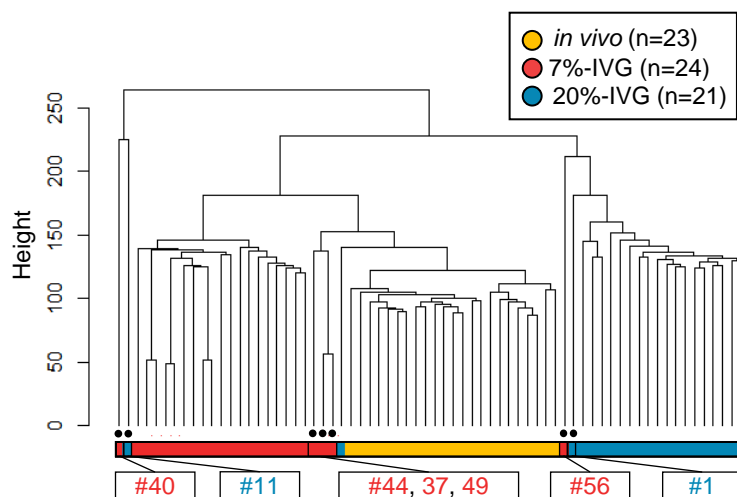


Figure 3-5. 7%および20%IVG卵母細胞と*in vivo*卵母細胞の階層的クラスタリング

階層的クラスタリングを実施した。ラベルは赤色が7%群、黄色が*in vivo*群、青色が20%群をそれぞれ示し、大部分の卵母細胞は由来する群ごとにクラスタを形成した。また亜集団に属した7%群2検体（#40、#56）および20%群2検体（#1、#11）はこの集団からも外れてクラスタリングされた。また20%群1検体および7%群3検体（#44、#31、#49）はIVG卵母細胞でありながら*in vivo*群クラスタに属した。 DOI: 10.1530/REP-21-0209

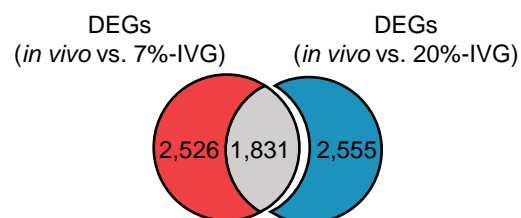


Figure 3-6. *in vivo*群に対する7%群および20%群の発現変動遺伝子の重複と20%群特異的な異常発現遺伝子の抽出

*in vivo*群と20%群間における発現変動遺伝子4,386遺伝子、*in vivo*群と7%群間における発現変動遺伝子4,357遺伝子のうち1,831遺伝子は培養酸素条件に関係なくIVG卵母細胞で共通した発現変動を示した。また2,555遺伝子は20%群において、2,526遺伝子は7%群において特異的に発現変動したDOI: 10.1530/REP-21-0209。

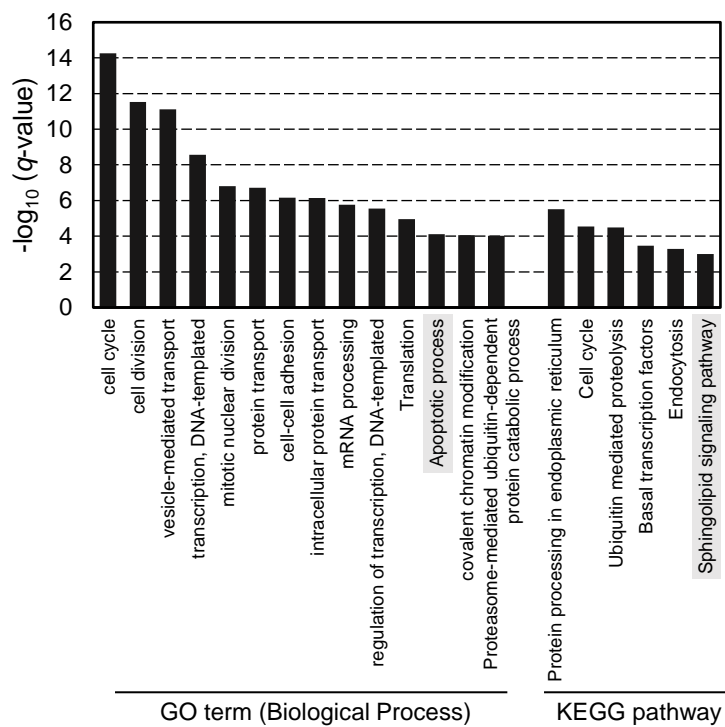


Figure 3-7. 20%群特異的異常発現遺伝子のエンリッチメント解析

(A) 20%群特異的に発現変動を示した2,555遺伝子のエンリッチメント解析により有意な濃縮が見られたGO term および KEGG pathway ($q < 0.05$)。DOI: 10.1530/REP-21-0209

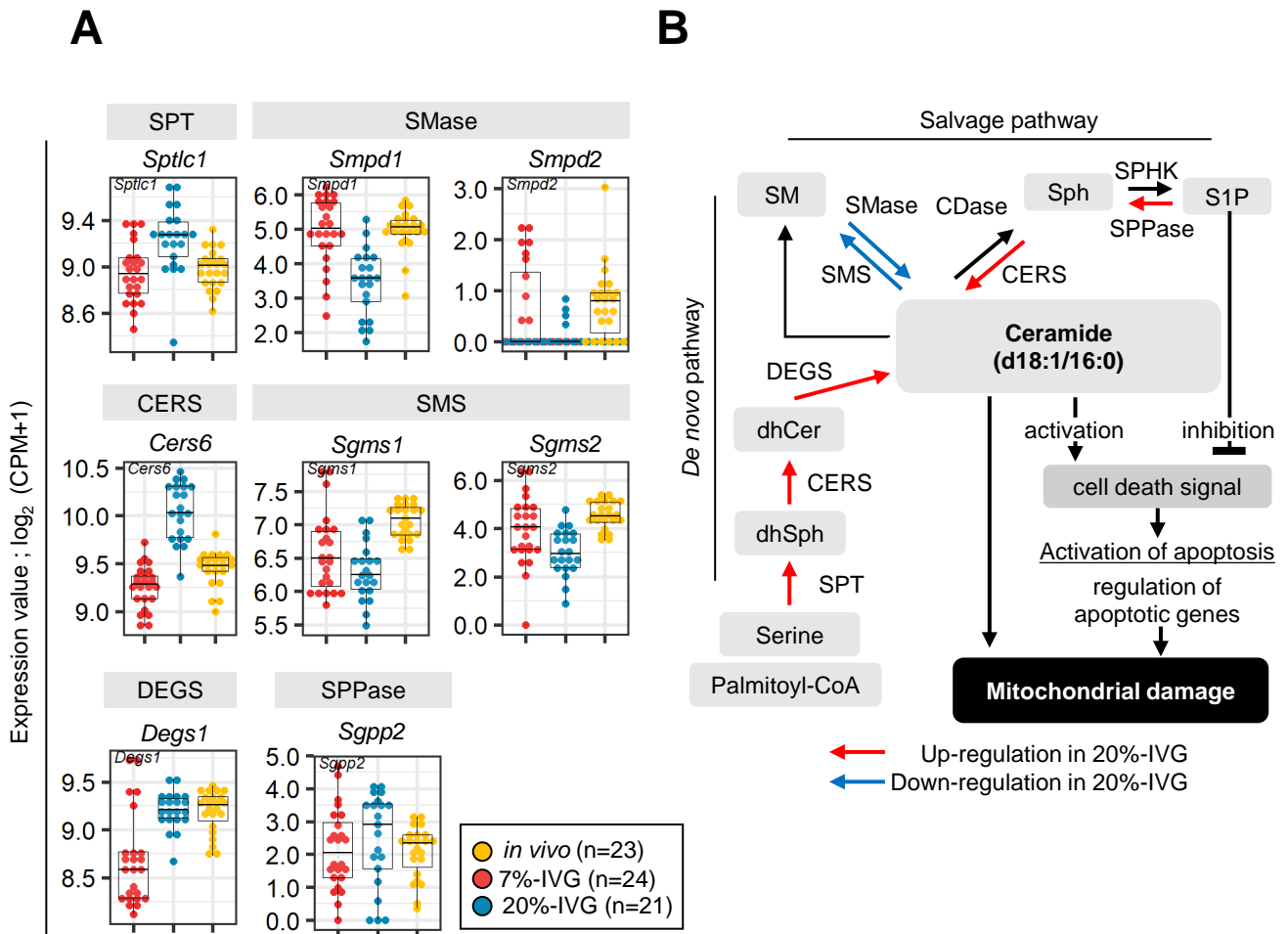


Figure 3-8. 20%および7%IVG卵母細胞および*in vivo*卵母細胞におけるスフィンゴ脂質代謝関連遺伝子の発現

(A) 20%群特異的発現変動を示したスフィンゴ脂質代謝遺伝子の発現を示した。(B) スフィンゴ脂質代謝経路図。20%群において異常発現上昇する場合は赤色、発現低下する場合は、青色の矢印でそれぞれの代謝経路を示した。SPTはセリン・パルミトイル転移酵素、SMaseはスフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ、CERSはセラミド合成酵素、SMSはスフィンゴミエリン合成酵素、DEGSはジヒドロセラミド不飽和化酵素およびSPPaseはスフィンゴシンーリン酸ホスファターゼ、CDaseはセラミド分解酵素、SPHKはスフィンゴシンキナーゼを表し、またdhSphはジヒドロスフィンゴシン、dhCerはジヒドロセラミド、Sphはスフィンゴシン、S1Pはスフィンゴシンーリン酸、SMはスフィンゴミエリンを表す。

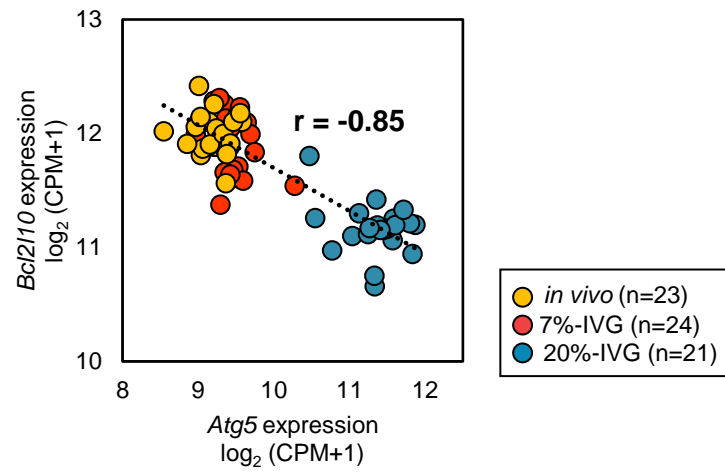


Figure 3-9. 抗アポトーシス遺伝子 *Bcl2l10* とアポトーシス遺伝子 *Atg5* の発現

20%群、7%群および *in vivo* 群卵母細胞における *Bcl2l10* 発現と *Atg5* 発現は強い負の相関を示した ($r=-0.85$)。

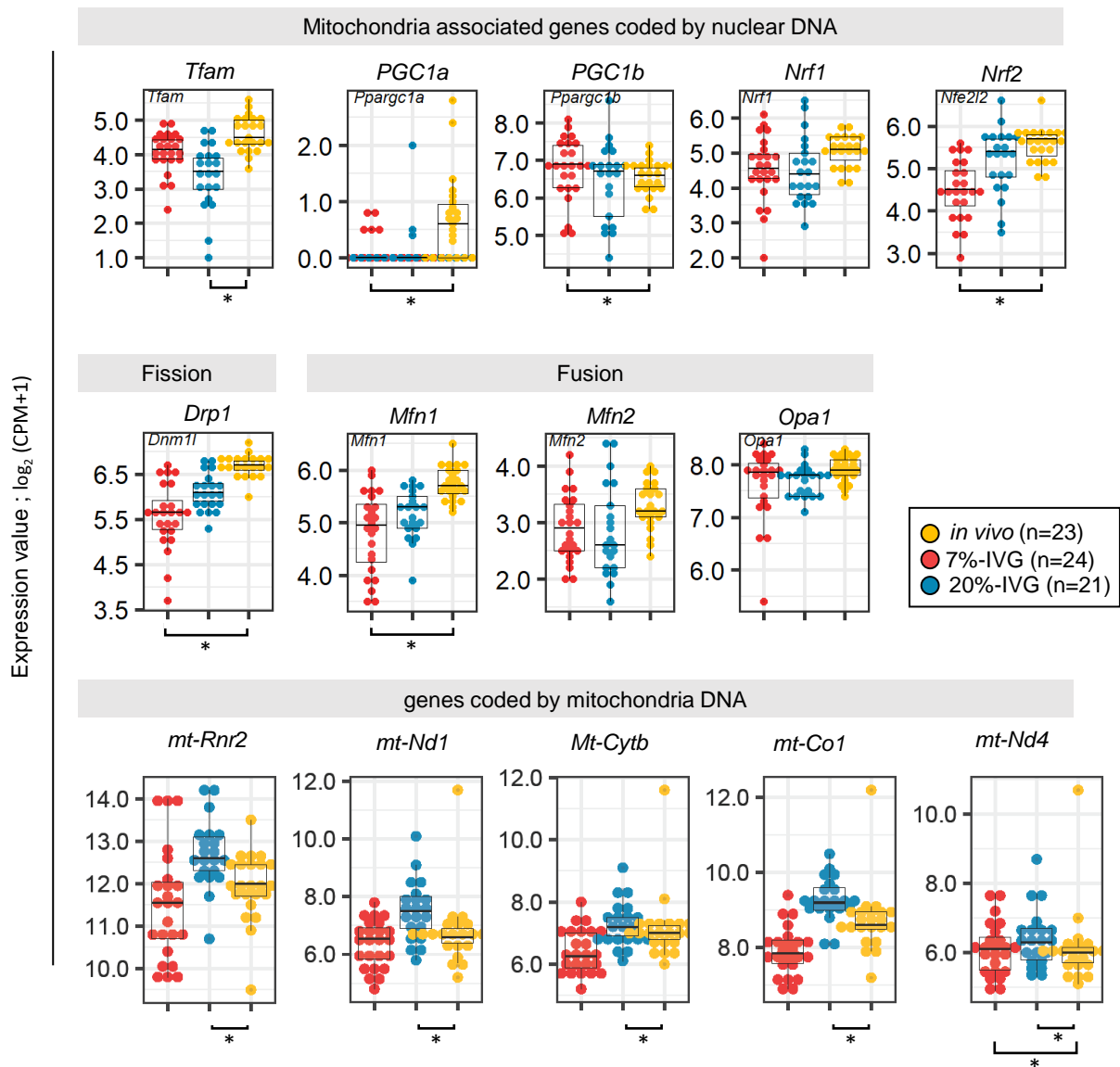


Figure 3-10. ミトコンドリア制御関連遺伝子の発現

20%群、7%群および*in vivo*群卵母細胞におけるミトコンドリア制御遺伝子の発現を示した。*はDESeq 2による発現変動解析により検出された有意な発現変動を示す ($\text{padj} < 0.05$)。

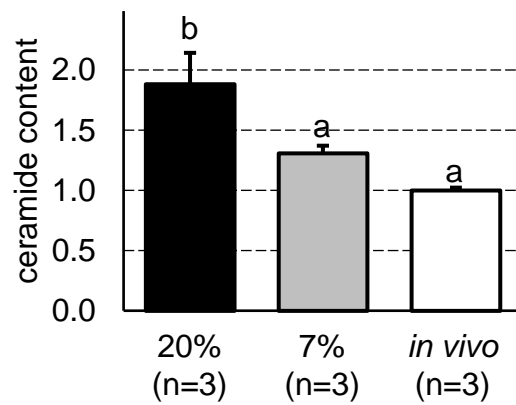


Figure 3-11. 20%、7%および*in vivo*群卵母細胞におけるセラミドの定量解析

LC-MS解析による20%群、7%群および*in vivo*群卵母細胞におけるセラミド蓄積量を示した（平均値+S.D.）（n=3）。Tukey-kramer法を用いた有意差検定を実施した。異なるアルファベットは有意な差を示す（ $p < 0.05$ ）。DOI: 10.1530/REP-21-0209

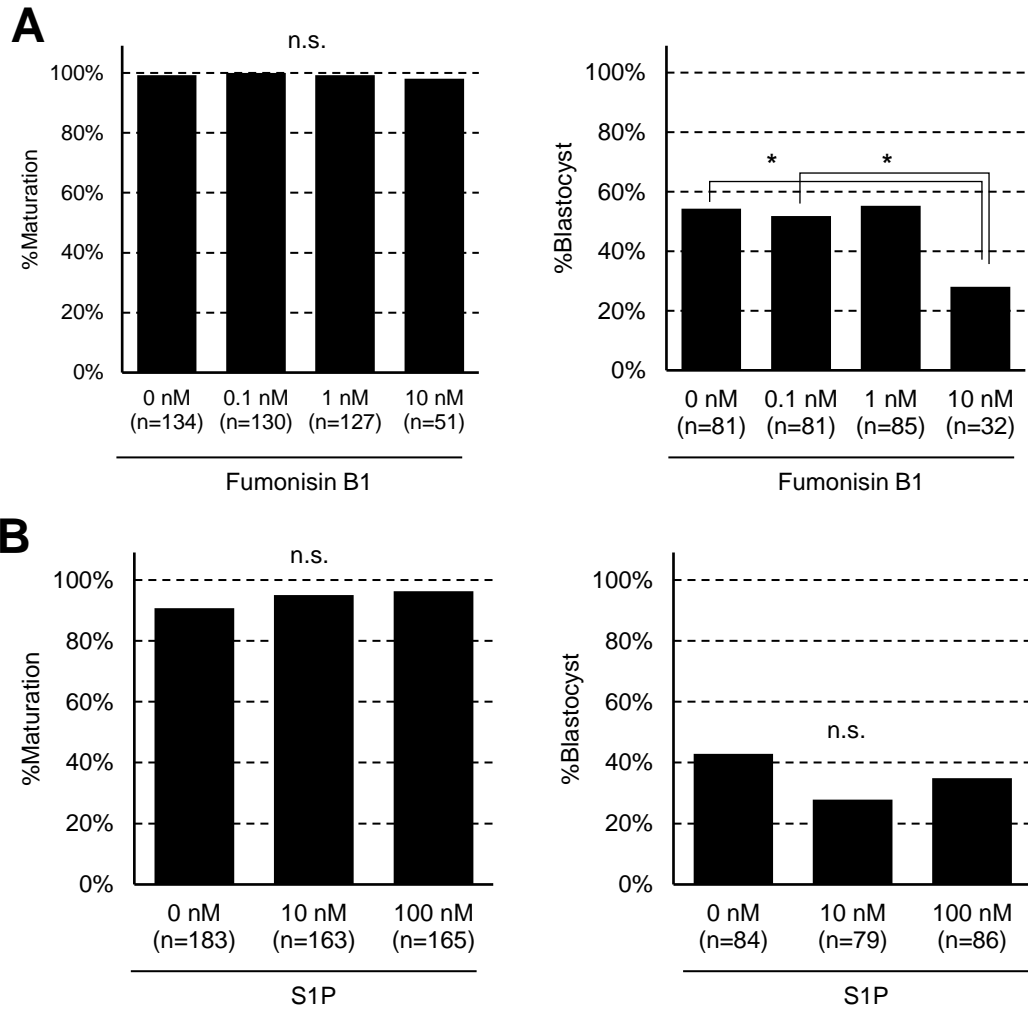


Figure 3-12. フモニシンB1およびスフィンゴシンーリン酸添加IVG

セラミド合成阻害剤フモニシンB1およびスフィンゴシンーリン酸をIVG培地に添加し、20%酸素条件でIVGを実施した。成熟率（MII期卵子/供試COC）および発生率（胚盤胞期胚/供試受精卵）はTukeyのWSD法を用いて有意差検定を実施し、異なるアルファベットは有意な差を示す ($p < 0.05$)。

第四章 正常な卵母細胞の遺伝子発現プロファイルを導くマスター遺伝子の推定

第一節 緒言

非成長期卵母細胞が GV 期卵母細胞へと成長する卵母細胞成長過程は多数の特異的転写因子の発現・機能により制御される。卵母細胞成長過程への移行は *Pten* や *Akt*、*Foxo3* によって厳密にシグナル制御され、PTEN 存在下では AKT 活性化が抑制され、不活性型 FOXO3 が卵母細胞核に局在する。その一方で、成長期移行時には PTEN 消失により AKT 活性化および FOXO3 の核外移行が生じる (John *et al.* 2008, Shimamoto *et al.* 2019)。その後の初期成長過程においては FIGLA、NOBOX、SOHLH1、SOHLH2、STAT3、LHX8 および POU5F1 などの多彩かつ時期特異的な転写因子が発現、機能することで卵母細胞成長を支持する転写ネットワークが形成される (Richards & Pangas 2010)。

卵母細胞成長過程におけるこれらの転写ネットワークは、透明帯構成タンパク質をコードする *Zp1*、*Zp2* および *Zp3* や subcortical maternal complex 構成タンパク質をコードする *Nlrp2*、*Padi6* および *Tle6* などに代表される卵母細胞の構造タンパク質をコードする遺伝子や卵母細胞成熟、受精および発生に寄与するような母性遺伝子 *Mos*、*Cpeb1* および *Yap* など多数の遺伝子を時期特異的に制御すると考えられている (Gupta *et al.* 2012, Monk *et al.* 2017, Sha *et al.* 2018, Winata & Korzh 2018, Cao *et al.* 2019)。

他方で、成長期卵母細胞では KIT が発現し、顆粒膜細胞より分泌された KIT リガンドを受容することで KIT 下流の *Gdf9* および *Bmp15* が発現上昇する。その後、卵母細胞外へ分泌された GDF9 および BMP15 が、顆粒膜細胞に作用し、細胞増殖および *Kitl* 遺伝子発現に寄与する正のフィードバック制御が知られている (Thomas & Vanderhyden 2006)。このフィードバック制御に代表されるように卵母細胞と卵胞細胞間のシグナル伝達による協調的な卵母細胞および卵胞成長が明らかとなっている。

このような卵母細胞成長への移行、初期成長過程における転写ネットワーク形成および支持細胞との協調的遺伝子発現制御機構が知られる一方で、卵母細胞成長過程における発生能を支持する遺伝子発現制御機構の全容は、不明な点が多く残されており、更なる解析が期待される。そこで IVG 卵母細胞の遺伝子発現解析データを用いて *in vivo* 卵母細胞に見られる正常な卵母細胞の遺伝子発現プロファイルを特徴付ける遺伝子の推定を実施した。

第三節 結果

1. IVG 卵母細胞において共通して発現異常を示す遺伝子

7%酸素条件 IVG 卵母細胞に由来する卵子の発生能は 20%酸素条件と比較し、顕著に改善した ($p < 0.05$)。しかしながら *in vivo* 卵子と同水準までの改善には至っておらず、また依然として多くのミトコンドリア異常も認められた。そこで遺伝子発現プロファイル解析結果より得られた IVG 卵母細胞共通の発現異常遺伝子を解析することで、*in vivo* 群に対する IVG 卵母細胞の不完全な遺伝子発現プロファイルを説明する因子の同定を試みた。

in vivo 群に対する 20%群および 7%群の発現変動遺伝子解析の結果、培養酸素条件によらず IVG 卵母細胞において異常発現を示す 1,831 遺伝子が抽出された。20%群、7%群および *in vivo* 群における遺伝子発現量をもとに k-means クラスタリングによって 4 群に分別し、酸素濃度によらず IVG 卵母細胞で共通して共通して発現低下を示す 489 遺伝子 (クラスタ 1) および発現上昇を示す 714 遺伝子 (クラスタ 3) を同定した (Figure4-1A)。これらの遺伝子のエンリッチメント解析の結果、遺伝子発現制御関連因子を示す「regulation of transcription, DNA-templated」の顕著な濃縮が見られた ($q < 0.05$) (Figure4-1B)。そこで共通発現上昇遺伝子 (クラスタ 3)、共通発現低下遺伝子 (クラスタ 1) に含まれる遺伝子発現制御関連遺伝子それぞれ 56 遺伝子および 128 遺伝子に着目したところ、様々な機能を有する遺伝子が含まれていた (Figure4-1C)。共通発現低下遺伝子には卵母細胞成長への移行制御などの初期卵母細胞成長過程における寄与が知られる *Nobox* や *Stat3* が含まれ、これらの新しい機能的側面が期待された。

一方で共通発現上昇遺伝子には、予想に反して低酸素応答転写因子である *Hif1a* および *Arnt* (*Hif1b*) が見られた。IVG 卵母細胞における遺伝子発現プロファイルの不完全性は、正常な卵母細胞の発生・分化を制御する転写関連遺伝子の発現低下に起因すると考え、発現低下を示した転写関連遺伝子 56 遺伝子を正常な卵母細胞を特徴付ける遺伝子として着目した。

2. *in vivo* 卵母細胞様の遺伝子発現プロファイルを有する IVG 卵母細胞の解析

20%群、7%群および *in vivo* 群卵母細胞の階層的クラスタリング解析の結果、各群の卵母細胞はそれぞれクラスタ形成し、また 7%群は同じ IVG 卵母細胞である 20%群よりも *in vivo* 卵母細胞に近い遺伝子発現プロファイルを有していることが示された (Figure3-5)。また興味深いことに 7%群 3 検体、20%群 1 検体が *in vivo* 群クラスタに属していた。これらの *in vivo* 群に近い IVG 卵母細胞の遺伝子発現プロファイルを解析することは、*in vivo* 群に見られる正常な卵母細胞遺伝子発現プロファイルを IVG で再現する為のマスター遺伝子の同定に繋がると考えた。そこで *in vivo* 群クラスタに属した 7%群を *in vivo* like (IVL) 群、クラスタ化した典型的 7%群を canonical 群とし、*in vivo* 群との発現変動遺伝子解析に供試した。IVL 群と *in vivo* 群間において 6,343 遺伝子、IVL 群と canonical 群間において 4,121 遺伝子が有意に発現変動を示し、2,498 遺伝子が重複を示した ($p_{adj} < 0.05$) (Figure4-2)。canonical 群において特異的に発現変動を示した 1,623 遺伝子は、*in vivo* 群と比較して canonical 群で発現異常を示す一方で、IVL 群と *in vivo* 群間では発現変動が見られないことから、IVL 群の *in vivo* 群との同

質性かつ *canonical* 群との異質性を説明しうる遺伝子の内包が期待された。これら 1,623 遺伝子のエンリッチメント解析の結果、遺伝子発現制御関連因子を示す「transcription, DNA-templated」および「regulation of transcription, DNA-templated」の顕著な濃縮が見られた ($q < 0.05$) (Figure4-3)。これは IVG 卵母細胞に共通した発現異常遺伝子のエンリッチメント解析結果と符合した。これまでに同定した IVG 卵母細胞で共通して発現低下を示す転写関連遺伝子 56 遺伝子とこれらの *canonical* 群における発現異常遺伝子に重複する遺伝子を解析したところ、*Nobox*、*2410141K09Rik*、*Gm14139*、*Nr2e1*、*Zfp35*、*Trp53bp1*、*Tch25*、*Rtf1*、*Sp110* および *Cic* の 10 遺伝子を正常な卵母細胞遺伝子発現プロファイルを特徴付ける遺伝子として抽出した (Figure4-4)。

3. *Nobox* が卵母細胞遺伝子発現プロファイルに与える影響の解析

卵母細胞遺伝子発現プロファイルをたらしめる遺伝子として同定された 10 遺伝子の組織特異的遺伝子発現動態を RefEx (<https://refex.dbcls.jp/index.php?lang=ja>) の発現量データベース EST に基づき解析した結果、*Nobox* の卵巣における顕著な発現が認められた (Table4-1)。*Nobox* は新生仔卵巣特異的発現を示すホメオボックス遺伝子の一つであり、非成長期および成長期初期卵母細胞で発現し、卵母細胞成長期への移行を運命づける転写因子である (Suzumori *et al.* 2002)。卵母細胞成長期への移行に必須であることが知られ、転写因子として *Gdf9* などの様々な卵母細胞特異的遺伝子の発現制

御を担うことが示唆されている (Rajkovic *et al.* 2004, Choi & Rajkovic 2006, Choi *et al.* 2007, Qin *et al.* 2007, Qin *et al.* 2009, Bayne *et al.* 2015)。

そこで本解析では *Nobox* 遺伝子との発現動態の相関性解析および NOBOX 結合モチーフ解析を用いた NOBOX 下流制御遺伝子群のスクリーニングを行った。NOBOX による発現制御下にある遺伝子は *Nobox* の発現動態と類似した傾向を示すと考えられる。そこで過去に NOBOX のプロモーター領域への結合および遺伝子発現制御が示された *Gdf9* に着目したところ、20%群、7%群および *in vivo* 群卵母細胞における *Nobox* および *Gdf9* の遺伝子発現は強い正の相関を示した ($r=0.82$) (Figure4-5A)。そこで同様の手法を用いて *in vivo* 群において発現する遺伝子群のうち平均 $\log_2(\text{CPM}+1) \geq 6$ の遺伝子を抽出し、これらの 20%群、7%群および *in vivo* 群卵母細胞における発現と *Nobox* の発現の相関係数をそれぞれ算出し、強い相関 ($r \geq 0.7$) を示した 87 遺伝子を抽出した (Table4-2) (Figure4-5B)。これらの遺伝子群には卵母細胞の成長、受精およびエピジェネティック修飾の確立にそれぞれ不可欠な卵母細胞特異的遺伝子 *Kit*、*Zp2* および *Nlrp5* などが含まれた。一方で、*Nobox* は結合モチーフ (コンセンサス配列: TAATTG) を目印としたプロモーター領域への結合が知られている。そこでプロモーター領域における NOBOX 結合モチーフ保有数の検出を実施した。結合モチーフを有することが報告されている *Gdf9* では 3 箇所、*Nobox* 発現との相関係数が大きい上位 3 遺伝子 *Hspa8* ($r=0.84$)、*Fbxw21* ($r=0.84$) および *Fbxw14* ($r=0.83$) ではそれぞれ 2、8 および 3 箇所の結合モチーフを有していた (r =相関係数)。しかしながら結合モチーフの数が多い上位 3 遺伝子では *Zfp280d* (41

箇所)、*4932438A13Rik* (41 箇所) および *Wnk1* (38 箇所) では *Nobox* 発現との相関係数がそれぞれ 0.40、-0.42 および 0.42 を示し、結合モチーフ数と *Nobox* 発現に係性は認められたなかった (結合モチーフ数) (Table4-2)。本解析により同定された NOBOX 結合モチーフはマウス全ゲノム中に 1,444,179 領域存在した。これは同じく卵母細胞成長期移行に関与する FOXO3 や LHX8 のマウスゲノム結合領域数 126,416 箇所および 29,363 箇所と比較すると 10 - 50 倍程多く、特異性に乏しかった。この結果は NOBOX 結合モチーフの存在が、*Nobox* による遺伝子発現制御にとって十分条件ではないことを示唆した。

以上の解析から正常な卵母細胞遺伝子発現プロファイルを特徴付けるマスター遺伝子の一つとしてスクリーニングされた *Nobox* は健全な卵母細胞遺伝子発現プロファイルに寄与しうることが示唆され、*Nobox* の卵母細胞成長過程における新規機能的側面が期待された。

第四節 考察

in vivo 卵母細胞と比較し、培養酸素条件によらず IVG 卵母細胞において共通して発現低下を示した転写関連遺伝子 56 遺伝子を正常な卵母細胞を特徴付ける候補遺伝子として着目した。これらの遺伝子には卵母細胞成長期移行や卵母細胞成熟、母性因子として胚発生に寄与することが知られる *Nobox* および *Stat3* を含んでおり、これらの新しい機能的側面が期待された (Rajkovic *et al.* 2004, Choi & Rajkovic 2006, Choi *et al.* 2007, Qin *et al.* 2007, Qin *et al.* 2009, Bayne *et al.* 2015, Haraguchi *et al.* 2020, Ou-Yang *et al.* 2021)。また体細胞や胚性幹細胞において *Stat3* はミトコンドリア機能および増殖を制御することが知られ (Carbognin *et al.* 2016)、IVG 卵母細胞におけるミトコンドリア異常との関連性が示唆された。

卵母細胞の階層的クラスタリング解析により 7%-IVG 卵母細胞集団中において *in vivo* 群により近い遺伝子発現プロファイルを有した亜集団を見出し、これらの亜集団では IVG 卵母細胞で発現低下を示した転写関連因子 56 遺伝子のうち 10 遺伝子 (*Nobox*、*2410141K09Rik*、*Gm14139*、*Nr2e1*、*Zfp35*、*Trp53bp1*、*Tch25*、*Rtfl*、*Sp110* および *Cic*) の発現改善が見られた。この 10 遺伝子の発現改善によって亜集団の *in vivo* 様遺伝子発現プロファイルが獲得、維持されたと考えられ、これらが *in vivo* 卵母細胞遺伝子発現プロファイルをたらしめている可能性が示唆された。近年、報告された卵母細胞・卵子形成に関与する大規模転写因子スクリーニングで候補遺伝子として注目された *Nobox* および *Sp110* が含まれた (Hamazaki *et al.* 2021)。*Sp110* の卵母細胞形成に関する知見は乏し

い。その一方で、*Nobox*は卵母細胞成長期への移行に必須の転写因子として知られる (Suzumori *et al.* 2002)。これまでに *NOBOX*は *Gdf9*などの卵母細胞特異的発現遺伝子の遺伝子発現制御領域に結合し、制御することにより成長期に移行する際の卵母細胞遺伝子発現ネットワークに寄与することが知られる

(Rajkovic *et al.* 2004, Choi & Rajkovic 2006, Choi *et al.* 2007, Qin *et al.* 2007, Qin *et al.* 2009, Bayne *et al.* 2015)。またウシ胚において *Nobox*の胚性ゲノム活性化への寄与が報告された (Tripurani *et al.* 2011a, Tripurani *et al.* 2011b)。卵母細胞形成および初期胚発生において重要な役割を担う *Nobox*であるが、その卵母細胞成長過程における分子生物学的動態のは未だ不明である。

各群卵母細胞における遺伝子発現傾向から *in vivo* 卵母細胞の遺伝子発現プロファイルをたらしめることが示唆された *Nobox*の下流遺伝子を、遺伝子発現動態の相関性から抽出した。その結果、87 遺伝子が *Nobox*の下流候補遺伝子として抽出され、これらには卵母細胞の機能および成長に必須な透明帯タンパク質をコードする *Zp2* および卵胞細胞からのシグナルを受容する *Kit*が含まれた。またそれ以外にも健全な受精および初期発生に必須な卵母細胞特異的構造体 *subcortical maternal complex* 構成タンパク質の一部をコードする *Padi6*、*Nlrp2* および *Nlrp5*が含まれた (Paillisson *et al.* 2005, Monk *et al.* 2017)。以上より *Nobox*が卵母細胞成長後期において卵母細胞成長や受精、初期発生に重要な遺伝子の遺伝子発現制御を行うことが示唆され、*Nobox*の卵母細胞成長後期における卵母細胞遺伝子発現ネットワークへの貢献および発生能獲得への貢献が期待された。また、これまでに *Nobox*同様に卵母細胞成長期への移行に寄与することが

知られる *Figla* および *Lhx8* の欠損により成長期卵母細胞における *Nobox* や *Zp2* および *Nlrp5* の発現低下が報告されており、今回の解析結果に矛盾しない (Wang *et al.* 2020)。

他方で各遺伝子のプロモーター配列における NOBOX 結合モチーフの個数と *Nobox* 発現とそれぞれの遺伝子発現の相関性の間に、関連性は見られなかった。これは NOBOX 結合モチーフの有無や個数が *Nobox* による遺伝子発現制御にとって十分条件でないことを示唆すると同時に、結合モチーフを持たないにも関わらず、*Nobox* の発現と遺伝子発現動態に強い相関性を示した遺伝子のプロモーター領域において NOBOX 以外のゲノム結合タンパク質との相互作用を介して、間接的に *Nobox* が発現制御を行っている可能性が示唆された。

Table 4-1. IVL 卵母細胞で発現が回復した転写関連遺伝子の各組織における遺伝子発現

組織名	<i>Nobox</i>	<i>Zfp35</i>	<i>Trp53bp1</i>	<i>Tcf25</i>	<i>2410141K09Rik</i>	<i>Rtf1</i>	<i>Gm14139</i>	<i>Nr2e1</i>	<i>Cic</i>	<i>Sp110</i>
脳		42.1	218.5	600		75.4		56.6	194.1	
血		16.3	60.6	335.5		37.3			51.3	2.3
結	4.7	28.5	52.2	279.8		80.6		4.7	61.7	
殖	37.1	37.1	148.5	120		42.8		8.6	62.8	28.6
筋			73.2	146.5		24.4			48.8	
消		26.2	35	113.7		8.7			35	
肝		27.2		153.9					36.2	
肺			40.2	241		30.1			80.3	
腎		64.7	57.5	143.7		7.2				
泌		38.5	76.9	392.3		63.5			76.9	1.9
大脳		53.8	258.8	784.9		79.9		43.4	276.1	
小脳			128.9	184.2		36.8			55.3	
脳幹			190.7	158.9					63.6	
脳梁										
松果体				1031.2						
末梢神経			76.4	172		19.1				
脊柱			94.6	283.7						
網膜		64.3	257.2	128.6		96.4		289.3	64.3	
目		38	159.6	387.5		121.6		129.2	68.4	
動脈			84.4	84.4						
静脈										
リンパ節			43.2	86.4		32.4			97.2	
末梢血		28.8	14.4	273.2		28.8			14.4	
脾臓			105.3	144.8		65.8			26.3	
胸腺		49.4	118.6	484.1		59.3			49.4	9.9
骨髄				718					64.1	
脂肪										
骨		12.5	50.1	263		175.3			62.6	
皮膚	7.9	39.6	55.4	300.9		23.8		7.9	63.3	
子宮	130.9		43.6	349					87.2	
胎盤		13.8	138.1	179.5		55.2			124.3	
前立腺		61.8	61.8	61.8						30.9
卵巣	114.9	11.5	218.3	57.5		57.5		34.5	68.9	103.4
精巣		66.5	147.8	103.5		44.3			36.9	

組織名	<i>Nobox</i>	<i>Zfp35</i>	<i>Trp53bp1</i>	<i>Tcf25</i>	<i>2410141K09Rik</i>	<i>Rtfl</i>	<i>Gm14139</i>	<i>Nr2e1</i>	<i>Cic</i>	<i>Sp110</i>
心臟			111.6	130.2		37.2			55.8	
骨格筋				177.5					35.5	
食道										
胃				32.7		32.7				
腸				184.9						
結腸		52.9	70.5	123.4					70.5	
肝臟		27.2		153.9					36.2	
肺			40.2	241		30.1			80.3	
膀胱			330.9	198.5						
腎臟		72.5	24.2	137		8.1				
下垂體		77.5	25.8	800.9		155			155	
甲狀腺				224.9					112.5	
副腎				1273.3		424.4				
脾臟		37.5	178.3	328.4		18.8			18.8	
乳腺		32.6	58.8	313.4		58.8			71.8	3.3
唾液腺			54	324					162	

Table 4-2. *Nobox* 発現と強い相関を示す遺伝子群

gene information		<i>Nobox</i> との相関	<i>in vivo</i>	No. of motif
EnsiD	遺伝子名	correlation score (r)	average	consensus seq.(TAATGG) in TSS±2.5kbp
ENSMUSG00000029736	<i>Nobox</i>	1.00	6.42	4
ENSMUSG00000015656	<i>Hspa8</i>	0.84	6.99	2
ENSMUSG00000047237	<i>Fbxw21</i>	0.84	8.20	8
ENSMUSG00000105589	<i>Fbxw14</i>	0.83	7.70	3
ENSMUSG00000074895	<i>Eif4e1b</i>	0.83	6.94	3
ENSMUSG00000001166	<i>Oas1c</i>	0.82	7.89	0
ENSMUSG00000025393	<i>Atp5b</i>	0.82	6.66	6
ENSMUSG00000018238	<i>Gdf9</i>	0.82	10.58	3
ENSMUSG00000033952	<i>Aspm</i>	0.82	10.72	19
ENSMUSG00000057193	<i>Slc44a2</i>	0.82	6.19	7
ENSMUSG00000030911	<i>Zp2</i>	0.81	9.70	1
ENSMUSG00000024270	<i>Slc39a6</i>	0.81	7.62	4
ENSMUSG00000002900	<i>Lamb1</i>	0.80	8.44	5
ENSMUSG00000030246	<i>Ldhb</i>	0.80	11.30	7
ENSMUSG00000022312	<i>Eif3h</i>	0.80	6.82	6
ENSMUSG00000006273	<i>Atp6v1b2</i>	0.80	7.35	8
ENSMUSG00000020448	<i>Rnf185</i>	0.80	7.61	1
ENSMUSG00000031400	<i>G6pdx</i>	0.79	8.11	3
ENSMUSG00000074060	<i>Fbxw15</i>	0.79	10.40	1
ENSMUSG00000016626	<i>Nlrp14</i>	0.79	10.35	10
ENSMUSG00000026687	<i>Aldh9a1</i>	0.79	6.90	8
ENSMUSG00000032387	<i>Rbpms2</i>	0.78	8.60	2
ENSMUSG00000038925	<i>E330034G19Rik</i>	0.78	8.94	1
ENSMUSG00000028591	<i>Pramef12</i>	0.78	8.07	2
ENSMUSG00000017716	<i>Birc5</i>	0.78	6.91	1
ENSMUSG00000087193	<i>Gm14820</i>	0.78	6.60	4
ENSMUSG00000041992	<i>Rapgef5</i>	0.78	7.85	22
ENSMUSG00000028138	<i>Adh5</i>	0.77	6.50	0
ENSMUSG00000035329	<i>Fbxo33</i>	0.77	7.40	5
ENSMUSG00000053490	<i>Trim60</i>	0.77	7.65	2
ENSMUSG00000025817	<i>Nudt5</i>	0.77	7.75	2

gene information		<i>Nobox</i> との相関	<i>in vivo</i>	No. of motif
EnsiD	遺伝子名	correlation score (r)	average	consensus seq.(TAATGG) in TSS±2.5kbp
ENSMUSG00000054087	<i>Fbxw14</i>	0.76	8.34	1
ENSMUSG00000040935	<i>Padi6</i>	0.76	9.80	4
ENSMUSG00000021509	<i>Slc25a48</i>	0.76	6.06	0
ENSMUSG00000047911	<i>Npm2</i>	0.76	7.25	4
ENSMUSG00000071379	<i>Hpcal1</i>	0.76	6.37	2
ENSMUSG00000010914	<i>Pdhx</i>	0.75	7.69	0
ENSMUSG00000036112	<i>Metap2</i>	0.75	7.23	7
ENSMUSG00000019505	<i>Ubb</i>	0.75	6.48	3
ENSMUSG00000027635	<i>Dsn1</i>	0.75	7.92	5
ENSMUSG00000030878	<i>Cdr2</i>	0.75	7.76	4
ENSMUSG00000057113	<i>Npm1</i>	0.75	6.46	12
ENSMUSG00000022024	<i>Sugt1</i>	0.75	8.08	4
ENSMUSG00000005483	<i>Dnajb1</i>	0.75	7.73	1
ENSMUSG00000020608	<i>Smc6</i>	0.75	7.96	14
ENSMUSG00000058407	<i>Txndc9</i>	0.75	7.27	3
ENSMUSG00000036309	<i>Skp1a</i>	0.74	11.10	5
ENSMUSG00000072258	<i>Taf1a</i>	0.74	6.67	2
ENSMUSG00000031767	<i>Nudt7</i>	0.74	7.06	3
ENSMUSG00000026239	<i>Pde6d</i>	0.74	6.61	2
ENSMUSG00000074061	<i>Fbxw19</i>	0.74	10.04	5
ENSMUSG00000037742	<i>Eef1a1</i>	0.74	7.77	4
ENSMUSG00000026189	<i>Pecr</i>	0.74	7.82	0
ENSMUSG00000041235	<i>Chd7</i>	0.74	6.47	9
ENSMUSG00000020415	<i>Pttg1</i>	0.74	7.92	2
ENSMUSG00000035177	<i>Nlrp2</i>	0.74	7.98	9
ENSMUSG00000034088	<i>Hdlbp</i>	0.74	6.05	11
ENSMUSG00000025857	<i>Dnaaf5</i>	0.74	7.93	2
ENSMUSG00000005312	<i>Ubqln1</i>	0.74	8.58	8
ENSMUSG00000041653	<i>Pnpla3</i>	0.73	8.16	2
ENSMUSG00000004535	<i>Tax1bp1</i>	0.73	7.53	13
ENSMUSG00000079184	<i>Mphosph8</i>	0.73	7.27	7
ENSMUSG00000024043	<i>Arhgap28</i>	0.73	6.74	13
ENSMUSG00000029014	<i>Dnajc2</i>	0.73	6.02	4
ENSMUSG00000034210	<i>Efcab14</i>	0.73	6.84	6

gene information		<i>Nobox</i> との相関	<i>in vivo</i>	No. of motif
Ensid	遺伝子名	correlation score (r)	average	consensus seq.(TAATGG) in TSS±2.5kbp
ENSMUSG00000037824	<i>Tspan14</i>	0.73	7.15	2
ENSMUSG00000021270	<i>Hsp90aa1</i>	0.72	9.49	5
ENSMUSG00000027439	<i>Gzf1</i>	0.72	6.02	3
ENSMUSG00000024750	<i>Zfand5</i>	0.72	7.43	3
ENSMUSG00000025544	<i>Tm9sf2</i>	0.72	8.22	0
ENSMUSG00000038005	<i>2700029M09Rik</i>	0.72	8.82	4
ENSMUSG00000042426	<i>Dhx29</i>	0.72	6.01	2
ENSMUSG00000070686	<i>C87414</i>	0.72	7.24	2
ENSMUSG00000012350	<i>Ehf</i>	0.71	7.84	12
ENSMUSG00000025967	<i>Eef1b2</i>	0.71	6.13	3
ENSMUSG00000005672	<i>Kit</i>	0.71	8.17	15
ENSMUSG00000010097	<i>Nxf1</i>	0.71	8.63	7
ENSMUSG00000015721	<i>Nlrp5</i>	0.71	8.30	7
ENSMUSG00000030127	<i>Cops7a</i>	0.71	6.23	1
ENSMUSG00000034187	<i>Nsf</i>	0.71	8.09	10
ENSMUSG00000038330	<i>C87499</i>	0.71	9.64	6
ENSMUSG00000005621	<i>Zfp592</i>	0.70	6.84	5
ENSMUSG00000032320	<i>Rcn2</i>	0.70	7.33	2
ENSMUSG00000047799	<i>Oog4</i>	0.70	9.95	4
ENSMUSG00000040997	<i>Abhd4</i>	0.70	6.04	5
ENSMUSG00000026596	<i>Abl2</i>	0.70	8.72	4
ENSMUSG00000050812	<i>A1314180</i>	0.70	8.05	17
ENSMUSG00000045693	<i>Nlrp4e</i>	0.70	7.20	2

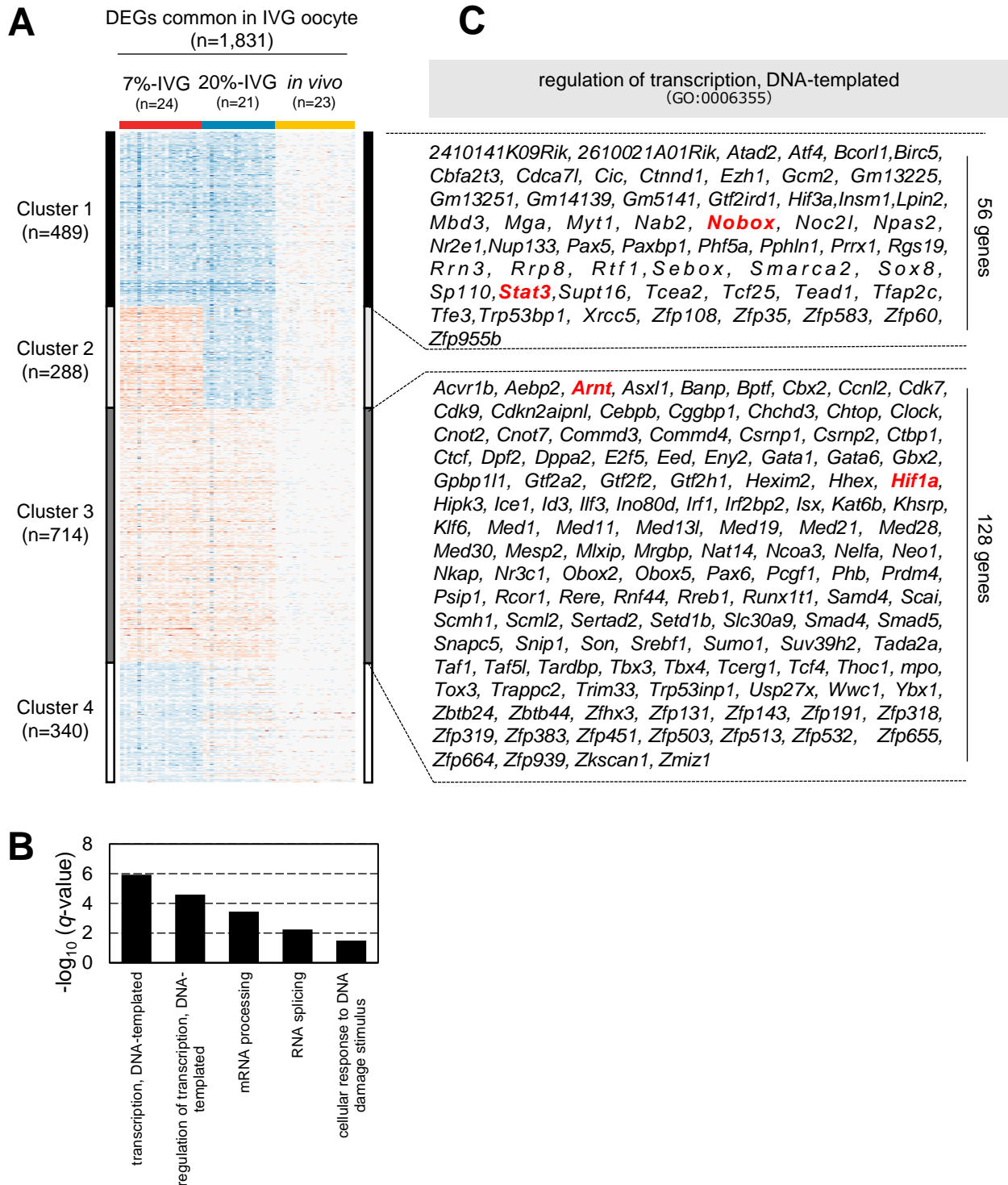


Figure 4-1. 7%群および20%群に共通して異常発現を示す遺伝子

(A) IVG卵母細胞に共通して発現異常を示した1,831遺伝子をk-means解析により4クラスターに分別した。(B) IVG卵母細胞で共通発現上昇を示したクラスター1および共通発現低下を示したクラスター3に属する遺伝子には転写関連のtermが濃縮された。(C) 濃縮が見られた転写関連遺伝子群 (GO : 0006355) に注目した。DOI: 10.1530/REP-21-0209

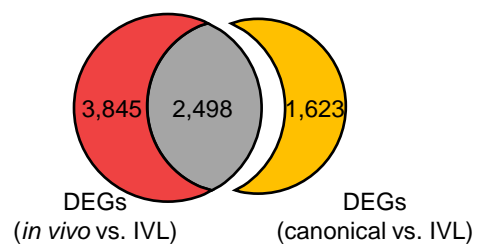


Figure 4-2. IVL群に対するcanonical群および*in vivo*群の発現変動遺伝子の重複

IVL群と*in vivo*群間における発現変動遺伝子6,343遺伝子、IVL群とcanonical群間における発現変動遺伝子4,121遺伝子のうち1,623遺伝子はcanonical群において特異的に発現変動が見られた。DOI: 10.1530/REP-21-0209

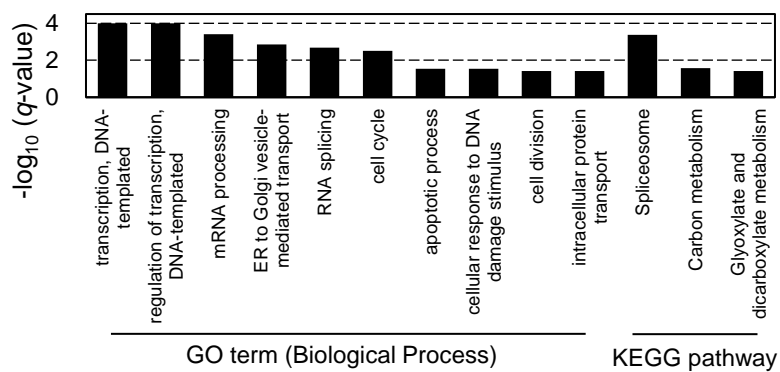


Figure 4-3. IVL群の *in vivo*群との同質性かつcanonical群との異質性を説明する遺伝子群のエンリッチメント解析

canonical群特異的な発現変動を示した1,623遺伝子において転写関連遺伝子に関するtermの濃縮が見られた ($q < 0.05$)。DOI: 10.1530/REP-21-0209

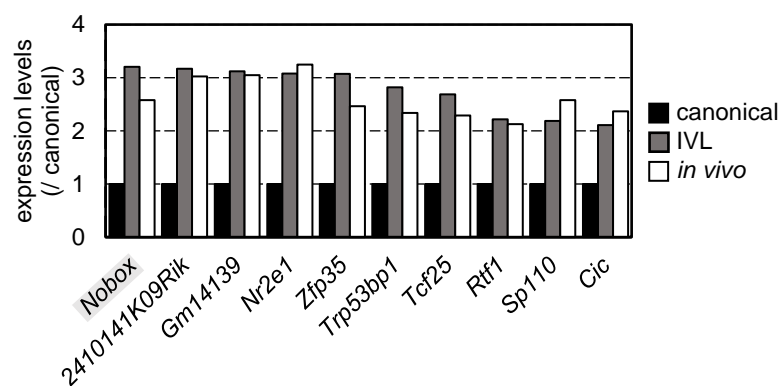


Figure 4-4. IVL卵母細胞において発現が回復した転写関連遺伝子

IVG群特異的に発現低下を示した転写に関連する56遺伝子のうちIVL群で発現回復した10遺伝子。DOI: 10.1530/REP-21-0209

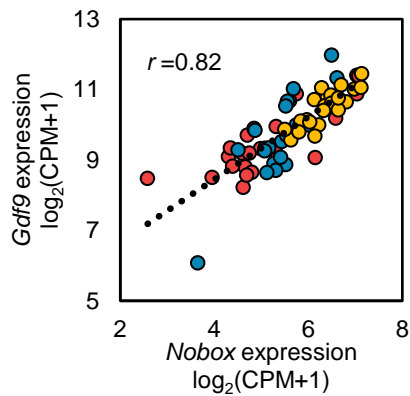
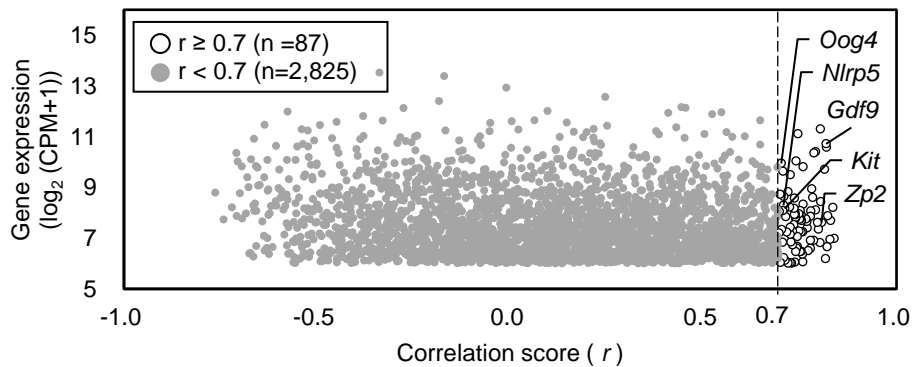
A**B**

Figure 4-5. マスター遺伝子候補*Nobox*の下流遺伝子のスクリーニング

(A) *Gdf9*と*Nobox*の7%、20%および*in vivo*群における遺伝子発現量を示した。これらの検体間で*Nobox*と*Gdf9*の発現動態は強い相関を示した ($r=0.82$)。

(B) 各遺伝子の発現量 ($\log_2(\text{CPM}+1) \geq 6$) と*Nobox*発現量との関連性を示した。強い相関 ($r \geq 0.7$) を示す87遺伝子 (白) には多くの卵母細胞特異的遺伝子が含まれていた。DOI: 10.1530/REP-21-0209

第五章 総合考察

これまでに培養卵母細胞の成熟能および発生能向上を目指し、様々な IVG 培養法の改善が報告された。その中でも培養酸素条件の低酸素化および培地へのポリビニルピロリドン添加により IVG 卵母細胞は顕著な発生能改善を示した (Eppig & Wigglesworth 1995, Hirao *et al.* 2004, Hirao *et al.* 2012, Mizumachi *et al.* 2018)。本研究では培養酸素条件の低酸素化に着目し、至適培養酸素条件が 7% であることを明らかにした。しかしながら 7%-IVG 卵母細胞における成熟能や発生能、ミトコンドリア動態、遺伝子発現プロファイルは高いコンピテンシーを有する *in vivo* 卵母細胞と比べ、未だ不完全なものであった。そこで本章では更なる IVG 卵母細胞の発生能改善に向け、考察を行う。

5%、7%、10%および 20%-IVG 卵母細胞の発生能解析および遺伝子発現解析の結果から、正常な 5%-IVG 卵母細胞は至適培養酸素条件である 7%-IVG 卵母細胞よりも *in vivo* 卵母細胞に近い遺伝子発現プロファイルを有する一方で、5%-IVG では成熟能の低い、異常な発現プロファイルを有する成長不良卵母細胞が多く作出されることが明らかとなった。*in vivo* 卵母細胞との遺伝子発現プロファイルの類似性から健全な 5%-IVG 卵母細胞は 7%-IVG 卵母細胞より潜在的に高い発生能を有していると考えられ、5%-IVG 卵母細胞の不均一性の解消が期待される。当研究室における先行研究により 5%-IVG は 20%-IVG と比較して培養卵胞成長速度の鈍化が示されていることから、低酸素環境の卵母細胞における発生能獲得への寄与と、卵胞細胞増殖に与える悪影響がトレードオフの

状態にあると考えられ、これらが 5%-IVG 卵母細胞の不均一性の一因となることが示唆された。また高酸素環境のみならず、過度な低酸素状態においても電子伝達系への酸素供給量不足によってミトコンドリア異常が生じることが知られ、5%-IVG 卵母細胞ではミトコンドリア機能の改善だけでなく、酸素不足による悪影響が同時に生じている可能性が考えられた。

in vivo 卵母細胞と比較して、20%-IVG 卵母細胞で見られたミトコンドリア DNA コピー数および膜電位の有意な低下のうち、7%-IVG 卵母細胞ではミトコンドリア膜電位低下の軽減が見られた。しかしながら、ATP 量および ROS 量は 20%-IVG 卵母細胞と比較して 7%-IVG 群卵母細胞で有意に増加していた。この一因として *in vivo* 卵母細胞と比較して IVG 卵母細胞では卵母細胞成長過程における ATP 要求性の高い生物学的経路が不全となっているため ATP が消費されていないことが考えられた。また 20%-IVG 卵母細胞に比べ、7%-IVG 卵母細胞ではミトコンドリア膜電位が高く、20%-IVG 群よりも活発な ATP 合成を行っているものと考えられる。これは ATP および ROS 量が 20%-IVG 卵母細胞に比べて多いことに符合した。そこで 7%-IVG 卵母細胞における ATP 消費量の向上および酸化ストレスの軽減によって更なる発生能の改善が期待された。また他方で、IVG、特に 20%-IVG における卵母細胞成長過程において、ミトコンドリアによる ATP 合成が過剰となり、ストレスによりミトコンドリア数が減少している可能性も示唆された、20%-IVG 群 GV 期卵母細胞において ROS 量の増加は認められなかったが、成長過程において一過的に ROS 量が増大している可能性は否定できない。これらの考察を検証する意味でも、IVG 卵母細胞の卵母細胞成長過

程におけるミトコンドリア動態を解析することは重要であり、更なる解析が期待される。

発生段階ごとの発生能解析により 20%-IVG 卵母細胞で顕著な胚盤胞期移行障害が認められ、その一方で 7%-IVG 卵母細胞ではこの移行障害の改善が見られた。20%-IVG 卵母細胞由来の胚において胚盤胞形成に関与する栄養外胚葉でのミトコンドリア活性の低下が示唆され、それに符合するように 20%-IVG 卵母細胞および卵子でミトコンドリア膜電位の低下が見られた。また母性ミトコンドリア量が胚盤胞・個体発生能に与える影響の解析を通して、2 細胞期時点におけるミトコンドリア量が胚盤胞期までの発生能および着床能に寄与することが示唆された一方で個体発生能への寄与は認められなかった。これらの結果から、ミトコンドリアの完全性、少なくとも本研究によって解析された範囲内でのミトコンドリアの量的・質的な変化が保証する発生能は胚盤胞形成および着床までであり、個体発生はミトコンドリアとは別の要素が強く寄与しうることが示唆された。ミトコンドリアが胚盤胞形成において将来の胎盤となる栄養外胚葉系列の分化や機能を促進することから、個体発生能を支持する因子は将来の胎仔となる内部細胞塊の特性獲得に寄与することが考えられ、この因子の解明および改善を通して、IVG 卵母細胞の個体発生能の改善、そして個体発生能を支持しうる分子経路の解明が期待される。

in vivo 群に対する 20%群および 7%群の発現変動遺伝子の解析から 20%-IVG 卵母細胞においてスフィンゴ脂質代謝異常が生じ、*in vivo* および 7%-IVG 群と比較したセラミド含有量の有意な増加が認められた。*in vivo* 卵母細胞との間に

有意な差は見られなかったものの、7%-IVG 卵母細胞ではセラミド含有量は *in vivo* 群の 1.3 倍、ミトコンドリア膜電位は 0.7 倍まで変化し、スフィンゴ脂質代謝遺伝子群の発現正常化が生じているにもかかわらず、セラミドによるミトコンドリア膜電位の低下が示唆された。このセラミド合成量増加の一因として IVG 培地に添加するウシ胎仔血清中に含まれる脂質が考えられた。これまでに肥満症母体に由来する卵母細胞・卵子の品質低下とミトコンドリア損傷、卵胞環境中におけるセラミドの前駆物質であるパルミチン酸量の増加の関連性が示唆されており、パルミチン酸添加 IVM による作出卵子でセラミド含有量の増加、ミトコンドリア機能低下および成熟能の低下が報告された (Igosheva et al. 2010, Valckx et al. 2014, Wu et al. 2015、Itami et al. 2018)。ウシ胎仔血清は化学的組成が不明であり、セラミド代謝の基質となるスフィンゴ脂質が含まれる可能性は十分に考えられた。以上より、化学的組成の明らかな培地を用いて適度なスフィンゴ脂質を添加することによって、適切なセラミド含有量を有した IVG 卵母細胞を作出することが可能だと考えられた。

遺伝子発現プロファイルの比較から、IVG 卵母細胞における不完全な遺伝子発現プロファイルでは *Nobox* や *Stat3* を核とする転写ネットワークが損なわれていることが示唆された。これらのような卵母細胞成長期移行において中心的役割を担う転写因子の遺伝子発現に伴って発生能を保障する母性因子は発現上昇することが知られ、これらの転写因子が卵母細胞成長移行後の母性因子の遺伝子発現の維持への寄与が考えられた (Hamazaki et al. 2021)。*in vivo* 様遺伝子発現プロファイルを有した IVG 卵母細胞では *Nobox* の発現が改善したことから

Nobox の卵母細胞遺伝子発現プロファイルへ寄与が示唆され、下流候補遺伝子の探索の結果、透明帯タンパク質をコードする *Zp2* および卵胞細胞からのシグナルを受容する *Kit*、卵母細胞特異的構造体 *subcortical maternal complex* 構成タンパク質の一部をコードする *Padi6*、*Nlrp2* および *Nlrp5* に見られる卵母細胞の正常な機能および成長に必須の遺伝子群が多く含まれていた (Paillisson *et al.* 2005, Monk *et al.* 2017)。このことから *Nobox* の発現上昇を通して、より *in vivo* 卵母細胞に近い遺伝子発現プロファイルを有する IVG 卵母細胞の作出が期待され、発生能獲得機構と転写ネットワークの関係性の理解に繋がることが期待された。

第六章 総括

背景および目的

生殖細胞は、種の維持に不可欠な細胞である。雌の生殖細胞である卵子は、ゲノム情報、エピゲノム情報、ミトコンドリアなどの細胞小器官、および mRNA・タンパク質などの母性因子を次世代（胚）に継承する役目を担う。卵母細胞はその成長過程で、卵子として機能するための能力を獲得していく。卵母細胞／卵胞の体外成長培養（*in vitro* growth; IVG）は卵母細胞成長過程を体外で再現し、発生能を持たない成長期卵母細胞から機能的な卵子の作出を可能とする。卵巣から成長途上の卵母細胞を含む二次卵胞を採取し、12–14 日間の IVG によって得られた卵母細胞は、*in vivo* で成長を完了させた卵核胞（Germinal vesicle; GV）期卵母細胞と同等に第二減数分裂中（Metaphase in the second meiosis; MII）期まで成熟する能力を有する。しかし、IVG 卵母細胞に由来する受精卵の個体発生率は 21–24%と *in vivo* 由来受精卵の発生率 59%と比較して低いのが現状である。このことから、現行の IVG 由来卵母細胞の多くは、生殖に寄与する能力を有する完全な卵子とは異質の不完全なものであることが示唆されている。これまでの研究で、培養時の酸素濃度が IVG 卵母細胞の成熟・受精後の発生能に影響しうるということが報告されてきたが、卵母細胞内のどのような変化が発生能向上に寄与したのかは不明である。IVG 卵母細胞の不完全性を理解することは、*in vivo* において機能的な卵子がどのように形成されるのか、その過程の理解につながる。また、卵巣内の卵母細胞を生殖資源として効率的に利用するためには、至適 IVG 条件の検討が必要と考えられる。そこで当研究では、

マウス二次卵胞の IVG における至適酸素濃度を検討すると共に、IVG 卵母細胞の発生能を説明しうる機構の理解を目的とし、ミトコンドリア動態の解析とシングルセル RNA-seq (scRNA-seq) による遺伝子発現解析を実施した。

結果および考察

1 IVG 至適酸素濃度の決定とミトコンドリア異常

1-1. IVG における至適酸素濃度の決定

出生後 10 日齢のマウス卵巣より単離した二次卵胞をコラーゲンコートメンブレン上で、2%ポリビニルピロリドン、5%ウシ胎子血清および 0.1 IU/ml 卵胞刺激ホルモン添加 α MEM 中で 12 日間の IVG を実施し、IVG 卵母細胞を作出した。通常酸素条件 (20%) に加え 5、7 および 10%酸素条件で IVG を実施した。IVG 卵母細胞の体外成熟培養および体外受精により得られた受精卵を KSOM+AA 中で 5 日間培養し、胚盤胞期胚までの発生能を比較した。20%群と比較し、5%群および 7%群では MII 期までの成熟能が低下した一方で ($p<0.01$)、5%群および 7%群では受精後の発生能が顕著に上昇した ($p<0.01$)。胚作出効率 (成熟率 \times 発生率) は酸素濃度 20%群で 56%であるのに対して酸素濃度 7%群で 70%と最も高く、今回の試験群において IVG の至適酸素濃度は 7%であることが示された。

1-2. IVG 卵母細胞におけるミトコンドリア動態の解析

至適酸素条件 7%群および通常条件 20%群、そして *in vivo* 群のミトコンドリア動態を卵母細胞成長が完了した GV 期卵母細胞および第二減数分裂中期まで成熟した MII 期卵子で解析した。まずはミトコンドリア特異的蛍光プローブ

MitoTracker を用い、細胞内領域ごとの相対輝度値をもとにした局在パターンを解析した。その結果、GV 期卵母細胞において *in vivo* 群では卵核周縁部にミトコンドリアが局在する一方で、20%-IVG 群で卵核周縁部への異常な凝集、ならびに 7%-IVG 群で細胞膜周縁部への脱局在を示す卵母細胞が顕著に多かった。正常なミトコンドリア局在を示した卵母細胞は *in vivo* 群の 62%と比較して 20%-IVG 群で 36%および 7%-IVG 群で 27%と低下した。MII 期卵子においてもこれらの異常局在は回復せず、IVG 群双方でミトコンドリアは核周縁部へ異常凝集した。

次に JC-1 プローブによるミトコンドリア膜電位を解析した。その結果、GV 期卵母細胞において *in vivo* 群と比べ 20%-IVG 群 ($p<0.05$) および 7%-IVG 群 ($p<0.05$) における膜電位の低下が見られ、また 20%-IVG 群では 7%-IVG 群と比較してさらに有意な低下が認められた ($p<0.05$)。また MII 期においても同様の傾向を示した。

ミトコンドリアの量的な動態を明らかにするため、qPCR によるミトコンドリア DNA コピー数の定量解析を実施した。IVG 前の成長期卵母細胞では 23.1×10^4 コピーのミトコンドリア DNA が含まれていた。このコピー数は、*in vivo* 群では GV 期までに 3.0 倍、さらに MII 期までに 1.2 倍増加し、最終的に成熟卵子あたり 82.4×10^4 コピーが含まれていた。一方で GV 期において 20%-IVG 群は 49.0×10^4 コピー ($p<0.05$) ならびに 7%-IVG 群は 44.1×10^4 コピー ($p<0.05$) と *in vivo* 群と比較し、ミトコンドリア DNA コピー数は顕著に低下した。また MII 期においても 20%-IVG 群で 33.4×10^4 コピー ($p<0.05$) ならびに 7%-IVG 群で

22.1×10^4 コピー ($p < 0.05$) と *in vivo* 群と比較して有意に低く、双方で卵母細胞成熟に伴って大幅にミトコンドリア DNA コピー数が減少した。

以上より 7%-IVG 群では 20%-IVG 群と比較して卵母細胞のミトコンドリア膜電位の低下が改善されることが明らかとなった。その一方で、IVG 卵母細胞では *in vivo* 由来卵母細胞と比較して、ミトコンドリア膜電位の低下、ミトコンドリア DNA コピー数の低下およびミトコンドリア局在の異常が共通して観察された。

1-3. IVG 卵母細胞におけるミトコンドリア機能の解析

IVG 卵母細胞、特に 20%-IVG 群においては、ミトコンドリア膜電位の低下に伴った ATP 量低下や ROS 量増加が考えられた。そこでまず酸化ストレス感受性蛍光プローブ CellROX プローブを用いて ROS の相対定量解析を実施した。その結果、予想に反して 7%-IVG 群における有意な ROS の増加が見られ ($p < 0.05$)、その一方で、20%-IVG 群は *in vivo* 群と同程度の ROS 量を示した。これは MII 期卵子においても同様だった。

次にルシフェラーゼを用いた ATP 定量解析を実施した。IVG 前の成長期卵母細胞では平均して 0.39 pmol の ATP が含まれたが、*in vivo* で成長を完了した GV 期卵母細胞では 0.46 pmol の ATP が含まれていた。しかし、成熟終了後の MII 期卵子において ATP 量は 0.30 pmol まで低下した。一方、IVG 卵母細胞では予想に反し、GV 期卵母細胞において 20%-IVG 群で 0.57 pmol ($p < 0.05$) ならびに 7%-IVG 群で 0.65 pmol ($p < 0.05$) と *in vivo* 群よりも顕著な ATP 量の増加が見られた。しかしながら MII 期卵子では IVG 群の ATP 量は *in vivo* 群と同程度まで低

下し、有意な差も認められなくなった。

以上の結果より IVG 群におけるミトコンドリア膜電位の著しい低下は ROS 量の増加や ATP 量の低下を伴わないことが分かった。これは IVG 卵母細胞由来胚の発生能低下が、ROS や ATP に代表されるミトコンドリア異常の二次的な影響ではなく、異常な卵子ミトコンドリアが母性ミトコンドリアとして次世代に継承され、胚発生期間においてミトコンドリア機能低下が顕在化するという直接的な影響によるものと考えられた。一方、GV 期の IVG 卵母細胞は *in vivo* 由来の卵母細胞と比較して大量の ATP を含有するにも関わらず、成熟後、MII 期ではこの量的差が無くなった。これまでに卵母細胞の成熟過程では、卵母細胞内で ATP 生産および消費が起きることが報告されており、IVG 卵母細胞ではミトコンドリア機能低下によって卵母細胞成熟における ATP 生産が消費に追い付かなかったものと考えられた。

2. 母性ミトコンドリアが発生能に与える影響

IVG 卵母細胞の異常なミトコンドリア特性が母性ミトコンドリアとして胚へ継承され、胚発生能低下を誘起することが考えられた。そこで IVG 卵母細胞に由来する 2 細胞期胚のミトコンドリア動態を解析した。*in vivo* 由来 MII 期卵子の体外受精により得られた *in vivo* 胚および 7%-IVG に由来する *in vitro* 胚の 2 細胞期におけるミトコンドリア膜電位の解析およびミトコンドリア相対定量解析を実施した。その結果、GV 期卵母細胞や MII 期卵子同様に *in vivo* 胚と比較して、*in vitro* 胚でミトコンドリア膜電位 ($p<0.05$) およびミトコンドリア量 ($p<0.05$) の有意な低下が認められた。これは IVG 卵母細胞における異常なミ

トコンドリア特性が受精を介して消去されず、初期胚へ継承されたことを示唆した。次に、ミトコンドリア量解析後の 2 細胞期胚の発生能を追跡し、母性ミトコンドリア量が胚発生に与える影響を解析した。その結果、胚盤胞期胚まで到達した胚はミトコンドリアを多く含有する傾向にあり、また 2 細胞期胚で発生停止を示した胚は胚盤胞期胚まで到達した胚に比べてミトコンドリア含有量が有意に少ないことが分かった ($p<0.01$)。さらに、胚盤胞期および桑実胚期まで到達した胚をミトコンドリア量の多寡から 2 群に分別し、胚の移植実験を通してミトコンドリア量が個体発生能に与える影響を解析した。その結果、個体発生能に差は見られなかったものの、ミトコンドリアを多く含有する群において着床率は有意に向上した ($p<0.05$)。以上の結果から、卵母細胞におけるミトコンドリアの正常性は、胚のミトコンドリア正常性に影響を与え、また母性ミトコンドリア量の発生能への影響しうることを示され、*in vitro* 胚の低発生能の一因が母性ミトコンドリア異常であることが示唆された。

3. 卵母細胞の発生能に寄与しうる分子経路の同定

3-1. 大規模遺伝子発現プロファイルの解析

各群の卵母細胞が有する遺伝子発現プロファイルを解析した。QIAseq を用いて 5、7、10 および 20%酸素濃度で培養した GV 期の IVG 卵母細胞、そして *in vivo* 由来卵母細胞の scRNA-seq を実施し、遺伝子発現プロファイルを取得した。主成分分析の結果、主集団から外れた位置にプロットされる亜集団を同定した。卵母細胞成長過程における高発現遺伝子の一部に PC1 (94.1%) への強い寄与が見られ、またこれらの遺伝子の亜集団内における遺伝子発現傾向が一様でな

かったことから亜集団に属する卵母細胞は、正常な卵母細胞成長から外れた卵母細胞集団であることが考えられた。これらの亜集団を除去後、再度、主成分分析を行った結果、20%、10%、7%および5%と培養酸素濃度の低下に伴って *in vivo* 群に近づいていくようにプロットされた。5%群は主集団において最も *in vivo* 群に近い遺伝子発現プロファイルを示したのにも関わらず、多くの5%群卵母細胞 (n=8/24) が亜集団に属しており、成熟率は低い一方で、成熟を完了できた卵子が高い発生率を示す5%群の卵子の特性と符合した。

3-2 20%酸素条件で得られた IVG 卵母細胞に特異的な発現異常遺伝子の解析

20%酸素条件で得られた IVG 卵母細胞と比較し、7%群酸素条件で得られた IVG 卵母細胞がより高い発生能を有していたことから、この胚発生能改善に寄与する分子生物学的機序の解明を目的に、通常条件 20%群および至適酸素条件 7%群のそれぞれと *in vivo* 由来卵母細胞群における発現変動遺伝子を解析した。DESeq2 を用いた ward 検定により抽出した各群間の発現変動遺伝子のうち 20%群特異的に異常発現を示した 2,555 遺伝子を抽出した ($p_{adj} < 0.05$)。これらの遺伝子は 20%群で発現異常を示し、7%群では発現改善することから発生能改善に関与する分子生物学的経路の濃縮が期待された。エンリッチメント解析の結果、「Cell cycle」や「regulation of translation」など卵母細胞成長過程における生物学的イベントに符合する GO term、KEGG pathway が多く濃縮された他、「Apoptotic process」および「Sphingolipid signal pathway」も併せて濃縮された ($q < 0.05$)。スフィンゴ脂質代謝経路は、細胞膜成分であるスフィンゴミエリンを代謝し、また脂質メディエーターとして細胞死を誘起するセラミドならび

に細胞生存を促すスフィンゴシンーリン酸を代謝する経路として知られる。また、スフィンゴ脂質代謝はスフィンゴ脂質を新規合成する *de novo* 経路とセラミド・スフィンゴシンーリン酸を相互変換し、細胞死を制御する *salvage* 経路の二つの経路からなりセラミド合成が亢進された場合、アポトーシスが誘起され、ミトコンドリア損傷が生じる。濃縮されたスフィンゴ脂質代謝遺伝子の発現傾向に着目したところ、*de novo* 経路、*salvage* 経路双方でセラミド合成の異常亢進が示唆された。LC-MS 解析により卵母細胞内のセラミド (d18:1/16:0) を定量した結果、*in vivo* 群に対し、20%群で 1.9 倍の顕著なセラミド量の増加が示された ($p<0.05$) その一方で、7%群では 1.3 倍程度と有意な変化は見られず、スフィンゴ脂質代謝遺伝子の発現変動パターンに符合した。またこのセラミド含有量の変化は、GV 期卵母細胞におけるミトコンドリア膜電位の変化と強い逆相関を示し、20%群におけるセラミド蓄積量の増加に伴ったミトコンドリア損傷が強く示唆された。一方、ミトコンドリアゲノムの複製・転写を促進する *Tfam* やミトコンドリアの融合および分裂に働く *Mfn1* および *Drp1* など、ミトコンドリア制御遺伝子に着目すると、3 群間において発現変動は見られたが発生能改善やミトコンドリア機能を説明しうる分子経路は同定できなかった。

3-3 正常な卵母細胞の遺伝子発現プロファイルを導くマスター遺伝子の推定

次に、*in vivo* 由来卵母細胞と比較して 20%あるいは 7%の酸素濃度によらず IVG 由来卵母細胞で共通して発現変動する 1,831 遺伝子に着目した。これらのうち 714 遺伝子は IVG 卵母細胞で共通して発現上昇し、489 遺伝子が発現低下

を示した。エンリッチメント解析の結果、発現低下遺伝子中に「regulation of transcription, DNA-templated」の濃縮が見られた。このことから IVG 群における遺伝子発現プロファイルの不完全性は、転写関連遺伝子に起因すると考え、発現低下を示した転写関連遺伝子 56 遺伝子を卵母細胞成熟や受精、胚発生を保障しうる正常な卵母細胞遺伝子発現プロファイル導くマスター遺伝子の候補として抽出した。一方、20%群、7%群および *in vivo* 群の遺伝子発現プロファイルの階層的クラスタリング解析の結果、大部分の卵母細胞はそれぞれの群に従ったクラスタに属した。しかし一部の 7%群卵母細胞は *in vivo* 群クラスタに属していた。7%群におけるこれらの集団を *in vivo*-like (IVL) 群とし、通常の 7% (canonical) 群と区別した。これらと *in vivo* 群の遺伝子発現プロファイルを発現変動遺伝子解析に供試した。その結果、IVL 群 – canonical 群間で有意に発現が変動し、かつ、IVL 群 – *in vivo* 群間で変動を示さなかった 1,623 遺伝子に着目した ($p_{adj} < 0.05$)。ここで、IVG 卵母細胞で共通して発現低下を示した転写関連遺伝子、すなわち、正常な卵母細胞の遺伝子発現プロファイルを導くマスター遺伝子の候補として抽出した 56 遺伝子が、この 1,623 遺伝子に含まれるか否かを調べた。その結果、IVL 群では 56 遺伝子中 10 遺伝子が *in vivo* 群の発現レベルにまで回復し、この 10 遺伝子には、卵母細胞成長期移行に必須な *Nobox* が含まれた。さらに、各卵母細胞間における遺伝子発現動態が *Nobox* に相関 ($r \geq 0.7$, $\log_2(\text{CPM}+1) > 6$) を示した 87 遺伝子を *Nobox* 下流候補遺伝子として抽出したところ、NOBOX による転写制御が報告されている *Gdf9* が含まれた。さらに、卵母細胞の成長、受精およびエピジェネティック修飾の確立にそれぞれ不可欠

な *Kit*, *Zp2* および *Nlrp5* なども *Nobox* 下流候補遺伝子として抽出され、卵母細胞成長における *Nobox* の新しい機能的側面が示唆された。

総合考察・総括

本研究において、マウス二次卵胞の IVG には 7%酸素条件が至適であり、従来の 20%酸素条件よりも胚盤胞期への発生率が大幅に改善することが明らかになった (Ota *et al.* 2021)。この 20%酸素条件における IVG 由来胚の発生能低下は、ミトコンドリア膜電位の顕著な低下が一因していると考えられた。また、このミトコンドリア膜電位の低下を伴う発生能の低下は、GV 期卵母細胞におけるスフィンゴ脂質代謝関連遺伝子の異常発現に起因する過剰なセラミドの蓄積が一因すると考えられた (Takashima *et al.* 2021)。卵母細胞の体外成熟培地にセラミドやセラミド合成の前駆物質となるパルミチン酸を添加すると得られた卵子の発生能が低下することが報告されている。また、*in vivo* では卵胞成長に伴い卵胞内の酸素分圧低下すること、暑熱ストレス下では卵子の発生能が低下する他、卵胞内の酸素分圧の低下が鈍化することが報告されている。そのため、卵母細胞成長過程では、ミトコンドリアインテグリティを維持するための機構として酸素濃度を能動的に制御している可能性が考えられた。一方、至適な 7%酸素条件で作出された IVG 由来胚においても、その発生能は *in vivo* 由来胚より顕著に低かった。IVG 卵母細胞の損傷した母性ミトコンドリアは初期胚に継承され、2 細胞期以降の発生能および着床までの発生能を低下させることが分かった。一方、*in vivo* 由来卵母細胞の遺伝子発現プロファイルと同様のプロファイルを獲得するためのマスター遺伝子として複数の転写関連因子を抽出し、

中でも *Nobox* が、卵母細胞の成長期への移行のみならず発生能獲得に機能する遺伝子の発現を制御している可能性が新たに示唆された。本研究結果が、体外配偶子生産における高効率化、ならびに卵母細胞成長過程における胚発生能獲得機構の理解につながるものと期待したい。

Summary

Germ cells are essential for maintaining a species. The female germ cell, the oocyte, plays a role in passing genomic and epigenomic information, organelles such as mitochondria, and maternal factors such as mRNA and proteins to the next generation. During growth, the oocyte acquires functional capabilities. *In vitro* growth (IVG) of growing oocytes/secondary follicles recapitulates the process of oocyte growth *in vitro* and enables the production of functional oocytes from growing oocytes without developmental potential. Secondary follicles containing growing oocytes are isolated from the ovary and oocytes obtained after 12–14 days of IVG exhibit the same ability to mature to the metaphase in the second meiosis (MII) stage as oocytes in the germinal vesicle (GV) stage, which have completed growth *in vivo*. However, the developmental rate of fertilized oocytes derived from IVG oocytes to pups is currently 21%–24%, which is lower than the 59% contribution rate of *in vivo*-derived fertilized oocytes. This suggests that many of the current IVG-derived oocytes are incomplete and dissimilar to *in vivo* oocytes with the ability to contribute to reproduction. Previous studies have shown that oxygen concentration in culture can affect the maturation and post-fertilization developmental potential of IVG oocytes, but it is unclear what changes in the oocytes contribute to their enhanced developmental potential. Understanding the incompleteness of IVG oocytes will lead to a better understanding of how functional oocytes are formed *in vivo*. In addition, it is necessary to examine the optimal IVG conditions for the efficient use of oocytes in the ovary as a reproductive resource.

In this study, we investigated the optimal oxygen concentration in IVG of mouse secondary follicles and analyzed mitochondrial dynamics and gene expression using single-cell RNA-seq (scRNA-seq) to understand the mechanisms that may explain the developmental potential of IVG oocytes.

I. Optimization of oxygen concentration in mouse IVG and investigation of mitochondrial dysfunction

I-i. Optimization of oxygen concentration in mouse IVG

Secondary follicles isolated from 10-day-old mouse ovaries were subjected to 12 d of IVG on a collagen-coated membrane in α MEM supplemented with 2% polyvinylpyrrolidone, 5% fetal bovine serum, and 0.1 IU/ml follicle-stimulating hormone to generate IVG oocytes. IVG was performed under conventional oxygen conditions (20%) and 5%, 7%, and 10% oxygen conditions. Fertilized oocytes derived from IVG oocytes obtained by *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization were cultured in KSOM+AA for 5 d, and the developmental potential to blastocyst stage embryos was compared. The oocytes under 5% and 7% oxygen conditions showed decreased maturation potential to the MII stage compared to the 20% oxygen condition ($p < 0.01$), whereas they showed significantly increased developmental potential after fertilization ($p < 0.01$). The post-fertilization developmental potential was significantly increased ($p < 0.01$) in the 5% and 7% oxygen groups. The embryo production efficiency (maturation rate \times development rate) was the highest in the 7% oxygen condition at 70% compared

to 56% in the 20% oxygen condition, indicating that the optimal oxygen concentration for IVG in this study condition was 7%.

I-ii. Investigation of mitochondrial dysfunction of IVG oocyte

Mitochondrial dynamics in the 7% optimal oxygen condition, 20% normal condition, and *in vivo* oocytes were analyzed at the GV and MII stages. The mitochondria-specific fluorescent probe MitoTracker was used to analyze the localization patterns based on the relative intensity of each subcellular region. These results indicated that although the mitochondria were localized around the nucleus in the *in vivo* oocytes, there were significantly more oocytes that showed extreme aggregation around the nucleus in the 20% IVG group and delocalized to the periphery of the cell membrane in the 7% IVG group at the GV stage. The number of oocytes with normal mitochondrial localization decreased to 36% in the 20% IVG group and 27% in the 7% IVG group, compared to 62% in the *in vivo* group. These abnormal localizations did not recover in the MII stage, and mitochondria aggregated abnormally in the perinuclear region in both IVG groups. Next, we analyzed mitochondrial membrane potential using the JC-1 probe. The results showed that the membrane potential of oocytes in the GV stage was decreased in the 20% IVG group ($p < 0.05$) and 7% IVG group ($p < 0.05$) compared to that in the *in vivo* group, and the 20% IVG group showed a more significant decrease than the 7% IVG group ($p < 0.05$). The same trend was observed at the MII stage. To clarify the quantitative dynamics of mitochondria in oocytes, we performed quantitative analysis of

mitochondrial DNA copy number by qPCR. Pre-IVG growing oocytes contained 23.1×10^4 copies of mitochondrial DNA. In the *in vivo* group, this copy number increased 3.0-fold by the GV stage, and further increased 1.2-fold by the MII stage, finally containing 82.4×10^4 copies per mature oocyte. In contrast, the mitochondrial DNA copy number was significantly lower in the 20% IVG group (49.0×10^4 copies, $p < 0.05$) and the 7% IVG group (44.1×10^4 copies, $p < 0.05$) than in the *in vivo* group at the GV stage. A further severe reduction was observed at the MII stage. The mitochondrial DNA copy number was significantly lower in the 20% IVG group (33.4×10^4 copies, $p < 0.05$) and in the 7% IVG group (22.1×10^4 copies, $p < 0.05$) than in the *in vivo* group at the GV stage. These results showed that compared to the 20% IVG group, the 7% IVG group showed an improvement in the mitochondrial membrane potential of oocytes. In contrast, a decrease in mitochondrial membrane potential, a decrease in mitochondrial DNA copy number, and abnormal mitochondrial localization were commonly observed in IVG oocytes compared to *in vivo*-derived oocytes.

I-iii. Analysis of mitochondrial function in IVG oocytes

The IVG oocytes, especially the 20% IVG group, were speculated to exhibit a decrease in ATP content and an increase in ROS content because of the decrease in mitochondrial membrane potential. Therefore, we first performed a relative quantitative analysis of ROS using the oxidative stress-sensitive fluorescent probe, CellROX probe. The results showed that, contrary to expectations, there was a significant increase in ROS

in the 7% IVG group ($p < 0.05$), whereas the 20% IVG group showed the same amount of ROS as the *in vivo* group at the GV stage. This was also the case in MII stage oocytes. Next, ATP quantification was performed using luciferase. Before IVG, the growing oocytes contained 0.39 pmol ATP on average, whereas GV-stage oocytes that completed growth *in vivo* contained 0.46 pmol ATP. However, the amount of ATP decreased to 0.30 pmol in MII stage oocytes after maturation. In contrast, in IVG oocytes, contrary to our expectation, the amount of ATP in GV oocytes was significantly higher than that in the *in vivo* group: 0.57 pmol ($p < 0.05$) in the 20% IVG group and 0.65 pmol ($p < 0.05$) in the 7% IVG group. However, in the MII stage, the amount of ATP in the IVG oocytes decreased to the same level as that in the *in vivo* group, and no significant difference was observed. These results indicate that the large decrease in mitochondrial membrane potential in the IVG group was not accompanied by an increase in ROS or a decrease in ATP levels. This suggests that the reduced developmental potential of IVG oocyte-derived embryos is not a secondary effect of mitochondrial abnormalities represented by ROS and ATP, but a direct effect of the inheritance of abnormal mitochondria in oocytes as maternal mitochondria to the next generation and the manifestation of mitochondrial dysfunction during embryogenesis. However, although a large amount of ATP was present in IVG oocytes in the GV stage compared to that in *in vivo*-derived oocytes, this quantitative difference disappeared after maturation in the MII stage. ATP production and consumption have been reported to occur in oocytes during oocyte maturation, and it is

thought that ATP production in IVG oocytes cannot compensate for consumption during oocyte maturation owing to impaired mitochondrial function.

I-iv. Effect of maternal mitochondria on developmental potential

We hypothesized that the abnormal mitochondrial characteristics of IVG oocytes are inherited by the embryo as maternal mitochondria and induce a reduction in embryonic developmental potential. Therefore, we analyzed the mitochondrial dynamics of IVG-derived embryos at the 2-cell stage. Mitochondrial membrane potential and relative mitochondrial quantification were evaluated in *in vivo* oocyte-derived and IVG oocyte-derived embryos at the 2-cell stage obtained by *in vitro* fertilization. The results showed that there was a significant decrease in mitochondrial membrane potential ($p < 0.05$) and mitochondrial amount ($p < 0.05$) in *in vitro* embryos compared to *in vivo* embryos, as well as in GV- and MII-stage oocytes. This suggested that the abnormal mitochondrial characteristics in IVG oocytes were not eliminated through fertilization and were inherited by the embryo. Next, after mitochondrial content analysis, IVG-derived embryos at the 2-cell stage were analyzed for developmental potential to investigate the effect of maternal mitochondrial content on embryonic development. The results showed that embryos that reached the blastocyst stage tended to contain more mitochondria, and embryos that showed developmental arrest at the 2-cell stage had significantly lower mitochondrial content than embryos that reached the blastocyst stage ($p < 0.01$). Furthermore, embryos that had reached the blastocyst and morula stages were

divided into two groups based on their mitochondrial content at the 2-cell stage, and the effects of mitochondrial content on developmental potential were analyzed through embryo transfer experiments. The implantation rate was significantly improved in the mitochondria-rich group ($p < 0.05$), although there was no difference in developmental potential to term.

These results indicate that mitochondrial normality in oocytes influences mitochondrial normality in embryos and that maternal mitochondrial content can influence developmental potential, suggesting that maternal mitochondrial abnormalities are attribute to the low developmental potential of IVG-derived embryos.

II. Identification of molecular pathways that may contribute to the developmental potential of oocytes

II-i. Analysis of gene expression profiles of IVG oocytes

IVG oocytes cultured at 5%, 7%, 10%, and 20% oxygen conditions, and *in vivo*-derived oocytes at the GV stage were subjected to single-cell RNA-seq using QIAseq, and gene expression profiles were obtained. Principal component analysis was performed to identify subpopulations that plotted outside the main population. The strong contribution to PC1 (94.1%) of some of the highly expressed genes during oocyte growth and the non-uniformity of gene expression patterns within the subpopulation suggested that the oocytes belonging to the sub-population were the oocytes that dropped out from normal oocyte growth. After removal of the sub-population, principal component analysis

was performed again, and the plotted results showed that the expression profiles of the 20%, 10%, 7%, and 5% oxygen condition groups moved closer to that of the *in vivo* group as the oxygen concentration in the culture decreased. Although the 5% IVG oocytes showed the most similar gene expression profile to that of the *in vivo* oocytes in the main population, many of the 5% IVG oocytes (n = 8/24) belonged to the sub-population, consistent with the characteristics of the 5% IVG oocytes of a low maturation rate but a high developmental rate.

II-ii. Analysis of abnormally expressed genes specific to 20% IVG oocytes

To elucidate the molecular mechanisms that contribute to the improvement in development potential in the 7% IVG oocytes, we analyzed the differentially expressed genes between the 20% IVG oocytes and the 7% IVG group under optimal oxygen conditions and *in vivo*-derived oocytes. The 2,555 genes that specifically showed abnormal expression levels in the 20% IVG group were extracted using the ward test in DESeq2 ($\text{padj} < 0.05$). The expression of these genes was abnormal in the 20% IVG group and improved in the 7% IVG group, suggesting the enrichment of molecular biological pathways involved in the improvement of developmental potential. Enrichment analysis showed that GO terms and KEGG pathways, which correspond to biological events in the oocyte growth process, such as “Cell cycle” and “Regulation of translation,” were enriched, although unfamiliar terms, including “Apoptotic process” and “Sphingolipid signal pathway” ($q < 0.05$), were also enriched. The sphingolipid metabolic pathway is

known to metabolize sphingomyelin, a component of cell membranes, as well as ceramide, a lipid mediator that induces cell death, and sphingosine 1-phosphate, which promotes cell survival. In addition, sphingolipid metabolism consists of two pathways, the *de novo* pathway, which synthesizes new sphingolipids, and the salvage pathway, which interconverts ceramide and sphingosine 1-phosphate and regulates cell death. When ceramide synthesis is enhanced, apoptosis is induced, leading to mitochondrial damage. Focusing on the expression trends of enriched sphingolipid metabolism genes, abnormally enhanced ceramide synthesis was suggested in both the *de novo* and salvage pathways. Quantification of ceramide (d18:1/16:0) in oocytes at the GV stage by LC-MS showed a significant increase of 1.9-fold in the 20% IVG group compared to the *in vivo* group ($p < 0.05$), whereas the change of 1.3-fold in the 7% IVG group was not significant, consistent with the expression pattern of sphingolipid metabolism genes. The change in ceramide content showed a strong negative correlation with the change in mitochondrial membrane potential in the GV stage, strongly suggesting mitochondrial damage associated with increased ceramide accumulation in the 20% IVG group. However, when we focused on mitochondrial regulatory genes, such as *Tfam*, which promotes mitochondrial genome replication and transcription, and *Mfn1* and *Drp1*, which are involved in mitochondrial fusion and fission, their genes showed variation in expression levels in the 20% IVG, 7% IVG, and *in vivo*-grown oocytes, but we could not identify any molecular pathway that could explain the improvement in developmental potential in the 7% IVG group.

III. Estimation of master genes leading to completeness of oocyte gene expression profiles

Next, we focused on the 1,831 genes that were commonly differentially expressed in IVG-derived oocytes regardless of 20% or 7% oxygen concentration compared to *in vivo*-derived oocytes. Of these, 714 genes were commonly upregulated in IVG-derived oocytes, and 489 genes were downregulated. Enrichment analysis revealed an enrichment of “Regulation of transcription, DNA-templated” in the downregulated genes. Therefore, we considered that the incomplete gene expression profile in IVG oocytes was caused by transcription-related genes, and the 56 transcription-related genes that showed reduced expression were selected as candidates for master genes leading to completeness of oocyte gene expression profiles. In contrast, hierarchical clustering analysis of the gene expression profiles of the 20% IVG, 7% IVG, and *in vivo* groups showed that most of the oocytes belonged to the clusters according to their respective groups. However, some of the 7% IVG oocytes belonged to the *in vivo* group cluster. These sub-populations in the 7% IVG group were designated as the *in vivo*-like (IVL) group and were distinguished from the normal 7% (canonical) group. The gene expression profiles of these and *in vivo* groups were analyzed for differentially expressed genes.

Then, we focused on the 1,623 genes whose expression differed between the IVL and canonical groups and did not show significant differences between the IVL and *in vivo* groups ($p_{adj} < 0.05$). Here, we examined whether the 1,623 genes included

transcription-related genes that commonly showed decreased expression in IVG oocytes, the 56 genes extracted as candidates for master genes that lead to completeness of oocyte gene expression profiles. Our results indicated that 10 out of 56 genes in the IVL group were restored to the expression level of the *in vivo* group, and these 10 genes, included *Nobox*, which is essential for the oocyte growth phase transition. In addition, 87 genes whose gene expression patterns across oocytes of each group correlated with *Nobox* ($r \geq 0.7$, $\log_2(\text{CPM}+1) > 6$) were selected as *Nobox* downstream candidate genes, including *Gdf9*, which has been reported to be transcriptionally regulated by NOBOX. Furthermore, *Kit*, *Zp2*, and *Nlrp5*, which are essential for oocyte growth, fertilization, and the establishment of epigenetic modifications, respectively, were also extracted as *Nobox* downstream candidate genes, suggesting a new functional aspect of *Nobox* in oocyte growth.

Discussion and conclusion

In the present study, we found that 7% oxygen conditions were optimal for mouse IVG, and the developmental rate to the blastocyst stage was significantly improved compared to the conventional 20% oxygen conditions. This decrease in the developmental potential of IVG-derived embryos in the 20% oxygen condition was thought to be due in part to a marked decrease in mitochondrial membrane potential. The reduced developmental potential accompanied by a decrease in mitochondrial membrane potential was thought to be due in part to excessive ceramide accumulation resulting from

abnormal expression of genes related to sphingolipid metabolism in GV-stage oocytes. It has been reported that the addition of ceramide or palmitic acid, a precursor of ceramide synthesis, to the *in vitro* maturation medium of oocytes decreases the developmental potential of the resulting oocytes. In addition, it has been reported that the partial pressure of oxygen in follicles decreases with follicle growth *in vivo*, and that heat stress reduces the developmental capacity of oocytes and slows down the decrease in the partial pressure of oxygen in follicles. Therefore, it is possible that oxygen concentration is actively regulated as a mechanism to maintain mitochondrial integrity during oocyte growth. The developmental potential of IVG-derived embryos generated under optimal 7% oxygen conditions was significantly lower than that of *in vivo*-derived embryos. Damaged maternal mitochondria in IVG oocytes are inherited by early embryos and reduce their developmental potential after the 2-cell stage and until implantation. Moreover, we extracted several transcription-related factors as master genes to obtain a gene expression profile similar to that of *in vivo*-derived oocytes; present among these was *Nobox* that is suggested to regulate the expression of genes that function not only in the transition of oocytes to the growth phase but also in the acquisition of developmental potential. We hope that the results of this research will lead to improved efficiency in *in vitro* gamete production and to a better understanding of the mechanism of embryonic development during oocyte growth.

謝辞

稿を終わるに臨み、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜り、また本論文のご校閲を頂きました東京農業大学動物発生工学研究室教授 尾畑やよい博士、小川英彦博士、樋浦仁博士ならびに東京農業大学動物分子生物学研究室教授 中澤敬信博士に深甚の誠意を表します。

さらに本実験の遂行にあたり、ご協力を頂いた藤丸 翼さんをはじめ、東京農業大学動物発生工学研究室の各諸氏に感謝致します。

参考文献

- Adams IR & McLaren A 2002 Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development* **129** 1155-1164.
- Albrecht KH & Eicher EM 2001 Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev Biol* **240** 92-107.
- Babayev E & Seli E 2015 Oocyte mitochondrial function and reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* **27** 175-181.
- Banwell KM, Lane M, Russell DL, Kind KL & Thompson JG 2007 Oxygen concentration during mouse oocyte in vitro maturation affects embryo and fetal development. *Hum Reprod* **22** 2768-2775.
- Basini G, Bianco F, Grasselli F, Tirelli M, Bussolati S & Tamanini C 2004 The effects of reduced oxygen tension on swine granulosa cell. *Regul Pept* **120** 69-75.
- Batt PA, Gardner DK & Cameron AW 1991 Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro. *Reprod Fertil Dev* **3** 601-607.
- Bayne RA, Kinnell HL, Coutts SM, He J, Childs AJ & Anderson RA 2015 GDF9 is transiently expressed in oocytes before follicle formation in the human fetal ovary and is regulated by a novel NOBOX transcript. *PLoS One* **10** e0119819.
- Bonneau B, Ando H, Kawaai K, Hirose M, Takahashi-Iwanaga H & Mikoshiba K 2016 IRBIT controls apoptosis by interacting with the Bcl-2 homolog, Bcl2l10, and by promoting ER-mitochondria contact. *Elife* **5**.
- Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, Scotto K, Fuks Z & Kolesnick R 1995 Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell* **82** 405-414.
- Cao L, Shitara H, Horii T, Nagao Y, Imai H, Abe K, Hara T, Hayashi J & Yonekawa H 2007 The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nat Genet* **39** 386-390.

- Cao Z, Xu T, Tong X, Wang Y, Zhang D, Gao D, Zhang L, Ning W, Qi X, Ma Y, Yu T, Knott JG & Zhang Y 2019 Maternal Yes-Associated Protein Participates in Porcine Blastocyst Development via Modulation of Trophectoderm Epithelium Barrier Function. *Cells* **8**.
- Carbognin E, Betto RM, Soriano ME, Smith AG & Martello G 2016 Stat3 promotes mitochondrial transcription and oxidative respiration during maintenance and induction of naive pluripotency. *EMBO J* **35** 618-634.
- Choi Y, Qin Y, Berger MF, Ballow DJ, Bulyk ML & Rajkovic A 2007 Microarray analyses of newborn mouse ovaries lacking Nobox. *Biol Reprod* **77** 312-319.
- Choi Y & Rajkovic A 2006 Characterization of NOBOX DNA binding specificity and its regulation of Gdf9 and Pou5f1 promoters. *J Biol Chem* **281** 35747-35756.
- Clark AR, Stokes YM, Lane M & Thompson JG 2006 Mathematical modelling of oxygen concentration in bovine and murine cumulus-oocyte complexes. *Reproduction* **131** 999-1006.
- Cross PC & Brinster RL 1970 In vitro development of mouse oocytes. *Biol Reprod* **3** 298-307.
- de Castro EPLA, Andrzejewski J, Julian D, Spicer LJ & Hansen PJ 2008 Oxygen and steroid concentrations in preovulatory follicles of lactating dairy cows exposed to acute heat stress. *Theriogenology* **69** 805-813.
- Eppig JJ 1977 Mouse oocyte development in vitro with various culture systems. *Dev Biol* **60** 371-388.
- Eppig JJ & Wigglesworth K 1995 Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown in vitro: oxygen concentration. *Mol Reprod Dev* **42** 447-456.
- Fischer B, Kunzel W, Kleinstein J & Gips H 1992 Oxygen tension in follicular fluid falls with follicle maturation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **43** 39-43.
- Ge H, Tollner TL, Hu Z, Dai M, Li X, Guan H, Shan D, Zhang X, Lv J, Huang C & Dong Q 2012 The importance of mitochondrial metabolic activity and mitochondrial DNA replication during oocyte maturation in vitro on oocyte quality and

- subsequent embryo developmental competence. *Mol Reprod Dev* **79** 392-401.
- Ghorbanmehr N, Salehnia M & Amooshahi M 2018 The Effects of Sodium Selenite on Mitochondrial DNA Copy Number and Reactive Oxygen Species Levels of In Vitro Matured Mouse Oocytes. *Cell J* **20** 396-402.
- Ginsburg M, Snow MH & McLaren A 1990 Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* **110** 521-528.
- Gudz TI, Tserng KY & Hoppel CL 1997 Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *J Biol Chem* **272** 24154-24158.
- Gupta SK, Bhandari B, Shrestha A, Biswal BK, Palaniappan C, Malhotra SS & Gupta N 2012 Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell Tissue Res* **349** 665-678.
- Gwatkin RB & Haidri AA 1974 Oxygen requirements for the maturation of hamster oocytes. *J Reprod Fertil* **37** 127-129.
- Haidri AA, Miller IM & Gwatkin RB 1971 Culture of mouse oocytes in vitro, using a system without oil or protein. *J Reprod Fertil* **26** 409-411.
- Hamazaki N, Kyogoku H, Araki H, Miura F, Horikawa C, Hamada N, Shimamoto S, Hikabe O, Nakashima K, Kitajima TS, Ito T, Leitch HG & Hayashi K 2021 Reconstitution of the oocyte transcriptional network with transcription factors. *Nature* **589** 264-269.
- Harada M, Miyano T, Matsumura K, Osaki S, Miyake M & Kato S 1997 Bovine oocytes from early antral follicles grow to meiotic competence in vitro: effect of FSH and hypoxanthine. *Theriogenology* **48** 743-755.
- Haraguchi S, Ikeda M, Akagi S & Hirao Y 2020 Dynamic Changes in pStat3 are Involved in Meiotic Spindle Assembly in Mouse Oocytes. *Int J Mol Sci* **21**.
- Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Yamada M, Imai H & Kashima N 2000 Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol Reprod Dev* **57** 353-360.
- Hayashi K, Hikabe O, Obata Y & Hirao Y 2017 Reconstitution of mouse oogenesis in a

- dish from pluripotent stem cells. *Nat Protoc* **12** 1733-1744.
- Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H & Saitou M 2012 Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science* **338** 971-975.
- Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S & Saitou M 2011 Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* **146** 519-532.
- Hirao Y, Itoh T, Shimizu M, Iga K, Aoyagi K, Kobayashi M, Kacchi M, Hoshi H & Takenouchi N 2004 In vitro growth and development of bovine oocyte-granulosa cell complexes on the flat substratum: effects of high polyvinylpyrrolidone concentration in culture medium. *Biol Reprod* **70** 83-91.
- Hirao Y & Miyano T 2008 *In Vitro* Growth of Mouse Oocytes: Oocyte Size at the Beginning of Culture Influences the Appropriate Length of Culture Period. *Journal of Mammalian Ova Research* **25** 56-62.
- Hirao Y, Nagai T, Kubo M, Miyano T, Miyake M & Kato S 1994 In vitro growth and maturation of pig oocytes. *J Reprod Fertil* **100** 333-339.
- Hirao Y, Shimizu M, Iga K & Takenouchi N 2012 Optimization of oxygen concentration for growing bovine oocytes in vitro: constant low and high oxygen concentrations compromise the yield of fully grown oocytes. *J Reprod Dev* **58** 204-211.
- Hiura H, Obata Y, Komiyama J, Shirai M & Kono T 2006 Oocyte growth-dependent progression of maternal imprinting in mice. *Genes Cells* **11** 353-361.
- Houghton FD 2006 Energy metabolism of the inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. *Differentiation* **74** 11-18.
- Iwamoto M, Onishi A, Fuchimoto D, Somfai T, Takeda K, Tagami T, Hanada H, Noguchi J, Kaneko H, Nagai T & Kikuchi K 2005 Low oxygen tension during in vitro maturation of porcine follicular oocytes improves parthenogenetic activation and subsequent development to the blastocyst stage. *Theriogenology* **63** 1277-1289.
- John GB, Gallardo TD, Shirley LJ & Castrillon DH 2008 Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Dev Biol* **321** 197-

204.

- Kim D, Langmead B & Salzberg SL 2015 HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* **12** 357-360.
- Kim KH, Kim EY, Ko JJ & Lee KA 2019 Gas6 is a reciprocal regulator of mitophagy during mammalian oocyte maturation. *Sci Rep* **9** 10343.
- Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A & Watanabe T 2004 Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* **62** 1186-1197.
- Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD & Page DC 2006 Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** 2474-2479.
- Larsen PJ & Tennagels N 2014 On ceramides, other sphingolipids and impaired glucose homeostasis. *Mol Metab* **3** 252-260.
- Legge M & Sellens MH 1991 Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. *Hum Reprod* **6** 867-871.
- Li J & Foote RH 1993 Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty per cent oxygen. *J Reprod Fertil* **98** 163-167.
- Li J, Kim SG & Blenis J 2014 Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab* **19** 373-379.
- Li W, Zhao H, Zhuang R, Wang Y, Cao W, He Y, Jiang Y, Rui R & Ju S 2021 Fumonisin B1 exposure adversely affects porcine oocyte maturation in vitro by inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Theriogenology* **164** 1-11.
- Liao Y, Smyth GK & Shi W 2014 featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30** 923-930.
- Love MI, Huber W & Anders S 2014 Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15** 550.
- Mahrous E, Yang Q & Clarke HJ 2012 Regulation of mitochondrial DNA accumulation

- during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *Reproduction* **144** 177-185.
- Matsui Y & Mochizuki K 2014 A current view of the epigenome in mouse primordial germ cells. *Mol Reprod Dev* **81** 160-170.
- McKiernan SH & Bavister BD 1990 Environmental variables influencing in vitro development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Biol Reprod* **43** 404-413.
- McLaren A 1984 Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp Soc Exp Biol* **38** 7-23.
- Mizumachi S, Aritomi T, Sasaki K, Matsubara K & Hirao Y 2018 Macromolecular crowded conditions strengthen contacts between mouse oocytes and companion granulosa cells during in vitro growth. *J Reprod Dev* **64** 153-160.
- Monk D, Sanchez-Delgado M & Fisher R 2017 NLRPs, the subcortical maternal complex and genomic imprinting. *Reproduction* **154** R161-R170.
- Morita Y, Perez GI, Paris F, Miranda SR, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Xie Z, Reed JC, Schuchman EH, Kolesnick RN & Tilly JL 2000 Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med* **6** 1109-1114.
- Morohaku K, Hirao Y & Obata Y 2017 Development of fertile mouse oocytes from mitotic germ cells in vitro. *Nat Protoc* **12** 1817-1829.
- Morohaku K, Tanimoto R, Sasaki K, Kawahara-Miki R, Kono T, Hayashi K, Hirao Y & Obata Y 2016 Complete in vitro generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113** 9021-9026.
- Nagai S, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Kasai T, Yokota S, Shitara H, Yonekawa H & Hoshi K 2006 Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. *Tohoku J Exp Med* **210** 137-144.
- Nagaraj R, Sharpley MS, Chi F, Braas D, Zhou Y, Kim R, Clark AT & Banerjee U 2017 Nuclear Localization of Mitochondrial TCA Cycle Enzymes as a Critical Step in

- Mammalian Zygotic Genome Activation. *Cell* **168** 210-223 e211.
- Naillat F, Saadeh H, Nowacka-Woszek J, Gahurova L, Santos F, Tomizawa SI & Kelsey G 2021 Oxygen concentration affects de novo DNA methylation and transcription in in vitro cultured oocytes. *Clin Epigenetics* **13** 132.
- Neeman M, Abramovitch R, Schiffenbauer YS & Tempel C 1997 Regulation of angiogenesis by hypoxic stress: from solid tumours to the ovarian follicle. *Int J Exp Pathol* **78** 57-70.
- Noda Y, Goto Y, Umaoka Y, Shiotani M, Nakayama T & Mori T 1994 Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's medium under low oxygen tension and low illumination. *Fertil Steril* **62** 1022-1027.
- Ota S, Ikeda S, Takashima T & Obata Y 2021 Optimal conditions for mouse follicle culture. *J Reprod Dev.*
- Ou-Yang H, Wu SC, Sung LY, Yang SH, Yang SH, Chong KY & Chen CM 2021 STAT3 Is an Upstream Regulator of Granzyme G in the Maternal-To-Zygotic Transition of Mouse Embryos. *Int J Mol Sci* **22**.
- Oulad-Abdelghani M, Bouillet P, Decimo D, Gansmuller A, Heyberger S, Dolle P, Bronner S, Lutz Y & Chambon P 1996 Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by Stra8, a novel retinoic acid-responsive gene. *J Cell Biol* **135** 469-477.
- Pabon JE, Jr., Findley WE & Gibbons WE 1989 The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil Steril* **51** 896-900.
- Paillisson A, Dade S, Callebaut I, Bontoux M, Dalbies-Tran R, Vaiman D & Monget P 2005 Identification, characterization and metagenome analysis of oocyte-specific genes organized in clusters in the mouse genome. *BMC Genomics* **6** 76.
- Park JI, Hong JY, Yong HY, Hwang WS, Lim JM & Lee ES 2005 High oxygen tension during in vitro oocyte maturation improves in vitro development of porcine oocytes after fertilization. *Anim Reprod Sci* **87** 133-141.
- Pepling ME & Spradling AC 1998 Female mouse germ cells form synchronously dividing

- cysts. *Development* **125** 3323-3328.
- Pepling ME & Spradling AC 2001 Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev Biol* **234** 339-351.
- Pincus G & Enzmann EV 1935 The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in Vivo and in Vitro : I. The Activation of Ovarian Eggs. *J Exp Med* **62** 665-675.
- Pinyopummintr T & Bavister BD 1995 Optimum gas atmosphere for in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* **44** 471-477.
- Qin Y, Choi Y, Zhao H, Simpson JL, Chen ZJ & Rajkovic A 2007 NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* **81** 576-581.
- Qin Y, Shi Y, Zhao Y, Carson SA, Simpson JL & Chen ZJ 2009 Mutation analysis of NOBOX homeodomain in Chinese women with premature ovarian failure. *Fertil Steril* **91** 1507-1509.
- Quinn P & Harlow GM 1978 The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. *J Exp Zool* **206** 73-80.
- Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N & Matzuk MM 2004 NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* **305** 1157-1159.
- Redding GP, Bronlund JE & Hart AL 2008 Theoretical investigation into the dissolved oxygen levels in follicular fluid of the developing human follicle using mathematical modelling. *Reprod Fertil Dev* **20** 408-417.
- Richards JS & Pangas SA 2010 The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest* **120** 963-972.
- Saitou M, Kagiwada S & Kurimoto K 2012 Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development* **139** 15-31.
- Saitou M, Payer B, O'Carroll D, Ohinata Y & Surani MA 2005 Blimp1 and the emergence of the germ line during development in the mouse. *Cell Cycle* **4** 1736-1740.
- Schneider CA, Rasband WS & Eliceiri KW 2012 NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9** 671-675.

- Sha QQ, Yu JL, Guo JX, Dai XX, Jiang JC, Zhang YL, Yu C, Ji SY, Jiang Y, Zhang SY, Shen L, Ou XH & Fan HY 2018 CNOT6L couples the selective degradation of maternal transcripts to meiotic cell cycle progression in mouse oocyte. *EMBO J* **37**.
- Shimamoto S, Nishimura Y, Nagamatsu G, Hamada N, Kita H, Hikabe O, Hamazaki N & Hayashi K 2019 Hypoxia induces the dormant state in oocytes through expression of Foxo3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116** 12321-12326.
- Smitz J, Cortvrindt R & Van Steirteghem AC 1996 Normal oxygen atmosphere is essential for the solitary long-term culture of early preantral mouse follicles. *Mol Reprod Dev* **45** 466-475.
- Sorensen RA & Wassarman PM 1976 Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol* **50** 531-536.
- St John J 2014 The control of mtDNA replication during differentiation and development. *Biochim Biophys Acta* **1840** 1345-1354.
- Sung HJ, Ma W, Wang PY, Hynes J, O'Riordan TC, Combs CA, McCoy JP, Jr., Bunz F, Kang JG & Hwang PM 2010 Mitochondrial respiration protects against oxygen-associated DNA damage. *Nat Commun* **1** 5.
- Suzumori N, Yan C, Matzuk MM & Rajkovic A 2002 Nobox is a homeobox-encoding gene preferentially expressed in primordial and growing oocytes. *Mech Dev* **111** 137-141.
- Takashima T, Fujimaru T & Obata Y 2021 Effect of in vitro growth on mouse oocyte competency, mitochondria and transcriptome. *Reproduction*.
- Tanaka SS & Nishinakamura R 2014 Regulation of male sex determination: genital ridge formation and Sry activation in mice. *Cell Mol Life Sci* **71** 4781-4802.
- Tervit HR, Whittingham DG & Rowson LE 1972 Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil* **30** 493-497.
- Thomas FH & Vanderhyden BC 2006 Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol* **4** 19.

- Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE & Tervit HR 1990 Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J Reprod Fertil* **89** 573-578.
- Tiede LM, Cook EA, Morsey B & Fox HS 2011 Oxygen matters: tissue culture oxygen levels affect mitochondrial function and structure as well as responses to HIV viroproteins. *Cell Death Dis* **2** e246.
- Torre ML, Munari E, Albani E, Levi-Setti PE, Villani S, Faustini M, Conte U & Vigo D 2006 In vitro maturation of human oocytes in a follicle-mimicking three-dimensional coculture. *Fertil Steril* **86** 572-576.
- Tripurani SK, Lee KB, Wang L, Wee G, Smith GW, Lee YS, Latham KE & Yao J 2011a A novel functional role for the oocyte-specific transcription factor newborn ovary homeobox (NOBOX) during early embryonic development in cattle. *Endocrinology* **152** 1013-1023.
- Tripurani SK, Lee KB, Wee G, Smith GW & Yao J 2011b MicroRNA-196a regulates bovine newborn ovary homeobox gene (NOBOX) expression during early embryogenesis. *BMC Dev Biol* **11** 25.
- Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K & Mori T 1992 Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol Reprod Dev* **31** 28-33.
- Van Blerkom J, Davis PW & Lee J 1995 ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* **10** 415-424.
- Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT & Merrill AH, Jr. 1991 Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem* **266** 14486-14490.
- Wang Z, Liu CY, Zhao Y & Dean J 2020 FIGLA, LHX8 and SOHLH1 transcription factor networks regulate mouse oocyte growth and differentiation. *Nucleic Acids Res* **48** 3525-3541.
- Watson AJ, Watson PH, Warnes D, Walker SK, Armstrong DT & Seamark RF 1994 Preimplantation development of in vitro-matured and in vitro-fertilized ovine zygotes: comparison between coculture on oviduct epithelial cell monolayers and

- culture under low oxygen atmosphere. *Biol Reprod* **50** 715-724.
- Wickramasinghe D, Ebert KM & Albertini DF 1991 Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes. *Dev Biol* **143** 162-172.
- Winata CL & Korzh V 2018 The translational regulation of maternal mRNAs in time and space. *FEBS Lett* **592** 3007-3023.
- Xu YN, Shen XH, Lee SE, Kwon JS, Kim DJ, Heo YT, Cui XS & Kim NH 2012 Autophagy influences maternal mRNA degradation and apoptosis in porcine parthenotes developing in vitro. *J Reprod Dev* **58** 576-584.
- Yoon SJ, Kim EY, Kim YS, Lee HS, Kim KH, Bae J & Lee KA 2009 Role of Bcl2-like 10 (Bcl2l10) in Regulating Mouse Oocyte Maturation. *Biol Reprod* **81** 497-506.
- Yuan B, Liang S, Jin YX, Kwon JW, Zhang JB & Kim NH 2016 Progesterone influences cytoplasmic maturation in porcine oocytes developing in vitro. *PeerJ* **4** e2454.
- Zeng HT, Ren Z, Yeung WS, Shu YM, Xu YW, Zhuang GL & Liang XY 2007 Low mitochondrial DNA and ATP contents contribute to the absence of birefringent spindle imaged with PolScope in in vitro matured human oocytes. *Hum Reprod* **22** 1681-1686.
- Zhang K & Smith GW 2015 Maternal control of early embryogenesis in mammals. *Reprod Fertil Dev* **27** 880-896.
- Zitomer NC, Mitchell T, Voss KA, Bondy GS, Pruett ST, Garnier-Amblard EC, Liebeskind LS, Park H, Wang E, Sullards MC, Merrill AH, Jr. & Riley RT 2009 Ceramide synthase inhibition by fumonisin B1 causes accumulation of 1-deoxysphinganine: a novel category of bioactive 1-deoxysphingoid bases and 1-deoxydihydroceramides biosynthesized by mammalian cell lines and animals. *J Biol Chem* **284** 4786-4795.