

マウス体外成熟由来卵子における内在性ミトコンドリア および mtDNA の枯渇化の検討

向井 一俊¹、三谷 匡^{1,2}、安齋 政幸^{1,2}、
細井 美彦^{1,2}、加藤 博己^{1,2}

要 旨

本研究では、マウスにおいて GV 期卵子の体外成熟培養中にミトコンドリア DNA (mtDNA) 複製阻害剤である ddC またはエチジウムブロマイド (EtBr) を作用させて、マウス成熟卵子細胞質内におけるミトコンドリアおよび mtDNA の枯渇化が可能であるかを検討した。PMSG を投与後 46~48 時間目の成熟齢の B6D2F1 雌マウスから GV 期卵子を回収し、0、1、10、100 および 1,000 μ M の ddC または 0、1、5 および 10 μ g/mL の EtBr を添加した mTaM 培地で 16 時間体外成熟させた。ddC は成熟率および成熟卵子における mtDNA のコピー数に影響をおよぼさなかった。1 または 5 μ g/mL の EtBr で成熟した卵子の成熟率は低下する傾向にあり、10 μ g/mL の EtBr と共に成熟培養した卵子は、著しく低い成熟率を示した。5 または 10 μ g/mL の EtBr と共に体外成熟培養したマウス卵子の mtDNA のコピー数は減少する傾向を示した。加えて、この濃度で体外成熟した卵子において、Mito Tracker Red によって染色された内在性ミトコンドリアの蛍光輝度を測定することにより、ミトコンドリア量が著しく枯渇化していることが確認された。以上の結果から、EtBr を添加した培地で体外成熟させたマウス成熟卵子において、ミトコンドリアの枯渇化は可能であることが示された。

キーワード：マウス卵母細胞、ミトコンドリア、ミトコンドリア DNA、EtBr、ddC

1. 緒 論

哺乳類における最初の体細胞核移植によるクローン動物は、1997 年にウィルムットらによって報告された⁽¹⁾。その後、現在までに、マウス、スイギュウ、ラクダ、など様々な動物種⁽²⁾ でクローン個体の作出が報告されている。その一方で、体細胞クローン個体の作出効率はずつか数%と低率のままである。さらに、作出されたクローンマウスでは胎盤の異常が認められている⁽³⁾。しかしながら、ウィルムットらの研究成果⁽¹⁾ は、異種間体細胞核移植 (inter-species somatic cell nuclear transfer, iSCNT) を通じて、絶滅危惧動物や絶滅動物のクローン個体作出の可能性を示した。iSCNT の研究は、卵母細胞を得ることができない絶滅危惧動物および絶滅動物の個体再生に有効な手段として多く研究されてきた。その結果、iSCNT によってムフロン⁽⁴⁾、スナネコ⁽⁵⁾、ガウル⁽⁶⁾ などのクローン個体の作出が報告されている。しかし、その作出効率は同種間体細胞核移植よりもさらに低率である。iSCNT における胚発生の不良は、ドナー核とレシピエント細胞質中のミトコンドリア DNA (mtDNA) の機能的な不適合が原因の一つであると考えられている⁽⁷⁾。ミトコンドリア機能不全に関して、ミトコンドリアにおける呼吸関連遺伝子は、核 DNA と mtDNA に分かれてコードされ、それぞれの DNA から転写翻訳されたタンパク質が呼吸鎖複合体 I~V を形成している。同種間体細胞核移植胚ではそれぞれの DNA から転写翻訳されたタンパク質が

原稿受付 2016 年 2 月 20 日

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科生物工学専攻, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学先端技術総合研究所, 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

複合体を形成し、ATP合成を可能にしている。しかし、iSCNT由来胚では、それぞれのDNAから転写翻訳されたタンパク質の構造が異なるため、複合体が形成できず、ATP合成不良になった結果、胚発生の不良につながると考えられている⁽⁷⁾。近年、ddCを用いてレシピエント細胞質であるブタ卵母細胞のミトコンドリアを枯渇化させた後、ドナー核であるマウス胎児由来線維芽細胞と同種由来のES細胞抽出物をドナー核と共に注入すると、異種間核移植胚の発生が改善されたことがJiangらによって報告された⁽⁸⁾。

本実験では、マウス卵子をレシピエント細胞質としたiSCNTを行う前段階として、ddCもしくはEtBrを用いてマウス卵子細胞質のミトコンドリアおよびmtDNAの枯渇化を検討した。

2. 材料と方法

本実験では、成熟齢に達したB6D2F1雌マウス（日本エスエルシー株式会社）を使用した。なお、実験に際して、実験の立案や実験動物に関する取り扱いについては、近畿大学動物実験規程に準じて実施した。

GV期卵の回収および体外成熟培養

成熟齢に達したB6D2F1雌マウスにPMSG（あすか製薬）を7.5IU腹腔内投与後、46～48時間目に頸椎脱臼により屠殺し、卵巣を回収した。回収した卵巣は、0.1%ヒアルロニダーゼ（Sigma-Aldrich）を含むmCZB-HEPES培地に移し、26Gの注射針を用いて細切し、GV期卵子を回収した⁽⁹⁾。GV期卵子の裸化用のガラスキャピラリーを用いて卵丘細胞を除去した。裸化したGV期卵子の一部はDNA抽出に用い、残りは50 μ Lの液滴に各濃度のddC（Sigma-Aldrich）またはEtBr（nacalaitesque）を添加したmTaM培地で3回洗浄し、新鮮なddCもしくはEtBr添加mTaM培地で16時間体外成熟培養した。mTaM培地の調製は、 α MEMとTYHを1:1になるように混合し、非動化済みのFBSを溶液中の濃度が5%になるように加えて作製した⁽¹⁰⁾。mTaM培地へのddC添加濃度はそれぞれ0 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1,000 μ Mとした。また、mTaM培地へのEtBr添加濃度はそれぞれ0、1、5、10 μ g/mLとした。体外成熟培養16時間後に第1極体の放出が確認された卵子を成熟卵子（MII期卵子）とした。

GV期卵子およびMII期卵子を用いたDNA抽出

0.2mL PCRチューブ①に、20 μ LのTris-EDTA-NaCl、20 μ Lの10%SDS（Sigma-Aldrich）と10 μ LのProteinase K（nacalaitesque）を混合した溶液を作製し、GV期もしくは、MII期卵子を各5個加えて55 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。その後RNase Aを1 μ L加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートし、RNAを分解した。DNA溶液が入った0.2mL PCRチューブ①にTE飽和フェノール（nacalaitesque）を50 μ L加え、室温で15分間転倒混和して、室温、17,400 \times G、10分間遠心し、上清を新しい1.5mLチューブ②に移した。TE飽和フェノールと少量のDNA溶液が残った0.2mL PCRチューブ①に滅菌したMilli-Q水（以下Milli-Q水と表記）を15 μ L加えて再度、室温、17,400 \times G、10分間遠心し、上清を先ほどと同じ1.5mLチューブ②に回収した。この操作を3回繰り返した。その後DNA溶液が入った1.5mLチューブ②にフェノールを50 μ L、クロロホルム（nacalaitesque）を50 μ L加え、室温で15分間転倒混和して、室温、6,000 \times G、10分間遠心し、上清を新しい1.5mLチューブ③に移した。フェノールとクロロホルムの混合液と少量のDNA溶液が残った1.5mLチューブ②にMilli-Q水を30 μ L加えて再度、室温、6,000 \times G、10分間遠心し、上清を先ほどと同じ1.5mLチューブ③に回収した。この操作を3回繰り返した。次いでクロロホルムを200 μ L加え、室温で15分間転倒混和して、室温、17,400 \times G、10分間遠心し、上清を新しい2mLチューブ④に移した。クロロホルムと少量のDNA溶液が残った1.5mLチューブ③にMilli-Q水を75 μ L加えて再度、室温、17,400 \times G、10分間遠心し、上清を先ほどと同じ2mLチューブ④に回収し

た。この操作を3回繰り返した。DNA溶液 400 μ L に対して 10 μ L の 3M Na-acetate、1 μ L のグリコーゲン (Roche) と 1mL の 99.5%エタノール (nacalaitesque) を加えて混和し、-80 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。4 $^{\circ}$ C、17,400 \times G で 20 分間遠心し、上清を慎重に除去した。70%エタノールを 700 μ L 加え沈殿物を洗い、4 $^{\circ}$ C、17,400 \times G で 10 分間遠心し、慎重に上清を除去した。DNA の沈殿物を、真空乾燥機を用いて乾燥させ、Tris-EDTA 溶液 (pH8.0) 20 μ L に溶解してリアルタイム PCR に用いた。

リアルタイム PCR による mtDNA のコピー数の計測

リアルタイム PCR 反応は、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (タカラバイオ) を用い、Milli-Q 水を 8.5 μ L、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] を 12.5 μ L、GV 期卵子および MII 期卵子から抽出した DNA 溶液を 2 μ L、各 Primer を 1 μ L ずつ加え、全量を 25 μ L にした反応液で行った。使用した Primer と反応温度条件は表 1 および図 1 に示した。リアルタイム PCR 反応は Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ) を用いて計測した。

表 1. マウス cytochrome *b* 遺伝子の特異的に増幅する Primer Set

Primer	Tm 値	塩基配列 (5'-3')
Forward	55.7	TACTAGGAGACCCAGACAAC
Reverse	63.1	AGATGGAGGCTAGTTGGCC

Jiang Y *et al.*, 2011 より引用

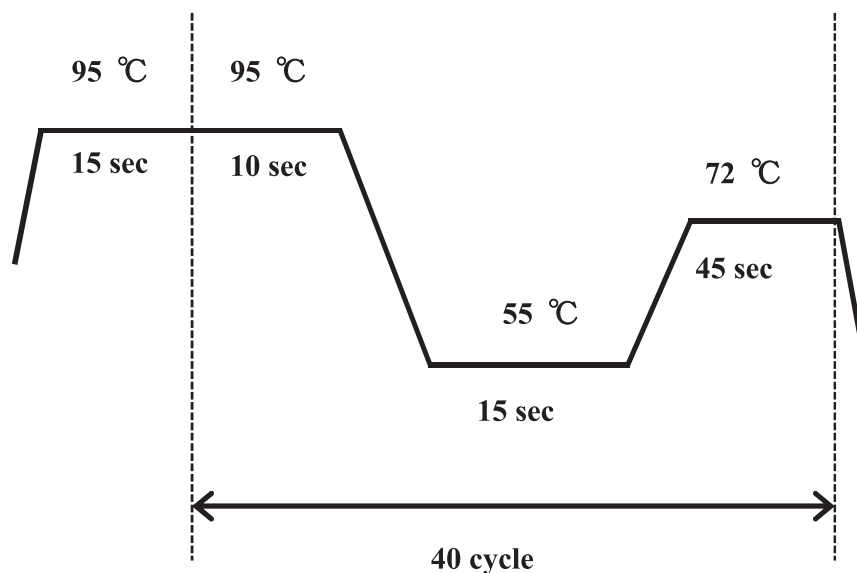


図 1. マウス cytochrome *b* 遺伝子の特異的に増幅する Primer Set を用いた PCR の反応温度条件

Mito Tracker Red 染色によるミトコンドリアの蛍光輝度測定

ddC または EtBr を添加した mTaM 培地で体外成熟させた MII 期卵子を 25nM の Mito Tracker Red (Invitrogen) を含む mKSOM 培地で 10 分間染色した。染色後 mKSOM 培地で 3 回洗浄し、3.7%パラホ

ルムアルデヒドおよび 3mg/mL PVP (和光純薬工業, ポリビニルピロリドン K90) を含む PBS 溶液で固定した。固定後の卵子をスライドガラス上に移し、VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI (VECTOR LABORATORIES) を 5 μ L 滴下してカバーガラスを被せて封入し、蛍光顕微鏡 (Leica DMI 6000B) を用いて蛍光輝度測定を行った。

統計学的処理

本実験におけるすべての統計学的解析には、*t* 検定を用いた。なお、統計学的有意差は、5%水準未満とした。

3. 結 果

表 2 および 3 には、体外成熟培地へ ddC または EtBr を添加したマウス卵子を用いた体外成熟結果を示した。各濃度の ddC を添加した体外成熟培地においてマウス GV 期卵子を体外成熟培養した結果、各試験区とも成熟率は 81~87% で有意な差はなかった (表 2)。これに対して、1 または 5 μ g/mL の濃度で EtBr を添加した体外成熟培地で体外成熟培養を行うと、成熟率が低下する傾向がみられた (表 3)。また、EtBr を 10 μ g/mL の濃度で添加した体外成熟培地で体外成熟培養を行うと、マウス GV 期卵子は成熟せず、EtBr 無添加または、1 または 5 μ g/mL の濃度で EtBr を添加した体外成熟培地で体外成熟培養を行った卵子と比較して有意に ($P < 0.05$) 成熟率が低下した。

表 2. 体外成熟培地へ ddC を添加したマウス卵子の体外成熟成績

ddC 添加濃度	GV 期卵子数 ^a	M II 期卵子数 ^b (%) ^c
0 μ M	202	172 (85)
1 μ M	231	194 (84)
10 μ M	200	174 (87)
100 μ M	202	170 (84)
1,000 μ M	216	174 (81)
n = 3		c = b/a \times 100

表 3. 体外成熟培地へ EtBr を添加したマウス卵の体外成熟成績

EtBr 添加濃度	GV 期卵子数 ^a	M II 期卵子数 ^b (%) ^c
0 μ g/mL	52	47 (90) [†]
1 μ g/mL	70	58 (83) [†]
5 μ g/mL	67	47 (70) [†]
10 μ g/mL	62	2 (3) ^{††}
n = 3		c = b/a \times 100、 [†] , ^{††} : $P < 0.05$

各濃度の ddC または EtBr 添加体外成熟培地により体外成熟させたマウス MII 期卵子の mtDNA の計測結果を図 2 および 3 に示した。ddC を各濃度で添加したすべての実験区で、ddC を添加しない体外成熟培地によって成熟させたマウス MII 期卵子の mtDNA のコピー数と有意な差は見られなかった (図 2)。EtBr を 5 または 10 μ g/mL の濃度で添加した体外成熟培地により体外成熟を行った卵子では、mtDNA のコピー数が減少する傾向にあった (図 3)。

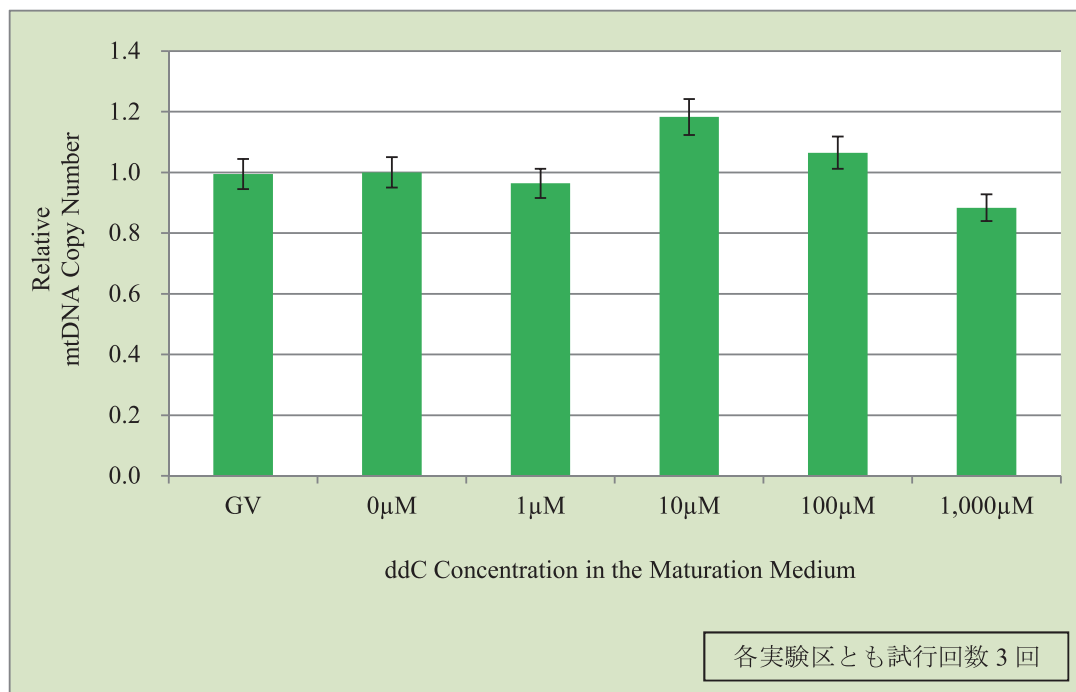


図 2. 各濃度の ddC 添加培地で成熟させたマウス体外成熟卵子の mtDNA コピー数の計測

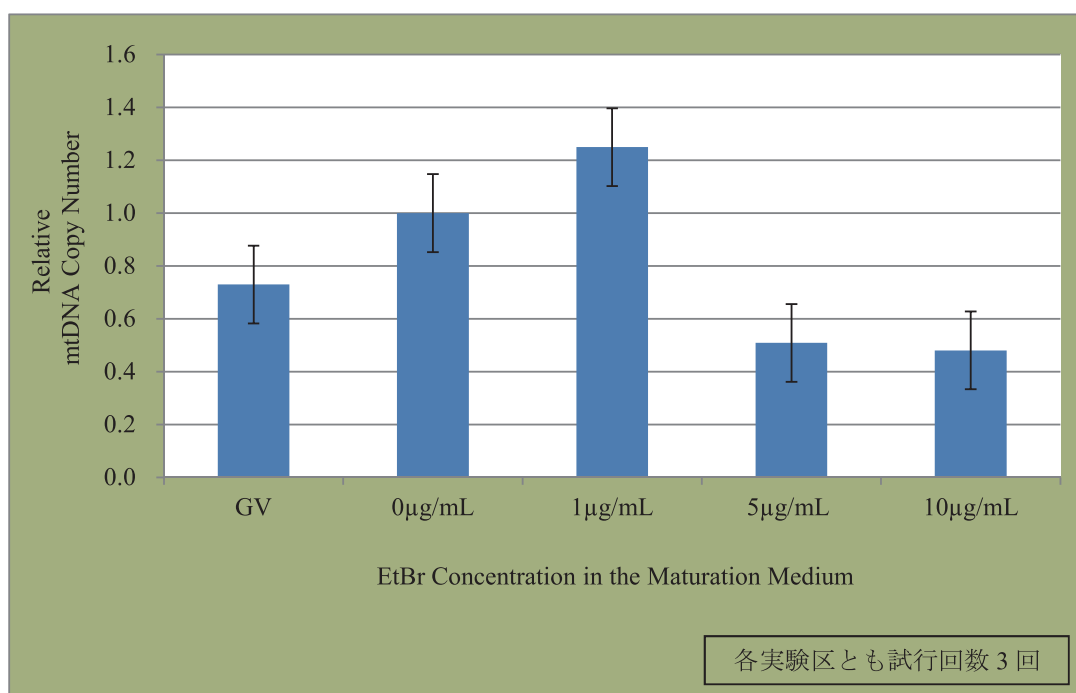


図 3. 各濃度の EtBr 添加培地で成熟させたマウス体外成熟卵子の mtDNA コピー数の計測

各濃度の ddC または EtBr 添加体外成熟培地により体外成熟させたマウス MII 期卵子を用いた Mito Tracker Red 染色によるミトコンドリアの蛍光輝度測定の結果を表 4 および 5 に示した。ddC を各濃度で添加した体外成熟培地により体外成熟させたすべての実験区で蛍光輝度に差は見られなかった (表 4)。一方、EtBr を 5 または 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加した体外成熟培地により体外成熟培養を行った卵子では、EtBr を添加しなかった体外成熟培地により体外成熟培養を行った卵子と比べて、蛍光輝度が有意に減少した (表 5, $P < 0.05$)。

表 4. 各濃度の ddC 添加体外成熟培地を用いて成熟させたマウス体外成熟卵子細胞質内における Mito Tracker Red 染色によるミトコンドリアの蛍光輝度測定成績

ddC 添加濃度	Mean \pm S.D.
0 μM	2,218 \pm 225
1 μM	2,361 \pm 207
10 μM	2,196 \pm 180
100 μM	2,351 \pm 171
1,000 μM	2,068 \pm 338

n = 3

表 5. 各濃度の EtBr 添加体外成熟培地を用いて成熟させたマウス体外成熟卵子細胞質内における Mito Tracker Red 染色によるミトコンドリアの蛍光輝度測定成績

EtBr 添加濃度	Mean \pm S.D.
0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2,069 \pm 136 [†]
1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2,278 \pm 114 [†]
5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1,234 \pm 459 ^{††}
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1,226 \pm 328 ^{††}

n = 3

[†], ^{††}: $P < 0.05$

4. 考 察

本実験では、成熟齢に達した B6D2F1 系統の雌マウスから採取した卵子を用いて体外成熟培養中の ddC または EtBr 処理による mtDNA およびミトコンドリアへの影響を調べた。

各濃度で ddC 処理を行った体外成熟卵子において、成熟率に差は見られなかった。これは、ddC が体外成熟率に影響を与えないという Ge らの報告⁽¹¹⁾と同様の結果であった。

5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で EtBr を添加した体外成熟培地で体外成熟を行うと、マウス卵子の成熟率が低下する傾向にあった。成熟率の低下は、EtBr 処理によって体外成熟卵子のミトコンドリアが枯渇化した結果、

ATP 産生量が不足し、第一極体の放出を妨げたことが一因として考えられる⁽¹²⁾。

本実験においては、以前の報告^(8, 11, 13)と異なり、ddC を添加した体外成熟培地で体外成熟させても M II 期卵子における mtDNA の枯渇化はできなかった。その理由として、Ge らは 4 ~ 6 週齢の ICR 系のマウスから回収された未成熟卵子を用いて実験を行った⁽¹¹⁾のに対して、本実験では 8 週齢以上の BDF1 マウスから回収された未成熟卵子を用いて実験を行ったことに起因すると考えられる。ddC は、DNA が複製される際に、複製中の DNA 鎖に取り込まれるとそこで DNA 複製が停止するヌクレオシド類似体である。このため、ddC の体外成熟培地への添加が成熟卵子中の mtDNA のコピー数に影響を及ぼすには、mtDNA の複製が進行している段階で ddC が作用する必要がある。Ge らの場合は、幼若なマウスに由来する未成熟卵子であったため、卵子中の mtDNA は複製が進行中であり、体外成熟培地への ddC の添加が、ddC 無添加で体外成熟させた卵子中の mtDNA のコピー数と比較して有意に少ない mtDNA のコピー数となった。一方本実験では、8 週齢以上と十分に性成熟した BDF1 マウスに由来する未成熟卵子を用いたため、卵子中の mtDNA は複製がほぼ終了していたと考えられる。リアルタイム PCR の結果からも、体外成熟培養を開始する前のマウス GV 期卵子内には、体外成熟培養して得られた M II 期卵子に対して、mtDNA のコピー数がすでに 80% 以上存在していた (図 2 および 3)。また、マウス卵子の体外成熟にかかる時間 (16 時間) が Spikings ら⁽¹³⁾ および Jiang ら⁽⁸⁾ の実験におけるブタ卵子の体外成熟にかかる時間 (42 時間) の半分以下であったため、ddC による mtDNA 複製阻害作用が弱かった可能性も考えられた。

EtBr を 5 または 10 μ g/mL の濃度で添加した体外成熟培地で体外成熟培養を行った卵子では、mtDNA のコピー数が減少する傾向にあった。EtBr 添加培地でヒト肺ガン細胞を培養すると、ミトコンドリア特異的オートファジーが起きることが報告⁽¹⁴⁾されており、本実験においても、EtBr 添加培地で体外成熟培養を行うことでオートファジーが誘発され、ミトコンドリアの分解と共に mtDNA が分解されたのではないかと考えられた。また、EtBr は、mtDNA を特異的に複製するポリメラーゼ γ の活性を阻害することも知られており⁽¹⁵⁾、mtDNA の複製阻害とミトコンドリア選択的分解の結果、ミトコンドリアの枯渇化が生じたと考えられた。

以上のことから、マウス未成熟卵子を用いた体外成熟操作過程において、EtBr を 5 または 10 μ g/mL の濃度で添加した体外成熟培地の使用は、ミトコンドリア特異的オートファジーが生じ、ミトコンドリアが分解された可能性が示唆された。

5. 結 論

本実験では、マウス卵子の体外成熟培地に mtDNA 複製阻害剤である ddC もしくは EtBr を添加して用いることにより、マウス体外成熟由来卵子のミトコンドリアおよび mtDNA の枯渇化が可能か検討した。ddC 処理によって mtDNA の複製阻害は可能であったが、ミトコンドリアおよび mtDNA の枯渇化はできなかった。5 μ g/mL 以上の濃度の EtBr 処理によって未成熟卵子の成熟は阻害され、体外成熟した卵子細胞質内 mtDNA の枯渇化の可能性およびミトコンドリアの枯渇化が可能であることが示唆された。

6. 参考文献

1. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.
2. Verma G., Arora J.S., Sethi R.S., Mukhopadhyay C.S., Verma R. (2015) Handmade cloning: recent advances, potential and pitfalls. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6: 43, doi: 10. 1186/s40104-015-0043-y.

- 3 . Tanaka S., Oda M., Toyoshima Y., Wakayama T., Tanaka M., Yoshida N., Hattori N., Ohgane J., Yanagimachi R., Shiota K. (2001) Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer. *Biol. Reprod.* 65, 1813–1821.
- 4 . Loi P., Ptak, G., Barboni B., Fulka, J. Jr, Cappai P., Clinton M. (2001) Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 962–964.
- 5 . Gomez M.C., Pope C.E., Kutner R.H., Ricks D.M., Lyons L.A., Ruhe M., Dumas C., Lyons J., Lopez M., Dresser B.L., Reiser J. (2008) Nuclear transfer of sand cat cells into enucleated domestic cat oocytes is affected by cryopreservation of donor cells. *Cloning Stem Cells* 10, 469–483.
- 6 . Srirattana K., Imsoonthornruksa S., Laowtammathron C., Sangmalee A., Tunwattana W., Thongprapai T., Chaimongkol C., Ketudat-Cairns M., Parnpai R. (2012) Full-term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of trichostatin A treatment. *Cell. Reprogram.* 14, 248–257.
- 7 . Lagutina I., Fulka H., Lazzari G., Galli C. (2013) Interspecies somatic cell nuclear transfer: advancements and problems. *Cell. Reprogram.* 15, 374–384.
- 8 . Jiang Y., Kelly R., Peters A., Fulka H., Dickinson A., Mitchell D.A., St. John J.C. (2011) Interspecies somatic cell nuclear transfer is dependent on compatible mitochondrial DNA and reprogramming factors. *PLoS One.* 6, e14805.
- 9 . Ishizuka Y., Nishimura M., Matsumoto K., Miyashita M., Takeo T., Nakagata N., Hosoi Y., Anzai M. (2013) The influence of reduced glutathione in fertilization medium on the fertility of in vitro-matured C57BL/6 mouse oocytes. *Theriogenology* 80, 421–426.
- 10 . 佐東春香、西村愛美、森田真裕、古田祐奈、柳 美穂、安齋政幸 (2009) 近交系 C57BL/6 マウスの未成熟卵子を用いた体外成熟及び発生能の検討. *実験動物技術* 44, 43–48.
- 11 . Ge H., Tollner T.L., 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.
- 12 . Chiaratti M.R., Ferreira C.R., Perecin F., Méo S.C., Sangalli J.R., Mesquita L.G., de Carvalho Balieiro J.C., Smith L.C., Garcia J.M., Meirelles F.V. (2011) Ooplast-mediated developmental rescue of bovine oocytes exposed to ethidium bromide. *Reprod. Biomed. Online.* 22, 172–183.
- 13 . Spikings E.C., Alderson J., St. John J.C. (2007) Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. *Biol. Reprod.* 76, 327–335.
- 14 . Luo Y., Hu Y., Zhang M., Xiao Y., Song Z., Xu Y. (2013) EtBr-induced selective degradation of mitochondria occurs via autophagy. *Oncol. Rep.* 30, 1201–1208.
- 15 . Naviaux R.K., Markusic D., Barshop B.A., Nyhan W.L., Haas R.H. (1999) Sensitive assay for mitochondrial DNA polymerase gamma. *Clin. Chem.* 45, 1725–1733.

英文抄録

Investigation of endogenous mitochondria and mtDNA depletion in mouse
in vitro matured oocytesKazutoshi Mukai¹, Tasuku Mitani^{1,2}, Masayuki Anzai^{1,2},
Yoshihiko Hosoi^{1,2}, Hiromi Kato^{1,2}

Abstract

In this study, we examined the depletion of mitochondria and mitochondria DNA (mtDNA) by using mtDNA replication inhibitors, 2', 3'-Dideoxycytidine (ddC) or Ethidium Bromide (EtBr) while oocyte maturation *in-vitro* in mouse matured oocyte. GV stage oocytes were collected from mature B6D2F1 female mice and matured for 16hours *in-vitro* in mTaM medium supplemented with 0, 1, 10, 100 and 1,000 μ M ddC or 0, 1, 5 and 10 μ g/mL EtBr. There was no effect of ddC on oocyte maturation rate and the copy number of mtDNA in matured oocytes. There was decreasing tendency of oocyte maturation in oocytes matured with 1 or 5 μ g/mL EtBr and oocyte maturation was significantly decreased in oocytes matured with 10 μ g/mL EtBr ($P < 0.05$). The copy number of mtDNA in mouse matured oocytes with 5 or 10 μ g/mL EtBr showed also decreasing tendency. In addition, the significant depletion of mitochondria in mouse matured oocytes with 5 or 10 μ g/mL EtBr was confirmed by the fluorescence brightness measurement of mitochondria staining by Mito Tracker Red. From these results, it was suggested that the depletion of mitochondria and mtDNA in mouse matured oocyte is possible by maturing mouse oocyte *in-vitro* in EtBr supplemented culture medium.

Key Word: mouse oocyte, mitochondria, mitochondria DNA, EtBr, ddC

-
1. Division of Biological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University. Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan
 2. Institute of Advanced Technology, Kindai University. Kainan, Wakayama, 624-0017, Japan