

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17905

研究課題名(和文) 卵母細胞の減数分裂過程におけるオルガネラの動態解析

研究課題名(英文) Organelle dynamics during meiotic maturation of mouse oocytes

研究代表者

若井 拓哉 (Wakai, Takuya)

岡山大学・環境生命科学研究所・准教授

研究者番号：60557768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：卵母細胞は、生涯で排卵まで至る数に限りがあり、また加齢に伴い品質低下することが広く知られている。卵の品質低下には、ミトコンドリアなどのオルガネラの機能不全が関与する研究結果が多数報告されているが、そのメカニズムは未だ解明されていない。本研究では、マウス卵母細胞におけるオルガネラの動態に着目し、減数分裂時のミトコンドリアと小胞体の動態制御機構を明らかにした。また、ミトコンドリアと小胞体はCa²⁺を介した情報伝達により卵母細胞の機能を支え、これらオルガネラの動態は正常な減数分裂や受精の遂行に重要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のライフスタイルの変化により、女性の晩婚化・晩産化が進行し、我が国を含む先進国を中心に不妊治療の需要が高まっている。しかし、高齢で出産を希望する時点で、すでに卵母細胞の品質は低下し、体外受精した胚が発生停止する問題が生じている。本研究では、受精や胚発生といった生命の始まりを支える卵母細胞の品質を制御するメカニズムとして、ミトコンドリアや小胞体などのオルガネラに着目し、その制御機構や生理機能の一端を明らかにした。本研究で得られた知見から不妊治療への糸口が見出される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Ovarian ageing is characterized by quantitative and qualitative alteration of the ovarian oocyte. Mitochondria and other organelles could be the main factors determining oocyte quality adversely affected by ageing. In the present study, we focus on the organelle dynamics during oocyte maturation and fertilization. Mitochondria and endoplasmic reticulum (ER) underwent a spatial redistribution during meiotic maturation. We found organelle dynamics are co-ordinately controlled during meiotic maturation. In addition, we demonstrate that mitochondria take up Ca²⁺ from the ER, and increase the ATP levels of oocytes. Our results suggest organelle dynamics could underpin the successful meiotic maturation and fertilization.

研究分野：動物生殖科学

キーワード：卵母細胞 オルガネラ ミトコンドリア 小胞体 カルシウムシグナリング 受精 加齢 マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵母細胞は、生涯で排卵まで至る数に限りがあり、また加齢に伴い品質低下することが広く知られている。卵の品質低下には、ミトコンドリアなどの細胞小器官(オルガネラ)の機能不全が関与する研究結果が多数報告されているが、そのメカニズムは未だ解明されていない。オルガネラ機能の理解は、ヒトや家畜で卵母細胞を活用する体外受精や顕微授精などの生殖補助技術の向上に繋がると考えられる。これまで我々は、マウス卵細胞におけるミトコンドリアや小胞体の動態を解析してきた。減数分裂時、ミトコンドリアは紡錘体の周囲に凝集し、小胞体は卵表層に顕著なクラスターを形成する等の、体細胞分裂では見られない時空間変化が起こることが明らかとなっている。これらミトコンドリアや小胞体の細胞内局在の役割は未だ不明であるが、ATP や Ca^{2+} を通して、減数分裂や受精を遂行する卵母細胞の機能を支えると予想される。

2. 研究の目的

本研究では、卵母細胞オルガネラの動態制御機構と局在が持つ生理機能の解明を目指す。

(1) オルガネラの動態制御機構の解明

細胞骨格による動態制御：減数分裂時の細胞極性には、細胞骨格である F-アクチンが関与する。ここでは、アクチン重合を制御する Formin2 と Arp2/3 複合体、および F-アクチン上を移動するモータータンパクである Myosin2 に着目する。減数分裂過程におけるオルガネラの動態が、F-アクチンを介してどのように制御されるかを明らかにする。

ミトコンドリア融合分裂による動態制御：ミトコンドリアは動的なオルガネラであり、独自に融合と分裂を行うことが知られている。ミトコンドリアの分裂を制御する Dynamin-related protein 1(Drp1) は、細胞質からミトコンドリアへと動員され、伸長したミトコンドリアを断片化する。卵母細胞のミトコンドリアは、高度に断片化して細胞質中に分散しており、Drp1 を介したミトコンドリア分裂の役割を解明する必要がある。

(2) ミトコンドリアと小胞体の局在が果たす生理機能

ミトコンドリア凝集の生理機能：減数分裂時の紡錘体周囲へのミトコンドリアの局所的凝集は紡錘体形成に重要と報告されているが、その詳細は不明である。そこで、ミトコンドリアの凝集に伴って紡錘体周囲でどのような ATP 濃度の変化が生じるかを明らかにする。

小胞体の Ca^{2+} リザーバーとしての役割：小胞体は細胞内における Ca^{2+} の主要な貯蔵器官であり、小胞体から卵細胞質に放出された Ca^{2+} は発生開始の原動力となる。哺乳動物の受精では、 Ca^{2+} オシレーションとよばれる反復性の Ca^{2+} 濃度の上昇が数時間にわたって継続する。小胞体は受精時にミトコンドリアの近傍に局在することが報告されており、 Ca^{2+} を介したミトコンドリアとの相互作用について明らかにする。

(3) 加齢卵におけるオルガネラの局在

ヒトの不妊治療では、加齢による卵母細胞の品質低下が問題視されている。加齢卵では、染色体異常が増加するだけでなく、ミトコンドリアや小胞体の局在異常が高頻度で観察されるが、異常が起きるプロセスは不明であり、受精やその後の発生との因果関係も十分に検証されていない。ここでは、加齢マウス由来の卵母細胞を用いて、減数分裂時のオルガネラ動態の正常性を評価する。また動態に異常が観察された場合、受精能や胚発生能との因果関係を検討する。

3. 研究の方法

(1) オルガネラのライブセルイメージング

オルガネラの動態解析に、ライブセルイメージングは極めて有効な手法である。本研究では、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ミトコンドリアと小胞体の三次元タイムラプス画像を取得し動態解析を行う。両オルガネラの可視化には、オルガネラ局在化シグナルを付加した蛍光タンパク質を卵母細胞内に発現させて行った(図1)。

F-アクチンの制御因子である Formin2 および Arp2/3 複合体を siRNA によるノックダウン阻害を行い、卵母細胞における F-アクチンを Phalloidin 標識プローブにより評価した。また、Myosin2 を制御するミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) の機能阻害として、特異的阻害剤である ML-7 を用いた。各分子の阻害卵と正常卵において、減数分裂過程におけるミトコンドリアと小胞体の動態を比較し、F-アクチンのオルガネラ動態への関与を検討した。ミトコンドリアの分裂因子 Drp1 に対して、標的タンパク質を特異的に分解する方法として開発された Trim-Away 法を用いて機能阻害を行った。Drp1 阻害卵の減数分裂過程をライブセルイメージングにより解析し、ミトコンドリア分裂の役割を検討した。

(2) オルガネラの局在化が果たす生理機能の解析

ミトコンドリアの動態に付随する ATP 濃度の変化は、リアルタイムでの解析が望ましい。また凝集領域における ATP には、局所的な ATP 濃度の解析が必要となる。そこで本実験では、高い時間・空間分解能を持つ ATP 濃度の解析手法として確立された蛍光タンパク質プローブ ATeam を用いて、減数分裂時の ATP の蛍光イメージングを試みた。

小胞体から放出される Ca^{2+} がミトコンドリアへと伝達されるか検証するために、ミトコン

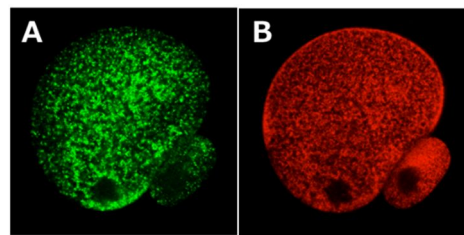


図1. 卵母細胞におけるミトコンドリア(A)と小胞体(B)の細胞内分布。

ドリア移行シグナルを持った ratiometric pericam Ca²⁺ (pericam-mito) プローブを用いて、ミトコンドリア内の Ca²⁺濃度測定を行った。

(3) 加齢卵におけるオルガネラの局在解析

予め繁殖能力の正常性が確認された約 50 週齢の雌マウスから卵母細胞を採取した。減数分裂時のミトコンドリアや小胞体の細胞内分布を解析し、加齢卵におけるオルガネラ局在の特性を評価した。またオルガネラの局在と発生能との因果関係を検討するため、解析後の卵に体外受精を行い、受精率とその後の発生率を調査した。

4. 研究成果

(1) オルガネラの動態制御機構

Formin2 と Arp2/3 のノックダウン実験により効果的に mRNA レベルを低下させたが、これらのタンパク質が比較的分解速度の遅いタンパク質であるためか、タンパク質レベルでは十分に阻害することができなかった。一方、MLCK の阻害剤である ML-7 で処理した卵母細胞では、卵表層の F-actin 分布が著しく不連続となり、正常卵で形成される小胞体の表層クラスターが減少した。したがって、MLCK を介した卵表層アクトミオシン構造が小胞体の局在に重要であることが分かった。

Trim-Away 法により卵母細胞でミトコンドリア分裂因子 Drp1 タンパク質の分解に成功した(図 2A)。DRP1 欠損卵では顕著なミトコンドリアの凝集が観察された(図 2B)。興味深いことに、Drp1 欠損卵では、小胞体や F-アクチンの分布異常が観察されことから、ミトコンドリアの動態は、他のオルガネラの正常な細胞内局在に重要であることが示唆された。

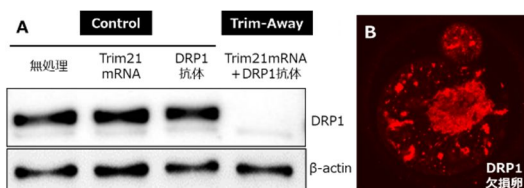


図2. (A)Trim-Away 法による DRP1 タンパク質の分解。(B)DRP1 欠損卵におけるミトコンドリアの凝集 (未発表データ)。

(2) オルガネラの局在と生理機能

ミトコンドリアの紡錘体周囲への凝集と ATP 濃度の関係を明らかにするために、ATeam を用いて減数分裂過程の ATP 蛍光イメージングを行った結果、第一極体の放出前に、一過性の ATP 濃度の上昇が観察された。紡錘体形成には多数のキナーゼやモータータンパク質等が関与するため、ミトコンドリアでの ATP 生産が寄与している可能性が考えられる。

近年の研究から、ミトコンドリアと小胞体の接触領域 (Mitochondria-associated ER membrane : MAM) が、Ca²⁺シグナルの調節、ミトコンドリアの動態や代謝制御、アポトーシスといった多様な細胞機能に関与することが、体細胞を用いた研究から分かってきた。マウス卵の Ca²⁺オシレーション過程におけるミトコンドリア Ca²⁺濃度の変化を解析した結果、規則的なミトコンドリア Ca²⁺濃度の上昇が 10~20 分の間隔で起こることが明らかになった(図 3)。また、小胞体から放出された Ca²⁺オシレーションはミトコンドリア内へ取り込まれ、ミトコンドリアの ATP 生産に寄与していることが明らかとなり、卵母細胞において MAM を介した Ca²⁺情報伝達が生理機能を発揮していることが示された。

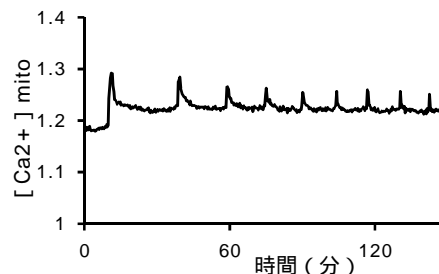


図3. 受精時のミトコンドリアCa²⁺オシレーション

(3) 加齢マウス卵母細胞におけるオルガネラの局在 48~56 週齢の加齢マウスから採取した卵母細胞のミトコンドリアと小胞体の細胞内分布を解析したところ、両オルガネラの顕著な凝集が観察された(図 4)。また、これらの卵では受精率や発生率の低下が確認された。

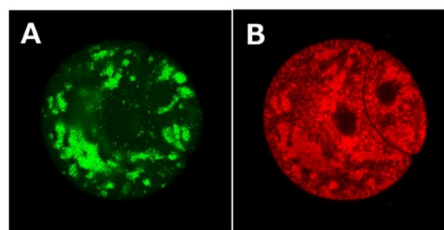


図4. 加齢マウスの卵におけるミトコンドリア(A)と小胞体(B)では、図1の正常卵と比較し、オルガネラの局在異常が観察される(未発表データ)。

以上の結果から、卵母細胞におけるミトコンドリアと小胞体の動態は正常な減数分裂や受精の遂行に重要であることが示された。また、二つのオルガネラ間において Ca²⁺を介した情報伝達が生理機能を発揮していることが明らかとなり、今後は MAM の詳細な役割を解析する必要がある。さらに、解析は不十分であるものの、加齢に伴う卵母細胞の品質低下に、オルガネラの局在異常が関与する可能性が示唆された。近年のライフスタイルの変化により、女性の晩婚化・晩産化が進行し、我が国を含む先進国を中心に不妊治療の需要が高まっている。しかし、高齢で出産を希望する時点で、すでに卵母細胞の品質は低下し、体外受精した胚が発生停止する問題が生じている。卵母細胞におけるオルガネラ動態・機能の重要性を示した本研究の研究成果は、この問題を解決する糸口となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wakai Takuya, Mehregan Aujan, Fissore Rafael A.	4. 巻 11
2. 論文標題 Ca ²⁺ Signaling and Homeostasis in Mammalian Oocytes and Eggs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cold Spring Harbor Perspectives in Biology	6. 最初と最後の頁 a035162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/cshperspect.a035162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 KOHATA-ONO Chiyuki, WAKAI Takuya, FUNAHASHI Hiroaki	4. 巻 65
2. 論文標題 The autophagic inducer and inhibitor display different activities on the meiotic and developmental competencies of porcine oocytes derived from small and medium follicles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 527 ~ 532
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2019-112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 FERR? PUJOL Pilar, NGUYEN Xuan Khanh, NAGAHARA Tomoki, BUI Thi Tra Mi, WAKAI Takuya, FUNAHASHI Hiroaki	4. 巻 65
2. 論文標題 Removal of cumulus cells around 20 h after the start of <i>in vitro</i> maturation improves the meiotic competence of porcine oocytes via reduction in cAMP and cGMP levels	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 177 ~ 182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2018-130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wakai Takuya, Fissore Rafael A.	4. 巻 132
2. 論文標題 Constitutive IP3R1-mediated Ca ²⁺ release reduces Ca ²⁺ store content and stimulates mitochondrial metabolism in mouse GV oocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs225441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.225441	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakashita Akihiko, Wakai Takuya, Kawabata Yukiko, Nishimura Chiaki, Sotomaru Yusuke, Alavattam Kris G, Namekawa Satoshi H, Kono Tomohiro	4. 巻 100
2. 論文標題 XY oocytes of sex-reversed females with a Sry mutation deviate from the normal developmental process beyond the mitotic stage†	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 697 ~ 710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioy214	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okudaira Yuichi, Wakai Takuya, Funahashi Hiroaki	4. 巻 63
2. 論文標題 Levels of cyclic-AMP and cyclic-GMP in porcine oocyte-cumulus complexes and cumulus-free oocytes derived from small and middle follicles during the first 24-hour period of in vitro maturation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 191 ~ 197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bui Tra M. T., Nguyen Khenh X., Karata Asako, Ferre Pilar, Tran Minh T., Wakai Takuya, Funahashi Hiroaki	4. 巻 29
2. 論文標題 Presence of vascular endothelial growth factor during the first half of IVM improves the meiotic and developmental competence of porcine oocytes from small follicles	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Reproduction, Fertility and Development	6. 最初と最後の頁 1902 ~ 1902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1071/RD16321	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 月向 はるな, 野村 瑠莉, 舟橋 弘晃, 若井 拓哉
2. 発表標題 マウス卵母細胞におけるTrim-Away法を用いたリン酸化タンパク質の分解
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 野村 瑠莉, 月向 はるな, 舟橋 弘晃, 若井 拓哉
2. 発表標題 ミトコンドリア分裂因子Drp1の阻害による着床前マウス胚の発生停止
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 月向 はるな, 野村 瑠莉, 舟橋 弘晃, 若井 拓哉
2. 発表標題 Trim-Away法を用いたマウス卵母細胞におけるDrp1の機能解析
3. 学会等名 第60回日本卵子学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 野村 瑠莉, 月向 はるな, 舟橋 弘晃, 若井 拓哉
2. 発表標題 着床前胚発生におけるミトコンドリア分裂因子Drp1の機能解析
3. 学会等名 第60回日本卵子学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 月向はるな, 野村瑠莉, 舟橋 弘晃, 若井 拓哉
2. 発表標題 マウス卵母細胞におけるTrim-away法を用いたDrp1タンパク質の分解
3. 学会等名 第18回日本ミトコンドリア学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 野村瑠莉、月向はるな、舟橋弘晃、若井拓哉
2. 発表標題 着床前マウス胚におけるミトコンドリア分裂因子Drp1の役割
3. 学会等名 第18回日本ミトコンドリア学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 若井拓哉
2. 発表標題 卵母細胞における小胞体Ca ²⁺ の制御とその役割
3. 学会等名 第35回日本受精着床学会（招待講演）
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Wakai T, Mehregan A, Fissore RA.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 3868
3. 書名 Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考