

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06627

研究課題名(和文) 卵母細胞における小胞体-ミトコンドリア接触領域の生理機能解析

研究課題名(英文) Physiological analysis of the endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites in oocytes

研究代表者

若井 拓哉 (Wakai, Takuya)

岡山大学・環境生命科学学域・准教授

研究者番号：60557768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000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、ミトコンドリアと小胞体の接触領域に着目し、加齢卵ではオルガネラ間の機能的な連携が破綻している可能性を示した。本研究の成果は加齢に伴う卵の品質低下や不妊要因の解明に寄与すると考えられる。

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。本研究成果は、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の一端を明らかにした。また、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)：It is widely known that a limited number of oocytes reach ovulation in a lifetime and that their quality declines with age. Many studies have reported that dysfunction of organelles such as mitochondria is involved in the decline in oocyte quality, but the mechanism has not yet been elucidated. In this study, we focused on the contact sites between mitochondria and endoplasmic reticulum, and showed that functional linkages between organelles may be disrupted in aging oocytes. The results of this study may contribute to the elucidation of the factors contributing to the decline in oocyte quality and infertility associated with aging.

研究分野：動物生殖生物学

キーワード：卵母細胞 ミトコンドリア 小胞体 カルシウムシグナル 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微授精などの生殖補助技術の向上につながると考えられる。ここでは、細胞機能を支える二つのオルガネラ「ミトコンドリア」と「小胞体」に着目する。我々はこれまで、マウス卵を用いてミトコンドリアと小胞体間にカルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )を介した機能的連携があることを示してきた。本研究ではこれまでの知見を進展させ、卵母細胞におけるミトコンドリア-小胞体接触領域(Mitochondria-associated ER membranes: MAMs)の制御メカニズムと生理機能を解明し、また加齢マウスから採取した卵母細胞を使用して、MAMsと卵の品質との関わりを明らかにする。

### 2. 研究の目的

本研究では、卵母細胞におけるMAMsの制御と生理機能の解明を目指す。

#### (1) ミトコンドリアの動態がMAMsに及ぼす影響

①ミトコンドリアの分裂によるMAMsの制御: ミトコンドリアは動的なオルガネラであり、生理的環境に応じて、融合と分裂を繰り返す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、ミトコンドリア分裂の重要性が示唆されている。そこで、Drp1を介したミトコンドリアの分裂がミトコンドリアの動態とMAMsの制御に関わるか明らかにすることを目的とした。

②加齢卵におけるミトコンドリアの動態とMAMsの特性: 我々のこれまでの研究から、加齢マウスから採取した卵母細胞で過度なミトコンドリアの凝集が観察されている。ここでは、加齢卵におけるミトコンドリア凝集へのDrp1の関与とMAMsの特性を明らかにすることを目的とした。

#### (2) $\text{Ca}^{2+}$ を介したMAMsの生理機能の解明

①小胞体からミトコンドリアへの $\text{Ca}^{2+}$ 輸送: 小胞体は細胞内における $\text{Ca}^{2+}$ 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 $\text{Ca}^{2+}$ は発生開始の原動力となる。一方、小胞体から放出された $\text{Ca}^{2+}$ 一部はMAMsを介してミトコンドリアへ運ばれ、ミトコンドリアにおけるエネルギー生産に寄与する可能性が示唆されている。近年、ミトコンドリア内膜の $\text{Ca}^{2+}$ 輸送体として、mitochondrial calcium uniporter(MCU)が同定され、またその制御パートナーであるMitochondrial calcium uptake 1(MICU1)が発見された。そこで、卵母細胞におけるMCUやMICU1の発現解析を検討した。

②加齢卵におけるMAMsの解析: 上述したように、加齢卵ではミトコンドリアが過度に凝集し、MAMsの制御異常が示唆されている。ここでは、加齢卵におけるMCUやMICU1の解析を行い、加齢に関連してMAMsの生理機能が低下するか検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) オルガネラの動態解析

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。

#### (2) Trim-Away法を用いたDrp1の発現抑制

Trim-Away法は標的タンパク質を特異的に分解する手法として近年開発され、卵母細胞において母性因子として多量に存在するタンパク質の阻害実験として極めて有効である。本研究では卵母細胞にTrim21 mRNAと抗Drp1抗体を注入しDrp1の発現阻害を試み、ミトコンドリアや小胞体の細胞内分布を調査した。

#### (3) 加齢卵におけるMAMs関連タンパク質の発現解析

予備実験の結果から、12~15か月齢の雌マウスから採取した卵母細胞で、ミトコンドリアの過度な凝集が観察されている。そこで、上記マウスに過剰排卵処理を行い採取した卵母細胞からタンパク質を抽出し、免疫蛍光染色法やウエスタンブロット法によりDrp1、MCUおよびMICU1タンパク質の発現解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ミトコンドリア分裂によるMAMsの制御

①Trim-Away法を用いて、卵母細胞に注入する抗体濃度依存的にDrp1タンパク質の分解発現抑制が可能であることを示した(図1)。

また、Drp1の発現低下によってミトコンドリアの凝集が起こることが明らかとなった(図2)。さらに、ミトコンドリアの凝集領域では小胞体の集積が観察され、MAMsの局在異常が起こる可能性が示唆された。

②加齢卵では、ミトコンドリアの過度な凝集がみられたが、若齢卵と比較してDrp1タンパク質の有意な発現低下は認められなかった。一方、Drp1はリン酸

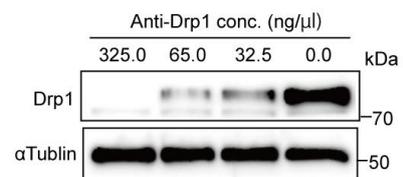


図1. Trim-Away法によるDrp1タンパク質の分解(未発表データ)。

化によって活性が制御され、特に S616 のリン酸化は Drp1 の機能を亢進することが報告されている。加齢卵では Drp1<sup>S616</sup> 発現低下がみられたことから、加齢に伴うミトコンドリアの凝集に Drp1 が関与する可能性が示唆された。

## (2) MAMs を介した Ca<sup>2+</sup>輸送

①抗 MCU 抗体を用いた免疫蛍光染色の結果、卵母細胞における MCU タンパク質発現が確認され、ミトコンドリアと共局在することが分かった。また、Drp1 発現阻害卵では、ミトコンドリア凝集領域に MCU の強い集積が観察され、MAMs の機能異常が起こる可能性が示唆された。

②ウエスタンブロット法を用いて加齢卵における MICU1 タンパク質の発現量を解析した結果、若齢卵と比べて MICU1 の発現低下がみられたことから (図 3)、加齢に伴う MAMs の機能異常が起こる可能性が示唆された。

以上の成果から、Drp1 を介したミトコンドリア分裂は卵母細胞におけるミトコンドリアの動態や MAMs を介した小胞体の正常な空間配置に重要であることが明らかとなった。また、加齢卵ではミトコンドリアの動態異常や MAMs 関連タンパク質の発現低下や局在異常により、ミトコンドリアと小胞体間の Ca<sup>2+</sup>輸送による機能的な連携が破綻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や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。

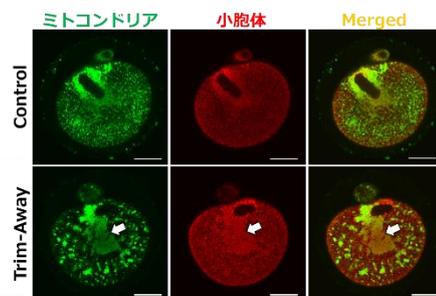


図2. Drp1発現阻害卵(下段)におけるミトコンドリアと小胞体の細胞内分布. 矢印は凝集領域を示す。

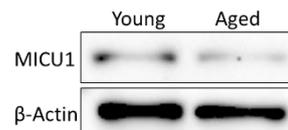


図3. 若齢卵および加齢卵におけるMICU1タンパク質発現 (未発表データ)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Komatsu Masaya, Tsukahara Hayato, Bai Hanako, Takahashi Masashi, Wakai Takuya, Kawahara Manabu	4. 巻 584
2. 論文標題 Cell-cycle dependent GATA2 subcellular localization in mouse 2-cell embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.10.077	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中戸沙也歌、月向はるな、小関元平、若井拓哉、舟橋弘晃
2. 発表標題 加齢が卵母細胞および初期胚のミトコンドリア動態に及ぼす影響
3. 学会等名 第72回関西畜産学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 小関元平、中戸沙也歌、舟橋弘晃、若井拓哉
2. 発表標題 初期胚卵割時のミトコンドリア細胞間分配における細胞骨格の関与
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オーストラリア	Monash University			