

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07372

研究課題名(和文)ミトコンドリアの発熱能から卵子の老化を定量化する

研究課題名(英文)Quantification of oocyte aging by analyzing mitochondrial thermogenesis

研究代表者

板橋 岳志 (Itabashi, Takeshi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：20434384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内外で働く熱は、細胞分裂の正確さに関わる。ミトコンドリアは細胞内での熱産生源であり、卵子の老化に関わる細胞小器官である。本研究では、減数分裂期のミトコンドリアの熱産生動態と卵子の特性・品質との関係性を明らかにすることを試みた。クラゲの卵母細胞を用いて、減数分裂の際に、ミトコンドリア温度が上昇することが示唆された。また、熱動態を光学顕微鏡で計測した後、同一の卵母細胞においてミトコンドリアの量、分布、微細構造を三次元電子顕微鏡によって解析する実験系を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昨今、老化した卵子にミトコンドリア移植を行うという治療法が、1つの有効な不妊治療として注目されている。つまり、老化した卵子のミトコンドリアの性質を多面的に精査することが急務である。本研究は、光学顕微鏡による細胞温度計測と先端電子顕微鏡による微細構造解析という新たな観点から、減数分裂の失敗に起因する先天性疾患や不妊症を引き起こす卵細胞の特性・品質の解明と、その診断法開発に向けて新規な基盤を与えることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The heat acting inside and outside the cell is involved in the accuracy of cell division. Mitochondrion produces the heat within the cell and is an organelle involved in oocyte aging. In this study, we attempted to clarify the relationship between heat production of meiotic mitochondria and, characteristics and quality of oocyte. It was suggested that mitochondrial temperature was increased during meiosis using jellyfish oocytes. We also developed an experimental system for analyzing the amount, distribution, and ultrastructure of mitochondria in the identical oocyte by a three-dimensional electron microscope after measuring the thermodynamics with an optical microscope.

研究分野：細胞生物物理学

キーワード：細胞分裂

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

発生・増殖・分化過程の研究を通じて、細胞をとりまく物理的な環境とその変動(力や温度、そしてそのシグナル・情報伝達機構)は、多くの細胞機能や制御機構に非常に重要な役割を果たすことが明らかにされつつある(Science (2005), Nature (2011))。つまり、生物は物理的環境の変動に適応し、それを生理機能へと巧みに利用する機構を保持していると考えられる。生命に共通の細胞分裂過程においても、細胞の内外で働く“力”は多くの機能に関わっている(Nat. Cell Biol. (2011), Cell (2011))。これまで研究代表者は、定量的顕微操作及び力測定を可能とする実験系を構築し、細胞分裂の素過程の外部負荷に対する応答性を解明し(Nat. Methods (2009), PNAS (2012), Biophys. J. (2014))、細胞分裂が外部から物理的に補完・制御可能であることを示してきた。

また、力に加えて、多くの細胞機能が熱によっても制御されることが分かってきた(Sci. Rep. (2015), Biophys. J. (2015))。細胞分裂期において、分裂期紡錘体は温度に対して非常に感受性が高いことはよく知られている。一方で、細胞自体の発熱に関して、薬剤刺激という非生理的条件下において、1細胞レベルでの短時間の発熱が報告されている(Biophys. J. (2007))。しかし、長時間スケール(培養細胞の1細胞周期は約1日ほど)で起こる自発的な生理機能に伴う発熱変動の1細胞レベルでの計測例は乏しい。

研究代表者が着目する細胞分裂過程は、非常に正確な精度で遂行されなければならない。染色体が均等に分配されないと、重篤な疾患や癌の悪性化などが起こる。その意味で、細胞分裂の熱的制御機構に迫るような研究はこれまで報告されていなかった。そこで、大量の細胞、もしくはその抽出液を用いたカロリメトリー法による細胞分裂期の熱産生計測の先行研究とは異なり、1細胞レベルの温度リアルタイムイメージングによって、“細胞分裂を制御する熱”という観点から研究を展開することを考えた。しかしながら、培養細胞においては細胞分裂の全素過程の完了に1時間を要する。そのため、温度計測用蛍光プローブの退色等の問題が生じ、高時間分解能の解析には技術的に困難が予測された。

この問題を回避するため、研究代表者は刺胞動物クラゲの卵細胞を細胞分裂研究に導入していた。この卵細胞の減数分裂は、2回の細胞分裂を経て1時間以内に完了し、受精可能な卵へとなる。1回の細胞分裂過程は、数分~10分程度であり、短時間に2回の細胞分裂動態を観察可能な卵細胞を導入することによって、「細胞分裂過程の熱産生動態」を時間的・空間的に顕微解析することを着想した。

シグナル伝達などの生理機能や細胞増殖とアポトーシスといった細胞の運命を決定するミトコンドリアは、ATPだけでなく熱を産生する役割を持つ細胞小器官である。昨今、老化した卵子にミトコンドリア移植を行うという治療法が、1つの有効な不妊治療として注目されていることから、卵子のミトコンドリアの性質を多面的に精査することが急務であると考えた。本研究のアプローチは、生殖生物学や分子生物学研究でアプローチされている単に「ミトコンドリア遺伝子の異常」といった分子の個別的な理解とは一線を画している。

2. 研究の目的

本研究では、減数分裂期の細胞分裂に着目し、老化に伴う「細胞温度」及び「ミトコンドリア温度」変動を1卵母細胞レベルで時間的・空間的に顕微解析する。さらに、先端電子顕微鏡による卵母細胞の三次元超微細構造解析を行うことによって、減数分裂機構における“細胞分裂を制御する熱”動態を明確にし、ミトコンドリアの動態と卵子の質(老化)との関係性を顕在化することを目的とした。本研究によって、細胞温度という新たな観点から、減数分裂期の染色体分配の失敗に起因する先天性疾患や不妊症を引き起こす卵細胞の特性・品質の解明と、その診断法開発に向けて新規かつ重要な基盤を与えると考えた。

3. 研究の方法

本研究では、減数分裂を45分間で完了する刺胞動物クラゲ(*Cytaeis*及び*Clytia*)の卵母細胞を用いた。両クラゲは実験室にて飼育することが可能であり、通年使用可能な実験動物として既に研究に用いられている。これらの卵細胞の減数分裂は、2回の細胞分裂を経て45分間で完了し、受精可能な卵へとなる。1回の細胞分裂過程は、数分~10分程度で、紡錘体形成・染色体分配・細胞質分裂(極体放出)が遂行される。また、卵細胞は、減数分裂開始から極めて正確なタイミングで細胞分裂を遂行するという利点を持つ。

(1) 細胞、ミトコンドリア及び小胞体温度の顕微解析

クラゲ卵巣から単離された未成熟卵に、種々の蛍光物質または温度計測用プローブを顕微注射法によって導入し、共焦点顕微鏡による6D観察系を用いた熱産生動態のイメージングを行った。多検体の解析を高速化・効率化するため、微細加工技術で作製したチャンバーに卵母細胞を配置させることで網羅的解析の検討も行った。

(2) 細胞、ミトコンドリアの超微細構造解析

先端電子顕微鏡によって、卵自体やミトコンドリアの微細構造を詳細に解析するために、共焦点顕微鏡観察による細胞内小器官の温度変化を温度感受性蛍光プローブを用いて計測した後、卵細胞をすぐに化学固定し、電子染色、脱水及び樹脂包埋処理した。固定・染色・脱水・包埋方

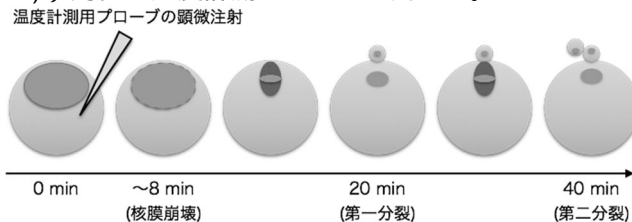
法の最適条件は何度も検討を行い確立した。樹脂包埋した卵細胞はウルトラマイクロームを用いて加工した後、集束イオンビーム走査型電子顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

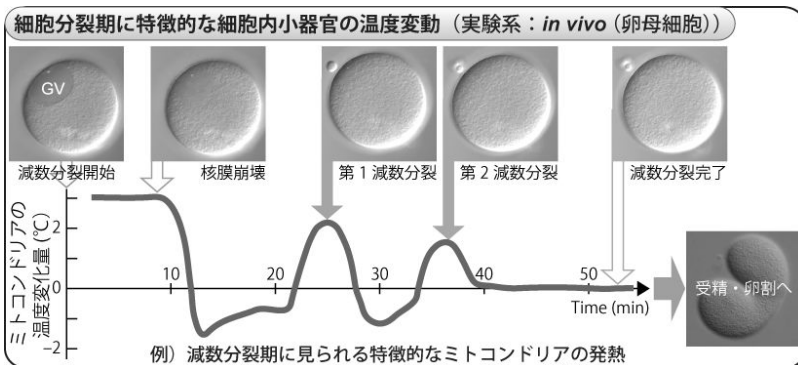
(1) 細胞、ミトコンドリア及び小胞体温度の顕微解析

温度計測用プローブは、レシオ型温度計測粒子 (Analyst (2015)) と、ミトコンドリア (Chem. Comm. (2015)) や小胞体 (Sci. Rep. (2014)) 局在型温度計測プローブを用いた。

クラゲ卵巣から、マイクロピペットにより、未成熟卵を取り出し、顕微鏡下で上述温度計測プローブを顕微注射した。卵母細胞に細胞膜透過性 cAMP を添加することにより、減数分裂を再開させ、共焦点顕微鏡による多点タイムラプス観察を行った。その結果、減数分裂再開後、卵核崩壊の



タイミングで、ミトコンドリア温度が下がり、その後の減数分裂過程の 2 回の細胞分裂の際に、ミトコンドリア温度が上昇した後、減数分裂完了に伴い、ミトコンドリア温度も定常状態に至る、という結果を得た (右図)。細胞分裂期において、ミトコンドリアは紡錘体をとりにくくように局在する

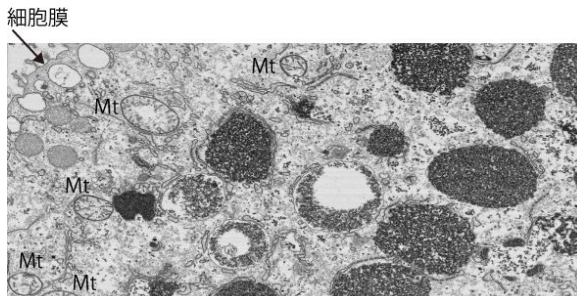


ことが知られているが、卵細胞の動物極側 (紡錘体が係留される) と植物極側で、温度上昇パターンが異なることも分かっている。また、ミトコンドリア以外にも、小胞体において、細胞分裂の際に一過的な温度上昇が観測されている。加えて、減数分裂を完了した卵細胞が受精後に起こす第一卵割においても、細胞内小器官の温度上昇が同様に見られている。つまり、“細胞分裂期の細胞において、細胞内小器官の温度は顕著に上昇し、細胞分裂と染色体分配の精確さを制御している”ことを示唆している。

しかしながら、研究期間中に研究代表者の異動に伴い、顕微鏡システムの解体・移設・再構築を行う必要があったため、また、異動先の実験室の空調の変動が想定以上に大きかったことから、設備自体の改善に 1 年以上を要した。結果として、実験室の温湿度のコントロールが想像以上に困難であることが分かった。細胞内温度が確かに精度高く計測できているか、という再現性を検証しつつ、細胞全体の温度変化、ミトコンドリア膜電位の解析、細胞周期進行の阻害 (例えば、細胞分裂期で停止させる) 条件下でのミトコンドリアの温度動態、小胞体などの細胞内小器官の温度動態等を、引き続き比較解析している。

(2) 細胞、ミトコンドリアの超微細構造解析

実験対象のクラゲにおいて、3 ヶ月程度の生存期間中、様々な週齢の卵母細胞において、細胞内小器官、特にミトコンドリアの量、局在、微細構造の解析を先端電子顕微鏡を用いて行うために、電子染色技術、試料作成技術及びマイクローム組み込み式走査型電子顕微鏡や集束イオンビーム走査型電子顕微鏡の撮像技術の開発を行った。先端電子顕微鏡によって、卵自体やミトコンドリアの微細構造を詳細に解析するために、固定・染色・脱水・包埋方法の条件検討を行い、ミトコンドリアの詳細な微細構造の集束イオンビーム走査型電子顕微鏡解析に十分な染色像が得られる条件を見いだした (右図)。さらに、グリッド付ディッシュにを用いることにより、共焦点蛍光顕微鏡観察による細胞内小器官の温度変化を温度感受性蛍光プローブを用いて計測した後、細胞を低粘度の樹脂で包埋し、遠心処理を加えることにより、数マイクロメートルの樹脂で覆われた細胞試料を作製する方法を確立した。この方法により、同一細胞において微細構造の光学顕微鏡観察と電子顕微鏡観察を行う光電子相関顕微鏡系を確立した。

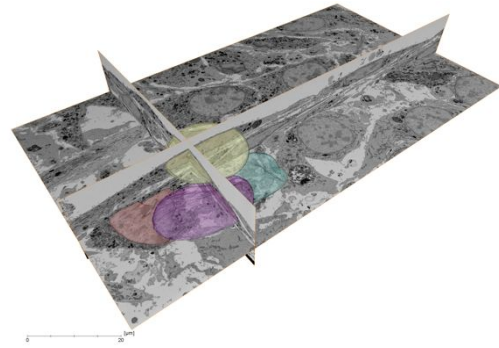


そこで、光学顕微鏡と電子顕微鏡のそれぞれから取得される細胞核の形態画像を両顕微鏡間の三次元位置補正の基準情報とすることにした。そのため、DNA 染色試薬 DRAQ5 による細胞核の蛍光観察の際に生じる活性酸素を利用した 3,3'-diaminobenzidine (DAB) の沈着による電子顕微鏡染色増感法を検討した。DRAQ5-DAB 増感法は、培養細胞を用いて条件検討し、卵母細胞においても適用できることを確認した。さらに、DRAQ5 の代わりとなる蛍光化合物として、温度感受

性蛍光プローブを活性酸素産生源とする試みを行っているが、現在までに顕著な DAB 沈着を誘導することはできていない。

結果として、三次元電子顕微鏡解析するための試料作製技術を最適化することにより、長時間（～5日間）、高解像度（5 ナノメートル切削ピッチ）、広域（100 マイクロメートル観察範囲）の連続切削観察（右図）を可能にする集束イオンビーム走査型電子顕微鏡の撮像技術を開発した。この開発した技術は、直径約 100 マイクロメートルの卵母細胞において広範囲の三次元微細構造情報の取得を可能とし、卵細胞の特性・品質をナノメートルレベルで解明する

以外にも、コレステロール欠乏による線毛病発症メカニズムの解明（EMBO J. (2020)）、繊毛と Ca²⁺シグナルに関する研究（掲載決定）などに応用された。



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 1件）

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 板橋 岳志, 一ノ瀬 孝子, 島田 文子, 森 ひかり, 平原 麻利子, 山本 華代, 岩根 敦子
2. 発表標題 細胞伸展刺激に起因する細胞核動態変化の微細構造解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第75回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 板橋 岳志, 一ノ瀬 孝子, 黒田 純平, 近藤 滋, 岩根 敦子
2. 発表標題 発生過程を先端顕微鏡解析から得られた3D構造モデルから読み解く
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第75回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 板橋 岳志
2. 発表標題 細胞丸ごと 超微細構造イメージング：細胞を三次元電子顕微鏡構造モデルから読み解く
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会 12.0（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Itabashi, Shin'ichi Ishiwata
2. 発表標題 Examining force regulation of anaphase cell
3. 学会等名 第56回生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 板橋岳志
2. 発表標題 Responses of the mitotic spindle to mechanical perturbations
3. 学会等名 THE 3RD HIROSHIMA INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FUTURE SCIENCE “ FRONTIERS IN BIOIMAGING BASED LIFE SCIENCE ” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----