

総合論文

哺乳類卵子におけるミトコンドリアの動態

若井 拓哉

(応用動物科学コース)

Mitochondrial dynamics in mammalian oocytes

Takuya Wakai

(Course of Applied Animal Science)

Subcellular distribution of mitochondria are reorganized during development of the oocyte into a fertilizable egg. In growing oocytes, mitochondria are heterogeneously distributed in the cytoplasm, whereas they diffuse throughout the cytoplasm in fully-grown oocytes. GFP-labeled mitochondria demonstrate that oocyte maturation involves dynamic redistribution of the mitochondria, whose process is associated with microtubule organization. These spatio-temporal regulations of mitochondria in oocytes may be an important process in the preparation for fertilization and subsequent embryonic development.

Key words : Oocyte, Mitochondria, Meiosis, Cytoskeleton, Endoplasmic reticulum

緒 言

ミトコンドリアは独自のDNAであるミトコンドリアDNA (MtDNA) を持ち、融合や分裂をすることでダイナミックに形態を変化させる細胞小器官である。ミトコンドリアの主な機能として、生体内のエネルギー通貨であるATPの産生を担うことがあげられるが、その他にもアポトーシスや酸化ストレス、カルシウム応答の調節など、細胞の正常性を支える根幹的な機能に関わる。

哺乳類卵子のミトコンドリアはユニークな形態をもつ。我々はこれまで、卵母細胞の成長や卵成熟過程におけるミトコンドリアの形態的特徴を明らかにした^{1,2)}。卵母細胞は、その成長過程において活発にMtDNAを複製し、フルサイズに成長した卵母細胞では、10万コピー以上のMtDNAが存在する。これらのMtDNAは、ユニークな球状構造を持つ断片化したミトコンドリアの中に核様体として存在し、卵細胞質全体に分布する。一方、減数分裂が進行する卵成熟過程では、細胞骨格の働きによりミトコンドリア細胞内分布のダイナミックな再配置が起こる。ミトコンドリアの正常な空間配置は、染色体や小胞体などの他の細胞小器官と連動し、受精やその後の発生を支えていると考えられている。

このような卵子特有のミトコンドリアの形態が、卵子の機能や品質にどのように関与するのかについては、未だ不明な点が多い。ここでは、マウス卵の卵子形成過程でみられるミトコンドリアの形態的な特徴を紹介し、その生理的な役割について考察する。

材料と方法

卵母細胞の採取

卵母細胞は生後1日目、10日目および8週齢のICR系雌マウスの卵巣から採取した。卵丘細胞で取り囲まれた卵母細胞からピペティングにより卵母細胞を単離した。卵母細胞の成熟培養はパラフィンオイルで覆ったM-16培地の中で行い、37度、5% CO₂の条件下で培養した。

ミトコンドリアの可視化

ミトコンドリアの染色は、1 μM MitoTracker[®] Red CMXRos (Molecular probes) を含むM-2培地で30分間培養することにより行った。ミトコンドリアのGFPによる可視化のために、ミトコンドリア局在化シグナルをCox VIII 配列からPCRにより増幅し、GFP配列を含むプラスミドDNAに挿入した。In vitro 転写キット (Ambion) を用いてcDNAからRNAを合成し、卵母細胞質中へマイクロインジェクションを行った。染色またはGFPで標識したミトコンドリアは、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus) を用いて観察した。

結果と考察

卵子形成過程におけるミトコンドリアの形態

哺乳類における卵子形成は胎生期に始まり、体細胞分裂を繰り返した卵粗細胞は、減数分裂に進行し卵母細胞

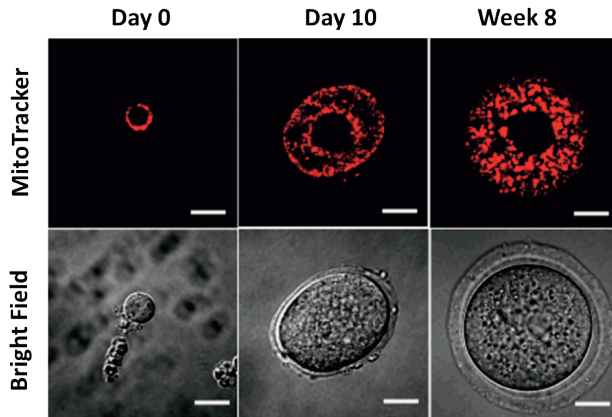


Fig. 1 mitochondrial distribution during oocyte growth. Mitochondria are stained with MitoTracker[®] Red CMXRos. Bar = 20 μ m.

となり、第一減数分裂前期のdiplotene期へ移行した段階で細胞周期を停止する。マウスの場合、新生仔の卵母細胞は直径20 μ mに満たない大きさであるが、成熟個体では直径70 μ mに達する卵母細胞がみられる。

卵母細胞の成長過程では、減数分裂は第一分裂前期で停止していることから、成長期卵母細胞および成長を完了した卵母細胞はいずれも同一の細胞周期にあり、卵核胞 (Germinal Vesicle ; GV) と呼ばれる核膜を持つ大きな核を持つ。成長期の卵母細胞のミトコンドリアを染色すると、成長過程により異なる細胞内分布が観察される。生後1日目、10日目および8週齢の雌マウスから卵母細胞を採取し、Mitotrackerを用いてミトコンドリアを染色後、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った (Fig. 1)。生後1日目の未成長卵母細胞では細胞質の領域が小さくミトコンドリアの局在は明瞭ではないが、10日目の成長期卵母細胞ではミトコンドリアの不均一な細胞内分布がみられる。一方、成長した卵母細胞では核周辺への集中は見られるものの、ミトコンドリアは細胞質全体に拡散していた。これらの結果から、同一の細胞周期にある卵母細胞においても成長段階に応じて、ミトコンドリアの細胞内局在は異なることが明らかとなった。卵子の成長過程では、MtDNAの盛んな複製が起こる。一見、不均一にみえる細胞内分布ではあるが、過去の報告によると、ミトコンドリアはBalbani bodyとよばれる構造体の近傍に集中して存在することが報告されている³⁾。Balbani bodyでは、ミトコンドリア転写因子Aの局在も認められるため⁴⁾、MtDNA複製への関与が示唆されている。

卵成熟過程におけるミトコンドリアの再配置とその役割

成長を遂げた卵母細胞は、性腺刺激ホルモンの一つである黄体形成ホルモンの刺激によって減数分裂を再開し、卵成熟過程へと進行する。はじめの形態的变化として、卵核胞崩壊 (Germinal vesicle breakdown ; GVBD)

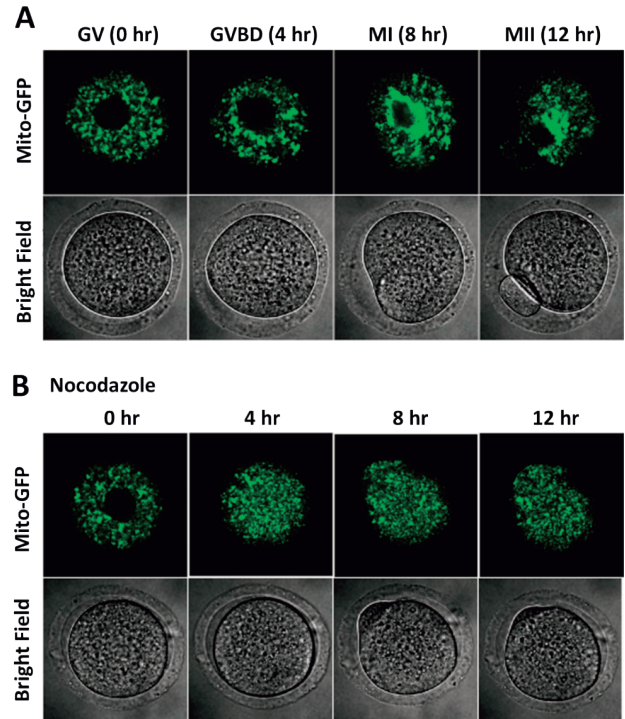


Fig. 2 Redistribution of mitochondria during oocyte maturation. Mitochondria were labeled with GFP (Mito-GFP). (A) GV oocytes (0 hr) underwent oocyte maturation and fluorescent images were obtained at 4, 8 and 12 hrs after start of maturation, which correspond with GVBD, MI and MII stages, respectively. (B) GV oocytes were cultured in the presence of 2 μ g/ μ l nocodazole.

が起こり、染色体が凝集し細胞周期は分裂期へ進行する。その後、染色体は微小管の重合により紡錘体を形成し、アクチンフィラメントの働きによって卵表層へ移動する。第一分裂中期 (Metaphase I ; MI) から第二減数分裂への移行は、DNA複製期を経ずに染色体を維持したまま行われ、cyclin B1のメタボリズムによってコントロールされている。卵母細胞の染色体はcyclin B1の分解に伴い後期へと進行し、終期を経て相同染色体を第一極体として放出した後、速やかなcyclin B1の再合成により第二分裂の中期 (Metaphase II ; MII) において再び細胞周期を停止する。こうした第一分裂前期の停止の再開から第二分裂中期で再び停止するまでの一連の過程が卵成熟と呼ばれる。

卵成熟過程における染色体の動きと連動して、卵細胞質の中でミトコンドリアの局在変化が観察される。我々は時間的・空間的なミトコンドリアの変化を追跡するために、ミトコンドリア局在化シグナルを付加したGFPを卵母細胞に発現させた (Fig. 2)。GV期の卵母細胞におけるミトコンドリアは、細胞質全体に拡散している (ただし家畜の卵子の場合、細胞膜直下やGVの周囲に局在するという報告もあり、哺乳動物種により異なる可能性

がある)。GVBD が起こると、MI 期への移行にかけてミトコンドリアの染色体周囲への凝集が観察される (Fig. 2A)。この凝集は、微管の働きに依存しており、実際に微管重合を阻害する Nocodazole 存在下で卵成熟過程を観察した場合、ミトコンドリアの凝集はみられない (Fig. 2B)。さらに、この凝集のメカニズムは分子モーターである dynein に制御されることが報告されている⁵⁾。第一分裂は非対称的な細胞分裂であるが、染色体が卵細胞質と第一極体へ均等に分配されるのに対して、ミトコンドリアは卵細胞質側へ偏って分配される。ミトコンドリア分配の卵細胞質へのバイアスは、染色体周囲に凝集したミトコンドリアが極体側へ分配されることを防止しているようにみえる。MII 期再停止した成熟卵子では、染色体の周囲に集中したミトコンドリアが観察されるものの、大部分は再び卵細胞質内に拡散する。

卵成熟過程でみられるミトコンドリア分布の再配置の生理的役割についてはほとんど分かっていないが、ミトコンドリアの機能阻害が紡錘体の形成異常に繋がる報告があることから⁶⁾、紡錘体の形成や染色体の整列に重要な役割を持っている可能性が考えられる。また、ミトコンドリアが顕著に凝集する MI 期の周辺では ATP 濃度の上昇がみられることから⁷⁾、ミトコンドリアの空間的配置が ATP を介して何らかの細胞内反応に関わっているのかもしれない。

受精におけるミトコンドリアの生理的役割

ミトコンドリアの役割が明瞭でない卵成熟過程に対して、受精時では明らかな役割が報告されている。成熟卵子における MII 停止は精子の進入により解除されるが、この引き金となるのは細胞質内 Ca^{2+} 濃度の上昇であり、これは細胞内 Ca^{2+} リザーバーである小胞体からチャネルを介して細胞質内へ放出される⁸⁾。哺乳動物の場合、 Ca^{2+} オシレーションとよばれる周期的な Ca^{2+} 濃度の上昇が受精後数時間にわたり観察される。

成熟後、ミトコンドリアは小胞体の近傍に配置される。ミトコンドリアと小胞体は、細胞内の多様なイベントで協調するが、中でも Ca^{2+} を介したミトコンドリア-小胞体間のシグナル伝達は、ATP 生産やアポトーシスに関わる⁹⁾。受精時、小胞体から放出された Ca^{2+} の一部はミトコンドリアに取り込まれミトコンドリアにおける ATP 生産を亢進し、ATP は小胞体における ATP 駆動性の Ca^{2+} ポンプの働きを通して小胞体への Ca^{2+} 取り込みを促進し、 Ca^{2+} オシレーションの継続に寄与するモデルが想定される (Fig. 3)。実際に、ATP 生産を阻害するオリゴマイシンで卵子を処理すると、小胞体 Ca^{2+} レベルが低下し、オシレーションは停止する¹⁰⁾。

ミトコンドリアの動態と融合・分裂のメカニズム

上述したように、卵母細胞におけるミトコンドリアの動態が細胞骨格の働きに依存するが、一方でミトコンドリアはそれ自体が融合・分裂を繰り返す動的な細胞小器

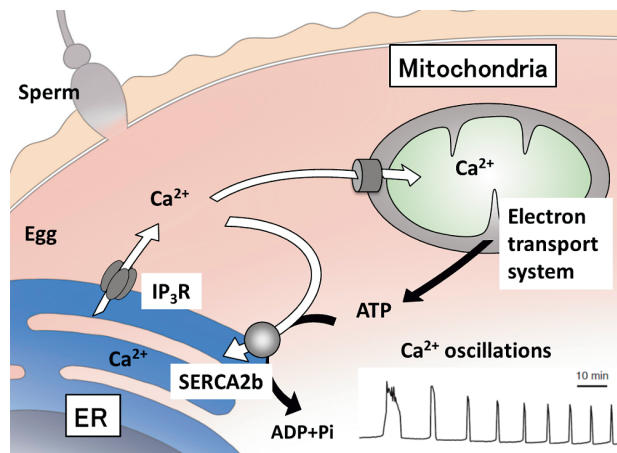


Fig. 3 Schematic diagram of fertilization-induced Ca^{2+} oscillations. Ca^{2+} are released from the endoplasmic reticulum (ER) via Ca^{2+} channel. Mitochondria uptake Ca^{2+} through Ca^{2+} uniporter and activate electron transport system. ATP production could promote SERCA Ca^{2+} pump, which refills ER to continue Ca^{2+} oscillations.

官であることが知られている。しかしながら、この内因的なダイナミクスの関与についてはこれまで卵母細胞では研究されてこなかった。ミトコンドリアの融合・分裂を制御する因子として、GTPase 活性を持つ様々な Dynamin 様タンパク質が同定されている。我々は、卵成熟過程におけるこれらのタンパク質の発現と機能の一端を明らかにした²⁾。これらの、GTPase 群の卵子や胚における役割は未だ不明な点が多く、卵子特有のミトコンドリアの形態を支えるメカニズムとして、今後の解明が期待される。

要 約

卵母細胞が受精可能な卵子へと発生する過程で、ミトコンドリアの細胞内分布は大きく変動する。そこで、その詳細を明らかにするために卵母細胞の成長や成熟過程におけるミトコンドリアを生細胞観察した。成長期の卵母細胞におけるミトコンドリアは不均一な細胞内分布を示すのに対して、成長を完了した卵母細胞では細胞質全体に拡散して均一な分布を示した。また、成熟過程におけるミトコンドリアを経時的に追跡したところ、微管依存的な再配置が観察された。こうしたミトコンドリアの時間・空間的な制御は受精やその後の発生を支持するために必要と考えられる。

キーワード：卵母細胞、ミトコンドリア、減数分裂、小胞体、細胞骨格

謝 辞

本稿を執筆するにあたり、多くの助言をいただいた河野友宏教授 (東京農業大学) と Rafael Fissore 教授 (University of Massachusetts

Amherst) に感謝を申し上げます.

文 献

- 1) 若井拓哉：マウス卵母細胞におけるミトコンドリアの細胞内局在. *Journal of Mammalian Ova Research*, **29**, 155-160 (2012)
- 2) Wakai, T., Harada, Y., Miyado and K., Kono, T.: Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins define organelle positioning and movement during mouse oocyte maturation. *Molecular Human Reproduction*, **20**, 1090-1100 (2014)
- 3) Pepling, M. E., Wilhelm J. E., O'Hara, A. L., Gephardt, G.W and Spradling, A. C.: Mouse oocytes within germ cell cysts and primordial follicles contain a Balbiani body. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **104**, 187-192 (2007)
- 4) Wai, T., Teoli, D., Shoubridge, E. A.: The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes *Nat Genet.*, **5**, 1484-1488 (2008)
- 5) Dalton, C. M. and Carroll, J.: Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte. *J Cell Sci.*, **126**, 2955-2964 (2013)
- 6) Zhang, X., Wu, X. Q., Guo, Y. L., Lu, S. and Ma, X.: Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. *Cell Res.*, **16**, 841-850 (2007)
- 7) Dalton, C. M., Szabadkai, G. and Carroll, J.: Measurement of ATP in single oocytes : impact of maturation and cumulus cells on levels and consumption. *J Cell Physiol.*, **229**, 353-361 (2014)
- 8) Miyazaki, S., Yuzaki, M., Nakada, K., Shirakawa, H., Nakanishi, S., Nakade, S. and Mikoshiba, K.: Block of Ca²⁺ wave and Ca²⁺ oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science*, **257**, 251-255(1992)
- 9) Rizzuto, R.M. and Pozzan, T.: Microdomains of intracellular Ca²⁺ : molecular determinants and functional consequences. *Physiol. Review*, **51**, 1088-1098 (2006)
- 10) Wakai, T., Zhang, N., Vangheluwe, P., Fissore, R. A.: Regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺ oscillations in mammalian eggs. *J Cell Sci.*, **126**, 5714-5724 (2013)