

マウス卵母細胞におけるミトコンドリアの細胞内局在

誌名	Journal of mammalian ova research = 日本哺乳動物卵子学会誌
ISSN	13417738
著者名	若井,拓哉
発行元	日本哺乳動物卵子学会
巻/号	29巻4号
巻号補足	
掲載ページ	p. 155-160
発行年月	2012年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



—総説—

特集：卵子のエネルギー代謝 —ミトコンドリア機能について—

マウス卵母細胞におけるミトコンドリアの細胞内局在 Mitochondrial Localization in Mouse Oocytes

若井 拓哉

Takuya Wakai

東京農業大学バイオサイエンス学科動物発生工学研究室 〒156-8502 世田谷区

Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan

要旨： 卵母細胞が受精可能な卵子へと発育する過程でミトコンドリアの細胞内局在は大きく変動する。そこで、その局在の詳細を明らかにするために成長および成熟過程の卵母細胞におけるミトコンドリアの生細胞観察を行った。成長期の卵母細胞におけるミトコンドリアは細胞膜直下および核周辺に特に集中しているのに対して、成長を完了した卵母細胞では細胞質全体に拡散して分布しており、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分かった。また、成熟過程における卵母細胞のミトコンドリアをGFPでラベルし経時的に追跡したところ、局在のダイナミックな再構築が観察され、さらにそれは微小管の影響を受けていることが分かった。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, マウス, ミトコンドリア分布, 細胞骨格

Abstract: Intracellular distribution of mitochondria varies during development of the oocyte into a fertilizable egg. Here we demonstrate a change in the distribution of mitochondria during oocyte growth and maturation in living mouse oocytes. In growing oocytes, mitochondria concentrated into subcortical and perinuclear areas, whereas it diffusely distributed throughout the cytoplasm in fully-grown oocytes, indicating the variation of mitochondrial distribution in the same G2/M cell-cycle stages. GFP-labeled mitochondria reveal that oocyte maturation involves dynamic reorganization of the mitochondria, and whose process is associated with microtubule organization. These spatio-temporal regulations of mitochondria in oocytes may be important process in the preparation of fertilization and subsequent embryonic development.

Key words: Oocyte, Mouse, Mitochondrial localization, Cytoskeletal organization

はじめに

ミトコンドリアは酸化的リン酸化や代謝制御を担う細胞小器官であるが、アポトーシスや酸化ストレスの調節にも関わり、その機能は多岐にわたる¹⁾。こうした機能と連動して、細胞内におけるミトコンドリアの局在も大きく変化すると考えられている。卵母細胞におけるミトコンドリアは減数分裂の進行にしたがって、その局在を大きく変化させ

るが²⁻⁴⁾、そのメカニズムや生理的な役割は未だ不明な点が多い。そこで本稿では、マウス卵子を用いて卵母細胞の成長・成熟過程におけるミトコンドリア局在の変化とそれを制御するメカニズムについて、我々がこれまでに得ている知見を中心に解説したい。

卵母細胞の成長とミトコンドリアの細胞内局在

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させる。マウスの場合、新生仔の卵母細胞は直径20 μm 程の大きさであるが、個体が成熟個体へと成長する過程で卵母細胞も成長し、春期発動期には直径70 μm に達する卵母細胞が観察される。こうして成長を遂げた卵母細胞は、

(受付 2012年6月5日／受理 2012年7月2日)

別刷請求先：〒156-8502 東京都世田谷区桜ヶ丘1-1-1

東京農業大学バイオサイエンス学科動物発生工学
研究室

e-mail: t3wakai@nodai.ac.jp

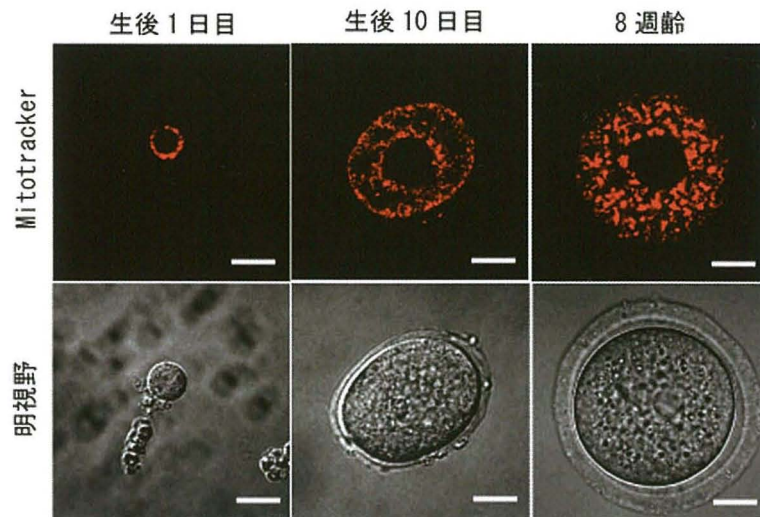


図1 卵母細胞の成長過程におけるミトコンドリアの局在

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® Red CMXRosを用いてミトコンドリアを染色した. 生後1日目の卵母細胞(直径約20 μm)では卵細胞質中にミトコンドリアが密に観察される. 生後10日目の卵母細胞(直径約50 μm)の場合, 細胞膜直下および核周辺に集中したミトコンドリアが観察される. 8週齢の完全に成長した卵母細胞(直径約70 μm)では, ミトコンドリアは細胞質全体に拡散して分布する. Scale barは20 μm を示す.

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.

成長過程においては第一減数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有する. それでは細胞質に存在するミトコンドリアの局在は成長過程で変化するのであろうか. 我々は生後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プローブ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で観察を行った(図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は細胞膜直下および核周辺に特に集中して存在することが分かった. 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分布していた. 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の段階に応じて, 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ミトコンドリア数およびミトコンドリアDNAのコピー数は大きく増加することが知られているが⁵⁾, こうしたミトコンドリアの空間的な制御と何らかの関連があるのかもしれない.

卵成熟過程における細胞小器官の再分布とその役割

成長を完了した卵母細胞は, 一過性に放出される黄体形成ホルモンの刺激により減数分裂を再開する. まずはじめの形態的变化として, 卵核胞崩壊 (Germinal vesicle breakdown; GVBD) が観察され, 染色体が凝集し分裂期へ進行する. その後, 染色体は微小管などの細胞骨格の働きによって卵細胞質表層へ移動するとともに, 第一減数分裂中期 (Metaphase I; MI) における紡錘体を形成する. 第一減数分裂から第二減数分裂への移行は, DNA複製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. すなわち, 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減数分裂の中期 (Metaphase II; MII) において再び細胞周期を停止する. こうした第一減数分裂前期の停止の再開から第二減数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.

卵成熟過程は細胞核としては半数体ゲノムを作出するための期間であるが, 細胞質側に着目した場合, 受精およびその後の発生を支持するための準備期間と捉えることができる. 卵成熟過程で獲得される細胞質内の能力は多数存在するが顕著な例として, ここでは Ca^{2+} の放出能力をあげてみる. 受精時に起こる細胞質内 Ca^{2+} 濃度の上昇は多くの下流

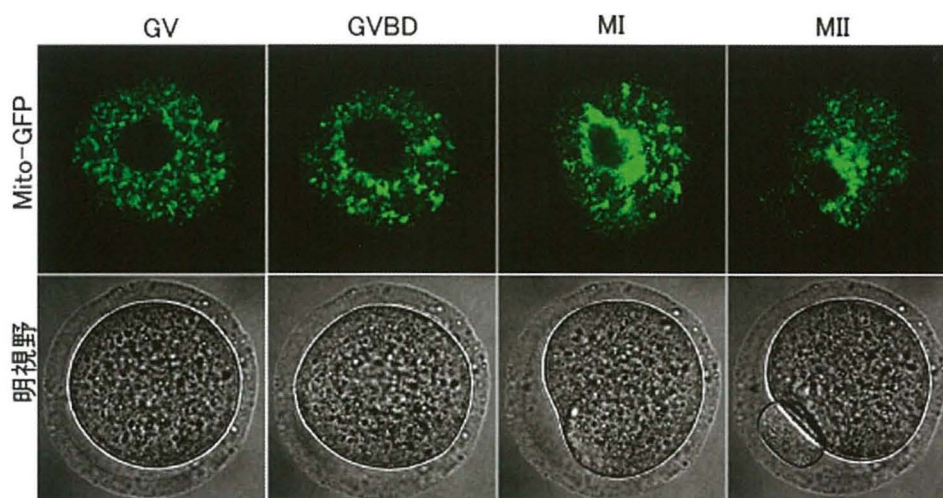


図2 卵成熟過程におけるミトコンドリアの局在変化

Mito-GFP mRNA をGV期の卵子にマイクロインジェクションし、GFPの蛍光発現を確認後に成熟培養を行い、培養後0, 4, 8および12時間に共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。培養後0時間のGV期ではミトコンドリアは細胞質全体に拡散して分布する。培養後8時間のMI期へ進行した卵子では分裂装置の周囲にクラスター化したミトコンドリアが観察される。培養後12時間のMII期へ到達した成熟卵子におけるミトコンドリアは大部分が再び細胞質中に拡散し、クラスター化したミトコンドリアのサイズは小さい。

のタンパク質を活性化させることで、MII期停止の解除、表層顆粒の放出および前核形成など、いわゆる卵活性化に伴う様々な現象の原動力となる^{6, 7)}。特に哺乳類の場合、 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から数時間にわたり観察される⁸⁾。ところがGV期の未成熟卵子を精子と融合させた場合、不規則かつ小さな細胞室内カルシウム濃度の上昇が起こるものの、成熟卵子の受精時に引き起こされる周期的な Ca^{2+} オシレーションは観察されない^{9, 10)}。言い方を換えれば、 Ca^{2+} オシレーションは卵子がその成熟過程において獲得する能力なのである。

それでは卵母細胞は成熟過程においてどのようにして Ca^{2+} オシレーションを生み出す機構を確立するのであろうか。受精時に上昇する Ca^{2+} の主要な供給源は細胞内 Ca^{2+} のリザーバーである小胞体であり、小胞体膜上の Ca^{2+} チャネルであるイノシトール三リン酸受容体(IP₃R)を介して細胞質へ放出される¹¹⁾。重要なことに、小胞体は卵成熟過程においてその性質を変化させることで Ca^{2+} の放出能力を向上させる¹²⁾。まず、小胞体内の Ca^{2+} 濃度はGVBDを境に劇的に増加しMII期で最大となる。成熟培養中に小胞体上の Ca^{2+} ポンプを阻害するとこの Ca^{2+} 濃度の増加が妨げられ、卵子はMII期へと成熟するものの、受精後の Ca^{2+} オシレーションが不完全となることから、卵成熟過程において小胞体内に Ca^{2+} が蓄積する現象は正常な Ca^{2+} オシレーションの確立に不可欠であると考えられる。また興味深いことに、小胞体とその膜上のIP₃Rの局在は卵成熟過程でダイナミックに再構築される^{13, 14)}。GV期では卵細胞質内に拡散して存在する小胞体はGVBDの際に核の周囲に集中し、その後は凝集した染色体

と紡錘体を取り囲みながら卵子表層へと移動する。MII期ではクラスター化した小胞体とIP₃Rが観察され、マウス卵子の場合では小胞体のクラスターが表層上に集中して存在し、 Ca^{2+} オシレーションに寄与していると報告されている¹³⁾。一方、ヒト卵子の場合はクラスター化した小胞体は表層に限らず細胞質内にも多数存在するため¹⁵⁾、こうした動物種間での違いは Ca^{2+} オシレーションのパターンで見られる差異と何か関係しているのかもしれない。

ミトコンドリアの場合も小胞体と同じく、卵成熟過程における局在の再構築が報告されているが²⁻⁴⁾、小胞体と比べてその制御機構や役割については未だ不明な点が多い。そこで、我々はまず卵子内ミトコンドリアの再分布を詳細に調べるために、Mitochondrial targeting signalに蛍光タンパク質であるGFPを連結し発現させることによりミトコンドリアを蛍光ラベルし、卵成熟過程における変化を経時的に追跡した(図2)。GV期におけるミトコンドリアは図1で示したMitotracker染色の結果と同様に、卵細胞質全体に拡散して分布していた。培養後4時間のGVBD期においてもミトコンドリアは卵細胞質中に散在していたが、培養後8時間のMI期では染色体と分裂装置の周囲にクラスター化したミトコンドリアが集中していた。培養後12時間のMII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、大部分は再び細胞質中に拡散し、クラスター化したミトコンドリアのサイズも小さいことを確かめた。

小胞体の場合、卵成熟過程における局在の再構築は Ca^{2+} オシレーションを生み出すために重要と考えられているが、ミトコンドリアの再分布には何か生理的な役割はあるので

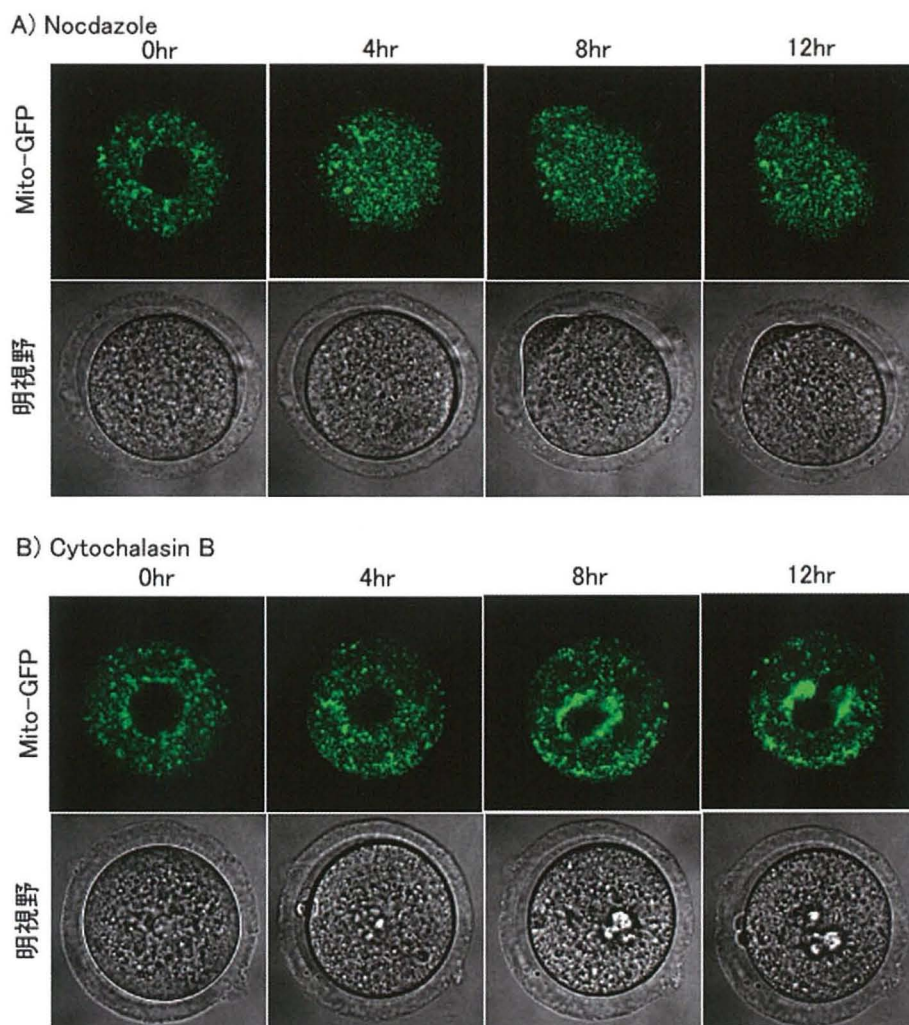


図3 細胞骨格を介したミトコンドリアの移動

Mito-GFPを発現させたGV卵子を2 $\mu\text{g/ml}$ nocodazole および5 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B存在下でそれぞれ成熟培養し、培養後0, 4, 8および12時間に観察を行った。A) Nocodazole処理を行った卵子では分裂装置が形成されず、染色体周囲へのミトコンドリアの集中が阻害される。B) Cytochalasin B処理を行った卵子では第一極体の放出は起こらず、MI期からMII期にかけてのミトコンドリアの再分布は阻害されるが、分裂装置周囲へのミトコンドリアの集中は観察される。

あろうか。Yuらはホタルルシフェラーゼタンパク質を細胞質内およびミトコンドリアで特異的に発現させて、卵成熟過程におけるATP産生を経時的に計測し、ATP産生の増加とミトコンドリアのクラスター形成に相関があることを報告した⁴⁾。また、ミトコンドリアの細胞内局在の役割として、ミトコンドリア-小胞体間のシグナル伝達があげられる。なかでも Ca^{2+} を介したシグナル伝達はミトコンドリアにおいて好氣的代謝やアポトーシスなどの多様な生理現象に関わる¹⁶⁾。実際に、MII期の卵子でミトコンドリアと小胞体の二重染色を行うと両者の局在に多くの一致が見られ、さらに受精時に小胞体から放出される Ca^{2+} オシレーションはミトコンドリア内でATP産生に寄与することから¹⁷⁾、ミトコン

ドリアが小胞体の近傍に配置されることで、受精時のミトコンドリア-小胞体間の Ca^{2+} の伝達を最適にしている可能性が考えられる。

細胞骨格を介した細胞小器官の移動

細胞小器官である小胞体とミトコンドリアは卵成熟過程において局在が再構築されるが、これらの細胞小器官はどのようなメカニズムで空間的配置を変えているのであろうか。実は染色体が細胞骨格の働きにより移動するように細胞小器官も細胞骨格に連動して移動する。卵成熟過程でこうした役割を担うのは微細管とアクチンフィラメントである¹⁸⁾。

小胞体の場合、卵成熟過程で2段階の制御を受けることが知られている¹⁹⁾。GV期からMI期、すなわち小胞体が核の周囲に集中し卵子表層へ移動する過程は微小管を介して行われる。実際、nocodazole処理により微小管の重合を阻害すると小胞体の移動は妨げられるが、アクチンの重合阻害剤であるlatruncin Aやcytochalasinで処理した場合ではこの移動は阻害されない。逆に、MI期からMII期への再構築はアクチンフィラメント依存的であり、latruncin A処理した卵子では本来表層に多数存在する小胞体およびIP₃Rのクラスターが形成されない。

一方、ミトコンドリアの局在に対する細胞骨格の働きについては報告によって結論が異なり、未だ統一的な見解は得られていない印象を受ける。Van Blerkomはマウス卵子を用いて成熟過程でnocodazoleおよびcytochalasin B処理を行い、nocodazole処理によりミトコンドリアの核周囲への移動が阻害されると報告した²⁾。さらにSunらはブタ卵子を用いて、ミトコンドリアの凝集や移動がアクチンフィラメントではなく微小管に依存すると同様の主張している³⁾。しかしながら、最近Yuらはマウス卵子を用いてcytochalasin B処理を行ったところ、ミトコンドリアのクラスターが消失し、これは卵子表層に密に存在するアクチンフィラメントの崩壊と関連している、という上述の結論とは異なる結果を報告している⁴⁾。そこで、我々もGFPでミトコンドリアをラベルした卵子を細胞骨格阻害剤の存在下で成熟培養し、ミトコンドリアの局在の変化を経時的に追跡した(図3)。Nocodazole (2 µg/µl)およびcytochalasin B (5 µg/µl)存在下で培養した卵子は培養後12時間においても第一極体の放出が確認されなかったため、両阻害剤ともに十分に細胞骨格の重合を阻害していたと考えられる。Nocodazole処理を行った卵子では分裂装置が形成されないため、図2で示した通常の卵成熟で見られるMI期にみられる分裂装置周囲へのミトコンドリアの集中が、培養後8時間においても起こらなかった。さらに、培養後8時間から12時間においても通常MI期からMII期にかけて見られるミトコンドリアの再分布が観察されなかった。一方、cytochalasin B処理を行った卵子では、培養後8時間から12時間にかけてのミトコンドリアのリモデリングは見られなかったが、分裂装置周囲へのミトコンドリアの集中は観察され、過去の報告⁴⁾で見られたようなミトコンドリアのクラスターの消失は確認されなかった。したがって、我々の結果からは卵成熟過程におけるミトコンドリアのリモデリングは主に微小管の影響を受けている可能性が示唆された。しかしながら、今回の我々の実験を含めて、これまでの報告で使用されている阻害剤の濃度や培養液の組成などが異なるために結果の単純な比較はできず、また阻害剤による副作用の影響も否定はできない。したがって、今後はノックダウン法などアプローチを用いて、例えば細胞骨格の重合に関わる因子を特異的に阻害しその影響を観察することで、より正確な結論を導き出せるかもしれない。

おわりに

卵子におけるミトコンドリアの細胞内局在は卵母細胞の成長あるいは成熟段階でダイナミックに変動することが明らかとなったが、その局在のパターンが意味する生理的な機能についてはほとんど明らかにされていない。例えば、卵成熟過程で起こるミトコンドリアのクラスター形成がATP産生の増加と関連していると報告されているが、ミトコンドリアのクラスターが観察される時期はCa²⁺オシレーションの起こるMII期に限定される訳ではない。成熟の過程で産生されたATPが特に何の現象に必要であるのか明らかにすることは今後の課題である。また、ミトコンドリアを含め細胞小器官の卵子内局在は哺乳動物種間でも差異が大きいため、マウス以外の動物種について制御メカニズムも含めて詳細に調べる必要がある。ミトコンドリアの機能や形態は細胞の正常性を反映するため、こうした動物種ごとに得られた知見は家畜においては質の高い食料生産のシステムの開発に、またヒトの場合では不妊治療に貢献する可能性がある。

謝 辞

本稿を執筆するにあたり、多くの助言をいただいた東京農業大学の河野友宏教授に感謝を申し上げます。

文 献

- 1) McBridem, H.M., Neuspiel, M. and Wasiak, S. (2006): Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.*, 16, 551–560.
- 2) Van, B.J. (1991): Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 5031–5035.
- 3) Sun, Q.Y., Wu, G.M., Lai, L., Park, K.W., Cabot, R., Cheong, H.T., Day, B.N., Prather, R.S. and Schatten, H. (2001): Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction*, 122, 155–163.
- 4) Yu, Y., Dumollard, R., Lai, F.A. and Swann, K. (2010): Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. *J. Cell Physiol.*, 24, 672–680.
- 5) Poulton, J., Chiaratti, M.R., Meirelles, F.V., Kennedy, S., Wells, D. and Holt, I.J. (2010): Transmission of mitochondrial DNA disease and ways to prevent them. *Plos Genet.*, 6.
- 6) Schultz, R.M. and Kopf, G.S. (1995) Molecular basis of mammalian egg activation. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 30, 21–62.
- 7) Ducibella, T. and Fissore, R. (2008): The roles of Ca²⁺, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development. *Dev. Biol.*, 315, 257–279.
- 8) Miyazaki, S., Shirakawa, H., Nakada, K. and Honda, Y. (1993): Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ release channel in

- Ca²⁺ waves and Ca²⁺ oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev. Biol.*, 158, 62–78.
- 9) Jones, K.T., Carroll, J. and Whittingham, D.G. (1995): Ionomycin, thapsigargin, ryanodine, and sperm induced Ca²⁺ release increase during meiotic maturation of mouse oocytes. *J. Biol. Chem.*, 270, 6671–6677.
- 10) Mehlmann, L.M. and Kline, D. (1994): Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: calcium release in response to sperm or inositol trisphosphate is enhanced after meiotic maturation. *Biol. Reprod.*, 51, 1088–1098.
- 11) Miyazaki, S., Yuzaki, M., Nakada, K., Shirakawa, H., Nakanishi, S., Nakade, S. and Mikoshiba, K. (1992): 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.
- 12) Wakai, T., Vanderheyden, V., Yoon, S.Y., Cheon, B., Zhang, N., Parys, J.B. and Fissore, R.A. (2011): Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor function during mouse oocyte maturation. *J. Cell Physiol.*, 227, 705–717.
- 13) Kline, D., Mehlmann, L., Fox, C. and Terasaki, M. (1999): The cortical endoplasmic reticulum (ER) of the mouse egg: localization of ER clusters in relation to the generation of repetitive calcium waves. *Dev. Biol.*, 215, 431–442.
- 14) Fissore, R.A., Longo, F.J., Anderson, E., Parys, J.B. and Ducibella, T. (1999): Differential distribution of inositol trisphosphate receptor isoforms in mouse oocytes. *Biol. Reprod.*, 60, 49–57.
- 15) Mann, J.S., Lowther, K.M. and Mehlmann, L.M. (2010): Reorganization of the endoplasmic reticulum and development of Ca²⁺ release mechanisms during meiotic maturation of human oocyte. *Biol. Reprod.*, 83, 578–583.
- 16) Rizzuto, R.M. and Pozzan, T. (2006): Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol. Review*, 51, 1088–1098.
- 17) Dumollard, R., Marangos, P., Fitzharris, G., Swann, K., Duchen, M. and Carroll, J. (2004): Sperm-triggered Ca²⁺ oscillations and Ca²⁺ homeostasis in mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production. *Development*, 131, 3057–3067.
- 18) Sun, Q.Y. and Schatten, H. (2006): Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction*, 131, 193–205.
- 19) FitzHarris, G., Marangos, P. and Carroll, J. (2007): Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein. *Dev. Biol.*, 305, 133–144.