ミトコンドリアリボソームタンパク質翻訳異常に着目した加齢卵子における染色体異常発生機序の解明

Defective translation of mitochondrial ribosomal protein in oocytes with maternal aging

東京大学医学部　産婦人科学教室　助教　髙橋　望

要　約

女性のライフスタイルの変化に伴い、出産年齢の上昇が見られるが、加齢に伴い妊孕性は低下する。加齢による不妊の主な原因は卵子の質の低下であり、染色体異常、紡錘体形成異常、ミトコンドリア機能異常、酸化ストレスの蓄積が関与すると考えられているが、詳細な原因は明らかとなっていない。卵子の成熟過程ではミトコンドリアの数が増加し、ATP産生が活発になる。ミトコンドリアは核とは別に独自のDNA（mtDNA）を持ち、電子伝達系構成タンパク質をコードしている。これらのタンパク質はミトコンドリアリボソームで翻訳されるが、加齢に伴う変化については明らかとなっていない。本研究では、加齢に伴うミトコンドリアリボソームタンパク質の翻訳異常が、ミトコンドリア機能低下や染色体異常を引き起こすかを検討した。本研究では、C57BL6マウスを用いて若年（1ヶ月齢）および加齢（12-15ヶ月齢）のM2期卵子を採取し、RiboTag-IP/RNA-Seqを行うと、加齢卵子ではミトコンドリア関連遺伝子の翻訳異常を認め、特にミトコンドリアリボソームタンパク質の翻訳異常を認めた。YFPレポーターアッセイにより、加齢卵子ではMrpl3の翻訳低下を認めた。卵子における翻訳制御因子であるCytoplasmic element binding protein 1（CPEB1）は加齢に伴い50％減少することから、CPEB1ヘテロマウスを用いてMrpl3の翻訳変化を検討すると、加齢卵子と同様に翻訳低下を認めた。加齢によるCPEB1の減少がミトコンドリアリボソームタンパク質の翻訳異常を引き起こし、それに伴うATP産生低下が染色体異常の発生に関与している可能性が示唆された。

緒　言

近年、女性のライフスタイルの変化に伴い、結婚年齢及び出産年齢の上昇が見られている。女性の加齢に伴い妊孕性は低下し、特に35歳をすぎるとその傾向は顕著になり、40歳を過ぎると急速に減少する。加齢に伴う不妊の主たる原因は、卵子の質の低下によるものと考えられる。卵子の質の低下の原因として、染色体の配列異常、紡錘体形成異常、ミトコンドリアの機能異常、酸化ストレスの蓄積などが挙げられるが、その詳細な発生機序は依然不明である。

卵子は、胎生期に第一減数分裂前期で停止し、卵核胞（Germinal Vesicle; GV）を維持し、思春期以降、排卵による黄体形成ホルモン（LH）の作用により、減数分裂が再開、核膜消失（Germinal Vesicle Breakdown; GVBD）がおき、M1期（第一減数分裂中期）を経て第一極体を放出し、M2期（第二減数分裂中期）で再び停止する。卵子の成熟過程において、ミトコンドリア数は1000から200,000-400,000個まで増加する。減数分裂再開後、ミトコンドリアは紡錘体周囲に凝集し、酸化的リン酸化によるATP産生は、GVBDとM2期のタイミングで上昇することが報告されている。ミトコンドリアは核とは別に固有のDNAを保有し、ミトコンドリアDNA（mtDNA）はミトコンドリア内の13種類のタンパク質の遺伝子をコードし、これらのタンパク質はいずれも呼吸鎖複合体のサブユニットである。mtDNAから転写されたmRNAは、ミトコンドリアリボソームによって

翻訳が行われる。ミトコンドリアリボソームタンパク質は核内の遺伝子でコードされており、細胞質で翻訳されたのちにミトコンドリア内に輸送される。加齢卵子においてmtDNAの翻訳異常を認めるかどうかは明らかとなっていない。

卵子の最終成熟過程における、mRNAの翻訳制御機構が受精や胚発生能に重要であることが知られている。我々はこれまでの研究で、加齢卵子においてmRNAの翻訳機構に異常を認めること、ミトコンドリアに関連する遺伝子群に異常を認めることを明らかとした[1]。加齢卵子においてミトコンドリアリボソームタンパク質の翻訳異常を認めることで、ミトコンドリア内の電子伝達系構成タンパク質が十分に合成されず、減数分裂の進展に必要なATP産生が不十分となり、染色体異常発生に関与している可能性が考えられる。そこで本研究では、ミトコンドリアリボソームタンパク質の翻訳異常が加齢卵子におけるミトコンドリア機能異常を引き起こし、染色体異常発生の原因となっているかを検証することを目的とした。

方　法

1. 動物モデル

本研究は、カリフォルニア大学サンフランシスコ校（University of California, San Francisco; UCSF）および東京大学の倫理委員会に承認され、行われた。本研究ではC57BL6マウスを用い、12時間の明暗サイクル、温度18–23℃、湿度40–60％の環境下で飼育した。若年マウスとして1ヶ月齢、加齢マウスとして12–15ヶ月齢の雌マウスを使用した。C57BL/6-Zp3CreRpl22tm1.1Psam（RiboTag$^{F/F}$;Zp3-Cre）マウスおよびCpeb1$^{F/+}$;Zp3-Cre（CPEB1ヘテロ）雌マウスはUCSFで飼育した。

2. RiboTag-IP/RNA-Seq

若年および加齢のRiboTag$^{F/F}$;Zp3-Creマウス（卵子特異的にリボソームタンパクRpl22にHA tagが挿入されるtransgenicマウス）からM2卵子を採取し、HA抗体による免疫沈降後にRNA-Seqを行った。また、若年RiboTag$^{F/F}$;Zp3-CreマウスのGV卵子を体外培養し、0, 2, 4, 6, 8時間で同様にRiboTag-IP/RNA-Seqを行った。

3. YFP reporter assay

プラスミドを用いて*Mrpl3*の3末端側非翻訳領域（3'-Untrranslated Region; 3'-UTR）をYFPレポーターに導入しmRNAを作成した。GV卵子を採取し、YFPレポーターとmCherryレポーターを細胞内に注入した。その後、タイムラプス顕微鏡下で卵子を体外培養し、YFPとmCherryの蛍光発現の変化を経時的に評価した。翻訳率は、YFP/mCherry比を用いて、一定時間間隔における単純直線回帰曲線の傾きとして計算した。

結　果

1. 加齢卵子ではミトコンドリアリボソームタンパク質の翻訳異常を認める

RiboTag-IP/RNA-Seqのデータを用いて、ミトコンドリア関連遺伝子を比較すると、若年卵子と加齢卵子では発現が異なることが明らかとなった（Fig1a）。また、ミトコンドリアリボソームタンパク質の転写（Input）と翻訳（TE）を比較すると、加齢卵子では翻訳異常を認めた（Fig1b）。加齢卵子では、ミトコンドリアの機能に関連する遺伝子の翻訳異常が認められ、またミトコンドリアリボソームタンパク質の翻訳異常を認めることが明らかとなった（Fig 1）。

2. 若年卵子におけるミトコンドリアリボソームタンパク質の翻訳変化

卵子の成熟過程におけるミトコンドリアリボソームタンパク質の翻訳変化を若年卵子のRiboTag-IP/RNA-Seqで経時的に評価を行うと増加、減少、不変と3つのパターンを認めることが明らかとなった（Fig2）。*Mrpl3*のYFPレポーターアッセイを行うと、GVBD後からYFP発現が増加し、RiboTag-IP/RNA-Seqと同様の傾向を示した（Fig. 3）。

3. 加齢卵子ではMrpl3の翻訳低下を認める

若年卵子と加齢卵子でMrpl3の翻訳変化を比較すると、加齢卵子では若年卵子よりYFP発現の低下および、翻訳の低下を認めた（Fig 4）。

4. CPEB1の減少がミトコンドリアリボソームmRNAの翻訳変化に与える影響

我々はこれまでの研究でCPEB1が加齢卵子の翻訳異常に大きく関与していることを報告している。加齢卵子ではCPEB1のタンパク質発現が50％減少していることから、CPEB1タンパク質が50％減少したCPEB1ヘテロ卵子を用いて、Mrpl3の翻訳変化を比較した。CPEB 1ヘテロ卵子でも、加齢卵子と同様に、Mrpl3の翻訳低下を認めた（Fig 5）。

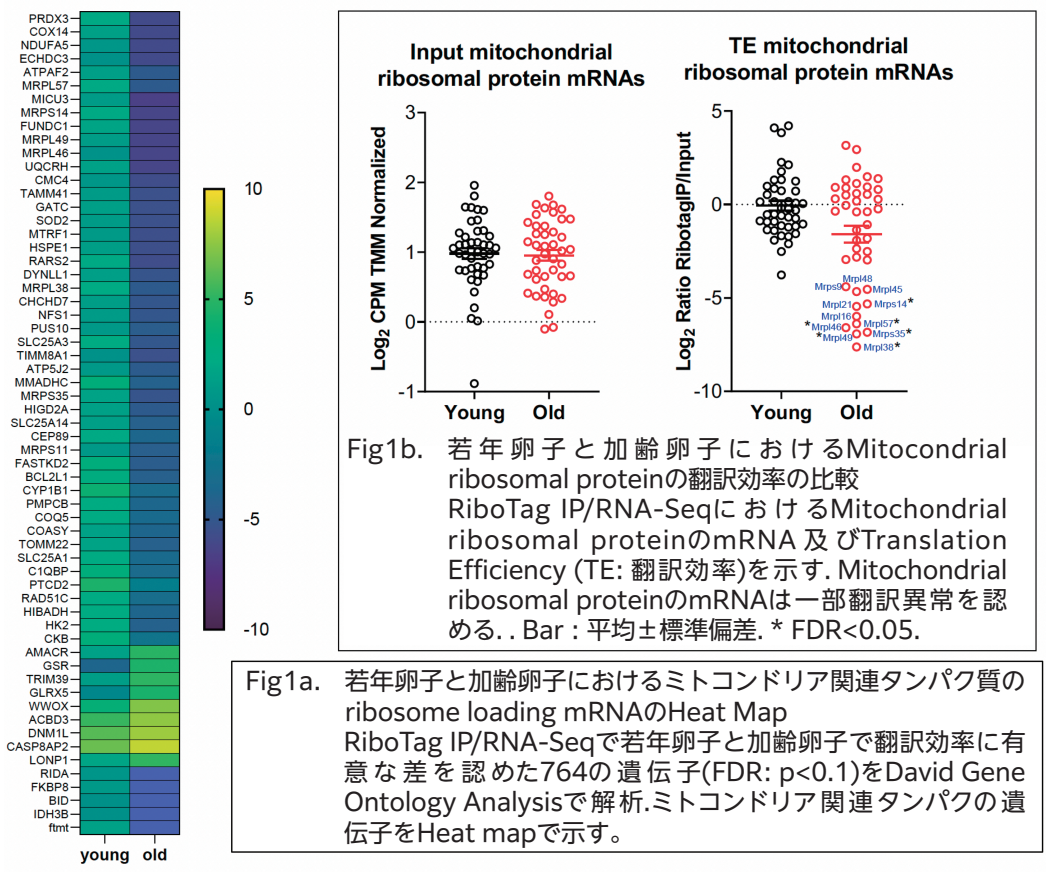

Fig1b. 若年卵子と加齢卵子におけるMitocondrial ribosomal proteinの翻訳効率の比較
RiboTag IP/RNA-Seqにおけるmitochondrial ribosomal proteinのmRNA及びTranslation Efficiency (TE: 翻訳効率)を示す. Mitochondrial ribosomal proteinのmRNAは一部翻訳異常を認める. . Bar : 平均±標準偏差. * FDR<0.05.

Fig1a. 若年卵子と加齢卵子におけるミトコンドリア関連タンパク質のribosome loading mRNAのHeat Map
RiboTag IP/RNA-Seqで若年卵子と加齢卵子で翻訳効率に有意な差を認めた764の遺伝子(FDR: p<0.1)をDavid Gene Ontology Analysisで解析.ミトコンドリア関連タンパクの遺伝子をHeat mapで示す。

Fig1.

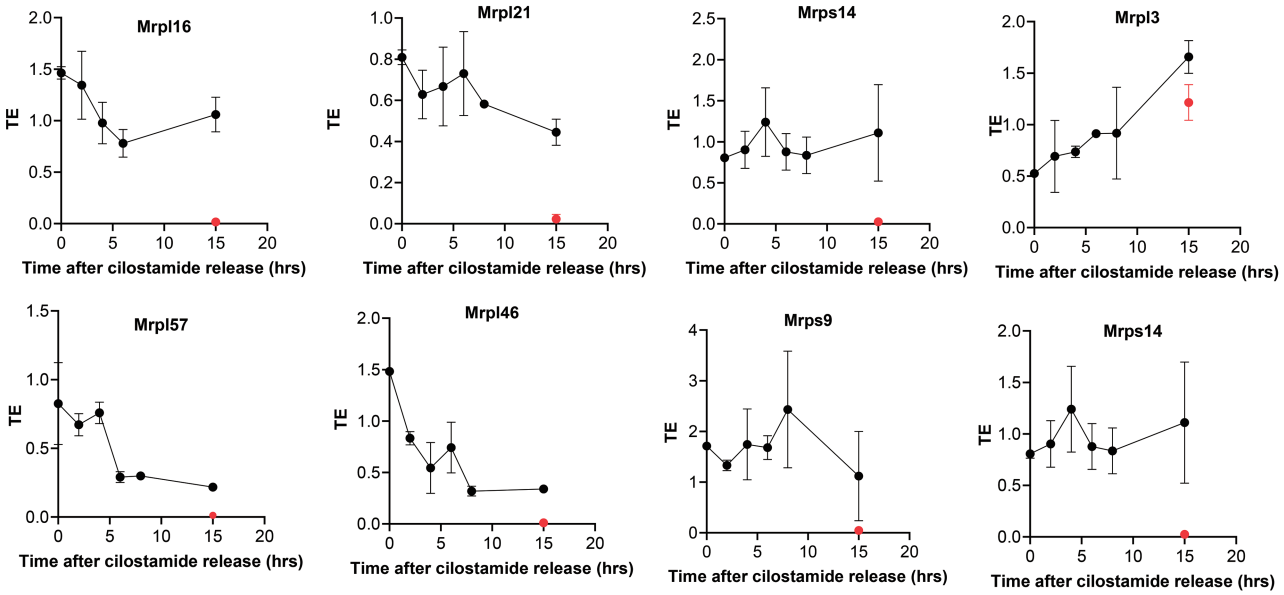

Fig2. RiboTag/IP RNA-Seqを用いた卵子の成熟過程におけるミトコンドリアリボソームタンパク質のmRNA翻訳の推移.

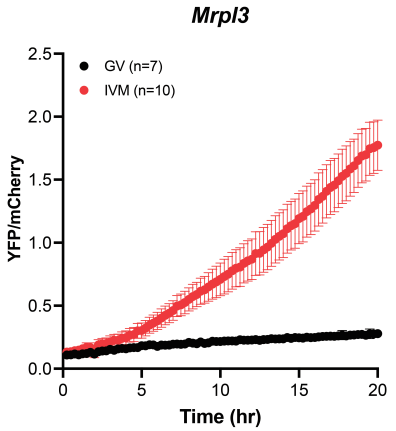

Fig3. 3'UTR YFPレポーターアッセイを用いた、若年卵子における成熟過程におけるMrpl3 mRNAの翻訳の経時的変化.

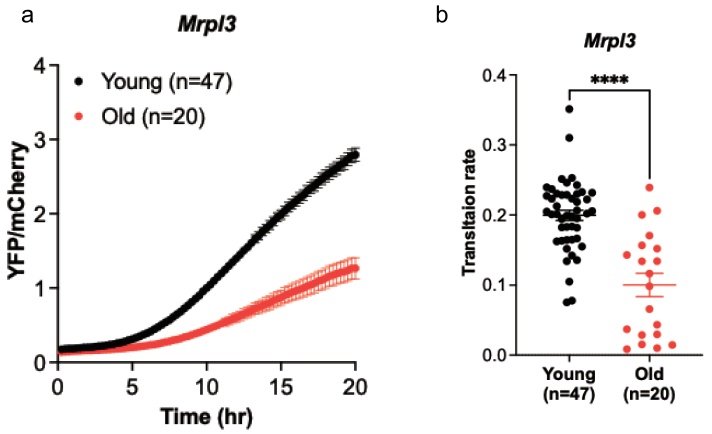

Fig4. 3'UTR YFPレポーターアッセイを用いた、若年卵子と加齢卵子における成熟過程におけるMrpl3 mRNAの翻訳の経時的変化.

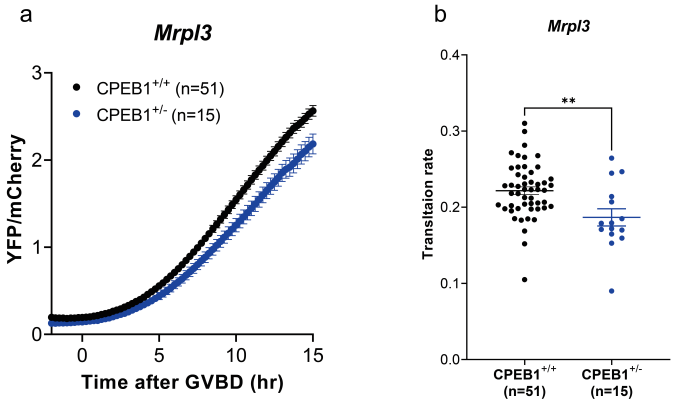

Fig5. 3'UTR YFPレポーターアッセイを用いた、controlとCPEB1hetero卵子における成熟過程におけるMrpl3 mRNAの翻訳の経時的変化.

考　察

本研究では、加齢卵子においてミトコンドリアリボソームの翻訳異常が認めること、また加齢に伴うCPEB1の減少により引き起こされていることを明らかとした。

ミトコンドリアはエネルギー産生を担う細胞内小器官で、構成タンパク質の99%は核内の遺伝子によりコードされている。ミトコンドリアリボソームは細胞質で合成され、ミトコンドリア内に輸送される。ミトコンドリアmRNAの翻訳にはミトコンドリアリボソームが不可欠であり、32個の小型MRP遺伝子にコードされる30個のタンパク質からなる28Sサブユニットと50個の大型MRP遺伝子によってコードされる52個のタンパク質からなる39Sサブユニットで構成されている。RiboTag-IP/RNA-Seqにおける翻訳の経時的変化を見ると、ミトコンドリアリボソームの翻訳パターンは増加、減少、一定と複数認めていた。Mrpl3は卵子の成熟過程において増加を認め、YFPレポーターアッセイでも同様の傾向を示した。本研究において、加齢に伴いミトコンドリアリボソームのmRNAの翻訳異常を認め、YFPレポーターアッセイでも、同様の翻訳異常を認めた。mtDNAは呼吸鎖複合体のサブユニットに関与するタンパク質をコードしており、加齢に伴うミトコンドリアリボソームの合成異常によって、不十分なATP産生を引き起こし、減数分裂の進展に影響を与えている可能性が考えられる。今後の検討によって、ミトコンドリアリボソームの異常が、卵子内におけるATP産生、ミトコンドリア機能、卵子の染色体異常を引き起こしているかどうかを検討していく。

卵子におけるmRNAの翻訳は3'-UTRにおけるポリアデニル化の調節によって行われ、CPEB1が卵子の翻訳制御において中心的な役割を担っている。CPEB1は3'-UTRのUUUA（A）Uという配列Cytoplasmic

Polyadenylation Element（CPE）に結合し，ポリアデニル鎖を調節している。CPEB1の特徴として、複数の翻訳調節を行っている点が挙げられる。GV期には翻訳を抑制し、GVBD後にはCPEB1がリン酸化され、促進的に働く[2]。本研究で着目したMrpl3は複数のCPE siteを有しており、CPEB1ヘテロ卵子においてMrpl3の翻訳低下を認めたことから、CPEB1依存的に翻訳調節をされていると考えられる。加齢に伴いCPEB1が減少していることから、CPEB1の減少によって、*Mrpl3*の翻訳異常を引き起こしていると考えられる。一方で加齢に伴うCPEB1の発現減少の原因は明らかとなっていない。加齢卵巣において線維化や酸化ストレスなどの局所環境の変化を認め、また卵丘細胞からの局所因子によって卵子のmRNA翻訳機構を調節し、胚発育に影響を与えていることが知られている[3]。今後の研究で加齢に伴う卵胞内の局所環境変化がCPEB1の発現に与える影響について検討を行っていく。加齢卵子にCPEB1の局所注入を行うことで翻訳異常が改善されることから1、CPEB1の正常化によって、ミトコンドリア翻訳異常を是正し、卵子の質の低下の改善につながる新たな治療戦略となる可能性がある。

本研究では、加齢卵子においてミトコンドリアリボソームの翻訳異常を認めることを*in vivo, in vitro*の動物モデルを用いて明らかとした。今後の研究によって、ミトコンドリアの翻訳異常が、加齢卵子の染色体異常にどのように関与しているかを明らかとしていきたい。

引用文献

1. Takahashi, N., Franciosi, F., Daldello, E. M., Luong, X. G., Althoff, P., Wang, X., and Conti, M. (2023) CPEB1-dependent disruption of the mRNA translation program in oocytes during maternal aging. *Nat. Commun.* 14, 416
2. Luong, X. G., Daldello, E. M., Rajkovic, G., Yang, C.-R., and Conti, M. (2020) Genome-wide analysis reveals a switch in the translational program upon oocyte meiotic resumption. *Nucleic Acids Res.*
3. Chen, J., Torcia, S., Xie, F., Lin, C. J., Cakmak, H., Franciosi, F., Horner, K., Onodera, C., Song, J. S., Cedars, M. I., Ramalho-Santos, M., and Conti, M. (2013) Somatic Cells Regulate Maternal mRNA Translation and Developmental Competence of Mouse Oocytes. *Nat. Cell Biol.* 15, 1415–1423

Abstract

Female fertility declines with aging. It is established that the decline in fertility in an aging woman is caused by a decrease in oocyte quantity and quality. Mitochondrion function is critical to meet the energetic demands of the oocyte during nuclear and cytoplasmic maturation. Mitochondrial DNA codes proteins which are required for oxidative phosphorylation. Mitochondrial ribosomal protein is crucial for translation of mitochondrial DNA. Mitochondrial ribosomal proteins are nuclear encoded, synthesized in the cytoplasm, and transferred to mitochondria. However, it is unclear whether mitochondrial translation in oocytes is impaired with aging. The aim of our study is to define the defects in translation of mitochondrial ribosomal proteins during aging. We performed RiboTag-IP/RNA-Seq on MII oocytes from young (1-month-old) and old (12–15-month-old) mice. Translation of mitochondrial ribosomal protein is impaired in old oocytes. YFP reporter assay showed reduced Mrpl3 translation in old oocytes. Cytoplasmic element binding protein 1(CPEB1) is the master regulator of translation during oocyte maturation. CPEB1 expression is decreased in old oocytes by 50 %. CPEB1 heterozygous oocyte recapitulated decreased translation of Mrpl3 in old oocytes. These findings suggest that age-related CPEB1 reduction impairs translation of mitochondrial ribosomal protein, decreasing ATP production and contributing to chromosomal abnormalities.