

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和 6 年 4 月 22 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 順天堂大学
職 名 講師
研究代表者 杉浦 歩

下記のとおり令和5年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 23020)

1. 共同研究課題名	マウス初期胚発生におけるペルオキシソームを中心としたオルガネラネットワーク		
2. 共同研究目的	生体調節研究所細胞構造分野の所持する長期ライブイメージ装置 CV-1000 および CSU W-1 を用いて、マウス初期胚発生におけるペルオキシソームを中心としたオルガネラネットワークの時空間的機能の解明を目指す。		
3. 共同研究期間	令和5年4月1日 ~ 令和6年3月31日		
4. 共同研究組織			
氏 名	所属等	職名等	役割分担
(研究代表者) 杉浦 歩	順天堂大学大学院医学研究科	職名:講師 学位:博士(生命科学) 取得年月日:2012.3.17	研究の総括 実験の実施、データ解析
(分担研究者) 佐藤 裕公	群馬大学生体調節研究所	准教授	実験の実施
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	細胞構造分野	氏 名 佐藤 健

次の6, 7, 8の項目は、枠を自由に変更できます(横幅は変更不可)。6, 7, 8の項目全体では2頁に収めてください。

6. 共同研究計画

ペルオキシソームは脂肪酸の β 酸化など細胞内代謝の重要なオルガネラである。その代謝活性は数や他のオルガネラとの相互作用により調節されているが、哺乳類の初期胚発生におけるペルオキシソームの解析はほとんど進んでいない。研究代表者はこれまでの予備的な実験において、ペルオキシソームが発生とともにクラスターを形成し、減少していく結果を得たが、詳細なダイナミクスや他のオルガネラとの相互作用については未知であった。その解析には長期に細胞内構造を観察できる顕微鏡システムが必須である。本研究課題では、当該施設の CV-1000 および CSU W-1 を用いて、マウス卵の成熟～受精～初期胚発生におけるペルオキシソームを中心としたオルガネラネットワークを時空間的に解析し、その分子機構や機能の解明を目指す。野生型やオルガネラ蛍光標識トランスジェニックマウスの受精卵にオルガネラを蛍光標識するタンパク質の mRNA をマイクロインジェクションし、初期胚発生におけるオルガネラネットワークを時空間的に解析する。また同様の実験を MII 期の未受精卵で行うことにより、卵の成熟化～受精卵への変遷時におけるオルガネラネットワークを時空間的に解析する。

7. 共同研究の成果

本研究課題ではペルオキシソームの内腔標的タンパク質、あるいはペルオキシソームの機能調節や分解に関わるタンパク質の mRNA を 1 細胞期のマウス受精卵にマイクロインジェクションし、2 細胞期から胚盤胞期までのペルオキシソームの動態やその関連因子をライブイメージングにより時空間的に解析した。ペルオキシソーム内腔への輸送は C 末端の 3 つのアミノ酸 (SKL など) で十分に行われる。単純にペルオキシソームの動態を調べるために用いた mCherry2-SKL の結果より、ペルオキシソームは 2 細胞前期までは受精卵全体に分散しているが、その後クラスターを形成することが観察された。さらに、ペルオキシソームクラスターは胚盤胞期まで大きくなった後に縮小し、ペルオキシソーム数も減少していることが観察され、ペルオキシソームの分解が起きていることが示唆された。次に、ペルオキシソーム分解がリソソームを介したペキソファジーであるかを検証するために、EGFP-mCherry2-SKL を用いた実験を行なった。EGFP-mCherry2-SKL はそれぞれの蛍光タンパク質の pH 感受性を利用して、ペキソファジーフラックスを解析するプローブである。その観察結果より、桑実胚から胚盤胞期への移行期にリソソームを介して分解されることが確認された。さらに、ペルオキシソーム分解の分子機構を解明するために、PEX5 を候補因子として検討実験を行なった。PEX5 はペルオキシソーム内腔タンパク質の輸送や分解に関わる細胞質のタンパク質である。PEX5-EGFP は蛍光シグナルが確認できる発現初期の 2 細胞期から、イメージングを終える胚盤胞期までペルオキシソームに優位に局在していた。PEX5 は通常培養細胞では細胞質に観察されるが、ストレス依存的なペキソファジーの時にペルオキシソームへ蓄積し、ペキソファジー受容体として機能する。しかし、受精卵ではペルオキシソームへの蓄積 (2 細胞期) と分解 (胚盤胞期) までに 2~3 日間という大きな時間差があるため、PEX5 のペルオキシソーム動態や分解など細胞機能学的な意義について理解を得るためには、さらなる解析が必要である。

以上の結果より、マウス受精卵におけるペルオキシソームの動態変化、リソソームによる分解とその正確な時期を同定することができた。これらの成果は、優れた時空間解像能を有するライブイメージングシステムを用いたからこそ得ることができた、これまでに報告例のない重要な発見である。現在、さらなる解析を進めるとともに論文報告準備中である。また、本研究課題を遂行する過程で、ペルオキシソームなど細胞内の小さな構造の撮像には CSU W-1 システムがより最適であることも判明した。今後もライブイメージングには CSU W-1 を使用し、輝度定量などの実験には CV-1000 を使用するなど、両システムの特性を活かして、さらに解析を進めていく予定である。

8. 共同研究成果に関連する学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文, 又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等をできる限り記載してください。なお, 論文の場合は, PDFファイルを以下の研究所庶務係のメールアドレスまで報告書と併せてお送りください。) 研究所庶務係 e-mail : kk-msomu4@ml.gunma-u.ac.jp

①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

②この共同研究に基づくとの記載のある論文

③学会発表を行った主なもの3件以内(学会名, 開催日, 演題)

- 第15回オートファジー研究会、2023年11月28日、発生過程におけるペキソファジー

④本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)

- 実験計画、実験結果、解析結果についてメールやオンライン会議システム等で話し合った。