

初期胚発生におけるオートファジーの新しい役割

The Role of Autophagy during Early Embryogenesis in Mice

塚本 智史^a, 岸 千絵子^b, 水島 昇^b

Satoshi Tsukamoto, Chieko Kishi and Noboru Mizushima

^a(独)放射線医学総合研究所 実験動物開発管理課・先端動物実験推進室^b東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 細胞生理学分野

要旨 卵子は100%母親由来の細胞であり、卵細胞質には母性の mRNA やタンパク質が蓄えられている。精子と融合して受精卵となった直後の細胞質にもこれらの母性因子は持ち込まれる。その後急速に分解され、受精卵由来の mRNA やタンパク質が発現する。受精してから着床するまでが4日間であることを考えると、母性因子の除去には大規模な分解系が関与すると思われる。オートファジーはリソソームを分解の場とする細胞質成分の大規模な分解系である。これまで出生以前の胚発生におけるオートファジーの役割は不明であったが、筆者らはマウスの受精卵で活発にオートファジーが起こることを発見した。実際に、受精直後のオートファジーを欠損した受精卵は着床前致死になることも明らかとなった。母性タンパク質が受精直後のオートファジーによって大規模に分解され、その分解産物であるアミノ酸は着床するまでの胚発生に必要であることを示唆している。

キーワード：卵子，受精卵，オートファジー，Atg5，着床

1. はじめに

卵子や精子は究極に分化した細胞と考えられるが、受精によって再び全能性をもつ1つの細胞すなわち受精卵となる。受精卵として発生するためにはあらかじめ卵子に蓄えられていた mRNA やタンパク質などの母性因子を分解し、受精卵ゲノムにコードされる mRNA やタンパク質に入れ替えることが必要である。しかし、マウスでは卵子形成過程で発現して成熟卵子に蓄えられる遺伝子の総数は全遺伝子の20～45%にも達すると言われており^{1,2)}、それらを短時間でかつ効率的に分解するには大規模な分解系の関与が想定される。一方、受精後の1細胞後期からはすでに受精卵ゲノムに由来する転写が起り始め、2細胞期では劇的に転写が活性化することが明らかとなっている^{3,4)}。タンパク質レベルでは4～8細胞期にかけて発現パターンが著しく変化することを1975年にBlerkomらが報告している⁵⁾。したがって、受精卵では大規模な分解と同時に合成も起こっていると考えられる。最近の研究から、母性 mRNA は受精後に発現する二十数塩基からなる小さな RNA (マイクロ RNA) によって選択的に分解されることが示された⁶⁾。しかし、卵子由来のタンパク質分解の機構については、一部のタンパク質の分解にユビキチン・プロテアソーム系が関与すること⁷⁾を除けばほとんど未解明であった。

2. 母性因子の分解機構と胚発生における役割

2.1 受精直後にはオートファジーが活性化する

最近、筆者らは全身のオートファゴソームが緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein) で蛍光標識されたマウス (GFP-LC3 マウス) を用いることによって、受精卵でオートファジーが活発に起こることを見いだした (図1)⁸⁾。受精直後に誘導されるオートファジーによって卵子由来のタンパク質が大規模に分解されていることが予想された。そこで、GFP-LC3 マウスの受精卵で観察されたオートファジーをより詳細に調べるために電子顕微鏡を用いて観察を行った。電子顕微鏡を使った受精卵の観察自体は古くから行われてきたが、筆者らの調べた範囲では、オートファジーに焦点を当てた解析は見つからなかった。そこで、野生型の雌マウスを雄マウスと交配させた2日後に2細胞期の胚を回収し電子顕微鏡を用いて丹念に観察することにした。その結果、二重膜からなるオートファゴソームやオートリソソーム様の構造体を観察することに成功した (図2)。それらの直径は、他の哺乳類細胞と大きな差はなく約0.5～1 μmであった。また、マウス繊維芽細胞などの哺乳類細胞と同様に、二重膜が細胞質の一部分を囲っている像が観察された (図2)。細胞質には、オートファゴソームによく似た他の膜構造体も多数観察されるため、一見してオートファゴソームとそれらの膜構造体を識別することは困難であった。そのため、これまで通常電子顕微鏡解析によってオートファゴソームが受精卵に観察されたという報告はなかったのかもしれない。しかし、LC3抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析によって、それらの構造体は受

^a 〒263-8555 千葉県千葉市稲毛区穴川4-9-1

^b 〒113-0034 東京都文京区湯島1-5-45

2010年2月22日受付

精卵におけるオートファゴソームやオートリソソーム構造体であることが明らかとなった⁸⁾。

興味深いことに、受精直後に誘導されたオートファジーは、受精卵が1細胞から2細胞へと分裂する際には一時的に抑制されることが分かった(図1)。この時期の細胞質には核膜崩壊によってリプログラミング因子などの核内因子が放出されるようであり⁹⁾、この因子の分解を最小限にとどめるためか、あるいは放出された核内因子によってオートファジーが一時的に抑制されている可能性がある。受精卵の発生段階によってオートファゴソームの局在が異なるのも興味深い点である。1細胞期の胚では細胞質全体に、2細胞期や4細胞期の胚では細胞膜の周辺部にオートファゴソームが多く観察された。なぜ、発生段階によってオートファゴソームの局在が異なるのか今のところはっきりしないが、上述した核内因子の放出などが原因で、オートファゴソームの局在が変化するのかもしれない。

また、受精直後のオートファジーは、一般的によく知られている飢餓応答とは異なる分子メカニズムで誘導されるようである。受精した胚は輸卵管内で发育する。輸卵管液中にはアミノ酸などの栄養は豊富に含まれていることから¹⁰⁾、飢餓によってオートファジーが誘導されたとは考えにくい。さらに、受精して3時間まではオートファジーは抑制されていることから、排卵による刺激でオートファジーが誘導されたとも考えにくい。何が引き金になってオートファジーが誘導されるのかは未解明だが、受精直後から卵細胞質ではカルシウム濃度の定期的な変動(カルシウムオシレーションという)が起こり、結果としてオートファジーが誘導される可能性が

ある。実際に、卵子にカルシウムオシレーションを誘導する薬剤を処理するとオートファジーが活性化することからも、カルシウムオシレーションが関与していると考えられる。このように、受精直後のオートファジー誘導は時空間的に巧妙に制御されている。

2.2 オートファジーは着床前胚の発生に必要である

では、筆者らが発見した受精卵のオートファジーは胚発生にとって本当に必要なのだろうか。現在までにオートファジーに関連する遺伝子(Atg)群が33個同定されており、そのうち全身の組織でAtg5やAtg7をノックアウトしたマウスでも出生までは正常であることから^{11,12)}、それまでの胚発生にオートファジーは必要ないようにも思える。しかし、単純ノックアウトマウスを用いた実験では、受精卵でオートファジーが機能する可能性があったのである。Atg5の全身ノックアウトマウスは、遺伝子型がヘテロ(Atg5^{+/-})の雌雄を交配させて一定の割合で得ることができる。この際ヘテロ由来の排卵卵子には卵子形成の過程で細胞質にAtg5タンパク質が蓄積され、受精直後にはAtg5タンパク質が持ち込まれて機能することになる。つまり、遺伝子型が見かけ上ホモ(Atg5^{-/-})の受精卵でも、卵細胞質にはAtg5タンパク質がありオートファジーが機能することが可能であった。実際にヘテロマウス同士の交配から得られたホモの受精卵ではオートファジーが誘導することが明らかとなっている。そこで、筆者らは受精直後のオートファジーを完全に抑制するために、卵子特異的にAtg5を欠損したコンディショナルノックアウトマウス(卵特異的Atg5ノックアウトマウス)を作製して、この時期のオートファジーの必要性について調べることにした。このノックアウトマウスでは卵子形成の初期からオートファジーが抑制されるため、卵子形成や成熟に異常が生じることも考えられたが、これらの過程は正常であった。そこで、卵特異的Atg5ノックアウト雌マウスとAtg5ヘテロ雄マウスを同居させて、それらの交配から得られた産仔の遺伝子型を調べることにした。その結果、産仔のすべてがAtg5⁺の精子に由来するものであり、Atg5⁻の精子由来の産仔は一匹も生まれなかったことが分かった。この結果は、受精直

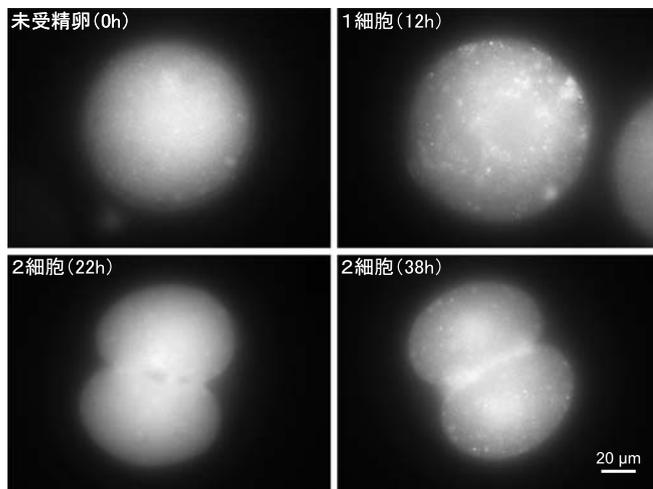


図1 受精卵で起こるオートファジーの様子

GFP-LC3マウスの卵子と野生型マウスの精子を用いて体外受精を行った後に、GFP-LC3のドット(オートファゴソーム)を経時的に観察した。受精前の未受精卵(0h)ではオートファジーは観察されないが、受精12時間後には多数のオートファゴソームを示すドットが観察される。分裂直後の受精22時間後には一時的にオートファジーは抑制されている様子が分かる。受精38時間後には再びオートファジーが活性化している。括弧内は体外受精後の時間を示す。スケールバーは20 μm。

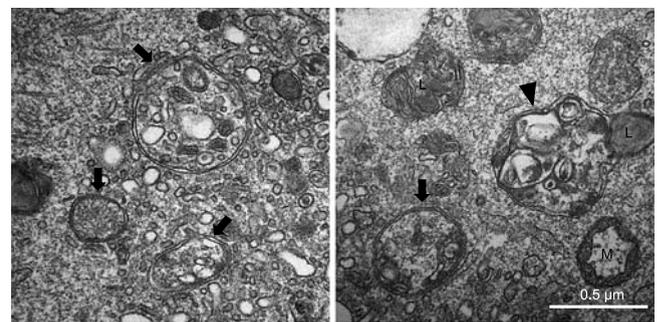


図2 電子顕微鏡で観察した2細胞期胚のオートファジー
野性型マウスから得られた受精後1.5日目の2細胞期胚では、多数のオートファゴソーム(矢印)やオートリソソーム(矢じり)が観察される。MとLはそれぞれミトコンドリアとリソソームを示す。スケールバーは0.5 μm。文献8より改変。

後のオートファジーを完全に欠損すると胚性致死になる可能性を示唆していた。一方で、卵特異的にオートファジーを欠損しても、受精後に胚 (Atg5+ 精子) 由来の Atg5 が発現すれば胚発生は正常に起こると考えられ、この時期のオートファジーの必要性を示す結果でもあった。次に、オートファジー欠損卵が受精後のどの時期まで発生するかを検討することにした。Atg5 ヘテロ雄と交配させて3日後に卵特異的 Atg5 ノックアウト雌の子宮から胚盤胞 (プラストシスト) を採取した。得られたプラストシストを形態的に分類したところ、正常なプラストシストと4~8細胞期の胚が混在していることが分かった。これらの受精卵を体外で1日培養したところ、正常なプラストシストは発生するものの4~8細胞期の胚はそのままの形態であった。遺伝子型判定の結果、正常なプラストシストはすべてが Atg5+ の精子由来であることも明らかとなった。また、上記と同様の交配によって得た2細胞期の胚をプラストシストまで体外発生させたところ、4~8細胞期の胚までは正常に発生するもののプラストシストまで達するものは全体の30%前後であった。これらの結果から、Atg5- の精子と受精したオートファジー完全欠損卵は着床前の4~8細胞期で致死となると結論付けられた。

2.3 受精卵におけるオートファジーの役割

オートファジー欠損卵が着床前致死になる理由は定かではないが、4~8細胞期のオートファジー欠損卵では新規のタンパク質合成率が低下することが明らかとなった。可能性の一つとして、受精直後に誘導されるオートファジーによって卵子由来のタンパク質が分解され、その分解産物であるアミノ酸が新規のタンパク質合成に利用されていると考えられる。他の可能性としては、オートファジーによって胚発生に影響を与える細胞質因子が積極的に除去されるとも考えられるが、証明するまでには至っていない。

マウスの受精卵を用いた体外培養は古くから行われており、数種類の培養液がこれまでに開発されている¹³⁾。最近では、培地中にアミノ酸を添加した培養液が主流になりつつあるが、アミノ酸を添加しない培地でも受精卵は発生することができる¹⁴⁾。したがって、オートファジーによる分解産物であるアミノ酸は着床までの栄養源になっているとも考えられる。Schultzらは、各時期の受精卵内のアミノ酸濃度を測定して8細胞期にアミノ酸含量が増加することを報告している¹⁵⁾。オートファジー欠損卵が致死になるのも4~8細胞期にかけてであることから、細胞内のアミノ酸不足によって胚発生が停止した可能性も否定できない。さらに受精卵のオートファジー活性の変動は、mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) の活性と逆相関の関係にあることも分かった。mTORはオートファジー経路に関わる中心的な分子であり

栄養のセンサーとしての役割も担っている。したがって、受精直後のオートファジーは胚の栄養要求性とも密接に関連した自給自足のシステムとも言えるだろう。

3. おわりに

受精卵の発生は短期間のうちに起こり、マウスでは受精して4日後には子宮に着床する。着床時の受精卵 (プラストシスト) を構成する細胞数はおよそ100個である。受精直後にはわずか1細胞だったことを考えると受精卵は劇的な変貌を成し遂げる。その中でも卵子にあらかじめ蓄えられていた膨大な情報を消去することは、受精卵として成長するために必要不可欠と言える。受精卵にしてみればオートファジーのような大規模な分解システムを正常に作動させることが全能性を獲得するために必須なのかもしれない。

最近の研究からオートファジーの多彩な役割が次々と明らかになっているが、初期胚における役割については未だ不明な点が多い。今後さらなる研究によって胚発生におけるオートファジーの新しい役割が解明されることを期待したい。

文 献

- 1) Evsikov, A.V., Graber, J.H., Brockman, J.M., Hampl, A., Holbrook, A.E., Singh, P., Eppig, J.J., Solter, D. and Knowles, B.B.: *Genes Dev.*, **20**, 2713-2727 (2006)
- 2) Stitzel, M.L. and Seydoux, G.: *Science*, **316**, 407-408 (2007)
- 3) Aoki, F., Worrall, D.M. and Schultz, R.M.: *Dev. Biol.*, **181**, 296-307 (1997)
- 4) Schultz, R.M.: *Bioessays*, **15**, 531-538 (1993)
- 5) van Blerkom, J. and Brockway, G.O.: *Dev. Biol.*, **44**, 148-157 (1975)
- 6) Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A.J. and Schier, A.F.: *Science*, **312**, 75-79 (2006)
- 7) DeRenzo, C. and Seydoux, G.: *Trends Cell Biol.*, **14**, 420-426 (2004)
- 8) Tsukamoto, S., Kuma, A., Murakami, M., Kishi, C., Yamamoto, A. and Mizushima, N.: *Science*, **321**, 117-120 (2008)
- 9) Egli, D., Rosains, J., Birkhoff, G. and Eggan, K.: *Nature*, **447**, 679-685 (2007)
- 10) Van Winkle, L.J. and Dickinson, H.R.: *Biol. Reprod.*, **52**, 96-104 (1995)
- 11) Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T. and Mizushima, N.: *Nature*, **432**, 1032-1036 (2004)
- 12) Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K. and Chiba, T.: *J. Cell Biol.*, **169**, 425-434 (2005)
- 13) Whittingham, D.G.: *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **14**, 7-21 (1971)
- 14) Ho, Y., Wigglesworth, K., Eppig, J.J. and Schultz, R.M.: *Mol. Reprod. Dev.*, **41**, 232-238 (1995)
- 15) Schultz, G.A., Kaye, P.L., McKay, D.J. and Johnson, M.H.: *J. Reprod. Fertil.*, **61**, 387-393 (1981)