

特別講演要旨

マウス初期胚発生におけるオートファジーの役割

The role of autophagy of early embryonic development in mice

塚本 智史
Satoshi Tsukamoto

独立行政法人 放射線医学総合研究所・研究基盤センター・生物研究推進課
Laboratory Animal and Genome Sciences Section, National Institute of Radiological Sciences

Summary

After fertilization, maternal products which are stored during oogenesis are rapidly degraded and newly zygotic products are synthesized in most animals. This transition, known as an oocyte-to-embryo transition, is critical step for further embryonic development. Considering that the process occurs quickly, bulk degradation system could be highly activated to eliminate maternal products and recycle them to synthesize newly products. We have demonstrated that autophagy, which is cytoplasmic bulk degradation system mediated by the lysosome, is highly induced after fertilization, and autophagy-deficient embryo dies before implantation, suggesting that autophagy is essential for preimplantation embryonic development. Our recent studies also revealed that lysosomal size and number changes during the embryonic development. Here we will briefly review the autophagy, and discuss the function of autophagy and lysosome in early mouse embryogenesis.

はじめに

オートファジーはオートファゴソームと呼ばれる二重膜で取り囲んだ細胞質成分をリソソームでまとめて分解する経路である。オートファジーの主な役割は栄養不良時などのアミノ酸供給と細胞質の品質管理であるが、近年ではこれらの他にもオートファジーの多彩な生理機能が次々と明らかになっている。受精直後には、あらかじめ卵細胞質に蓄えられたタンパク質などの母性因子は大規模に分解され、受精卵由来のタンパク質へと入れ替わる。この入れ替わりは卵性から胚性への移行（Oocyte-to-Embryo transition）と呼ばれ、その後の正常な胚発生に極めて重要なプロセスである。本項では、オートファジーの受精卵発生における役割について概説する。

オートファジーとは

オートファジーとは、タンパク質やオルガネラなどを含んだ細胞質の一部がリソソームで分解される経路である[1]。厳密には、オートファジーはマクロオートファジー、マイクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジーの3つに分類されるが、これらの中でもマクロオートファジーの研究が最も盛んに行われており、一般的にオートファジーというとマクロオートファジーを示す。本項で概説するオートファジーもマクロオートファジーを示している。オートファジーの過程は大きく誘導、膜の伸長、細胞質の取り囲み、リソソームとの融合そして分解というステップに区別できる（図1）。すなわち、オートファジーが誘導されると細胞質に隔離膜と呼ばれる二重膜が出現し、この膜が伸長しながら自身の細胞質成分を取り囲む。この取り囲んだ構造体はオートファゴソームと呼ばれるが、オートファゴソームによる取り囲みには選択性がないため（一部例外がある）、オートファゴソームの内部にはタンパク質

のみならず、ミトコンドリアやペルオキシソームなどのオルガネラも含まれる。最終的にオートファゴソームの外膜とリソソーム膜とが融合することで、リソソーム内の消化酵素によって隔離された細胞質成分が分解される。オートファジーは飢餓状態で活発に誘導されることから、分解産物であるアミノ酸は細胞質中でリサイクルされ栄養となる。この栄養飢餓に対する役割は種間で保存されたオートファジーの最も重要な役割の1つである。一方で、活発に誘導されるオートファジーは対照的に、低いレベルのオートファジー（恒常的なオートファジーと呼ばれる）は、細胞質で不要になった成分の分解や代謝を亢進することで細胞質の品質管理を担っている。例えば、神経細胞や肝細胞でオートファジーを特異的に欠損すると、ユビキチン陽性のタンパク質凝集体や封入体が蓄積することが明らかとなっている[2-4]。これらのことからオートファジーとユビキチン・プロテアソーム系が協調的に働いており、ユビキチン・プロテアソーム系だけでは分解しきれないような異常タンパク質や凝集体などを選択的に分解

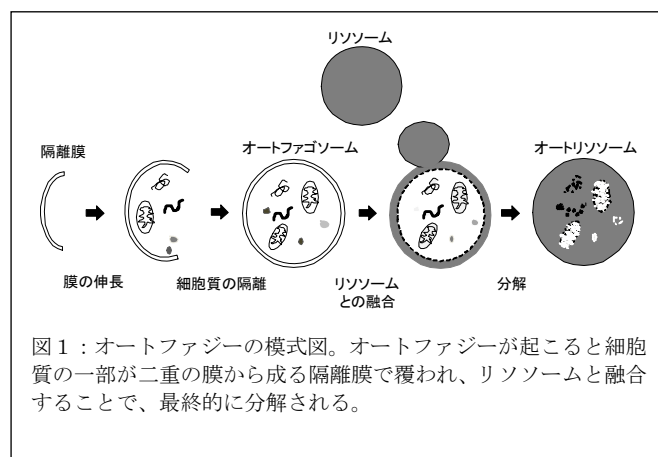


図1：オートファジーの模式図。オートファジーが起こると細胞質の一部が二重の膜から成る隔離膜で覆われ、リソソームと融合することで、最終的に分解される。

していると考えられている。近年ではこの他にも抗老化、発がん抑制、病原微生物の除去や抗原提示など次々と新たなオートファジーの役割が明らかとなっている。最近では、オートファジーによる選択的な分解機構も明らかになってきており、特にオートファジーによるミトコンドリアの選択的分解はマイトファジー、ペルオキシソームはペキソファジー、脂肪滴はリポファジー、病原微生物（ウイルスなど）はゼノファジーなどと呼ばれている。

オートファジーに関わる遺伝子

主に酵母を使った遺伝学的研究から、これまでに30種以上のATG (autophagy related) 遺伝子が見つかり、それらの多くがヒトを含む真核生物に保存されていることが分かっている。ATG 遺伝子群の中で、酵母 Atg8 のホモログに相当する LC3 (Microtubule associated protein Light Chain 3) は、オートファゴソーム膜特異的に安定して結合するタンパク質である[5]。このタンパク質に緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescent protein: GFP) などの蛍光タンパク質を融合させて局在や動態を観察することは、オートファジーを観察するスタンダードな手法となっている。水島らによって開発された全身の臓器で GFP-LC3 タンパク質を発現するトランスジェニックマウス (GFP-LC3 マウス) によって、個体レベルのオートファジーの可視化が可能となり、オートファジーが飢餓によって亢進することが明らかとなった。

一方で、隔離膜の伸長やオートファゴソームの形成に関わる Atg5 や Atg7 の遺伝子を破壊することで、オートファジーが完全に抑制される。Atg5 や Atg7 の全身ノックアウトマウスは出生直後に極度の栄養不良に陥って死亡することが明らかとなった[6,7]。この主な原因は出生直後には胎盤からの栄養供給が途絶え一時的に飢餓状態になるために（母親のお腹の中では胎盤を介した栄養供給が行われている）、オートファジーを誘導して生存に必要な栄養を確保しているためだと考えられる。その後、さらに Atg5 や Atg7 を組織特異的にノックアウトしたマウス（コンディショナルノックアウトマウス）が開発され、組織や臓器ごとのオートファジーの役割が次々と明らかになっている。オートファジーの組織や臓器における生理機能の詳細については、水島と小松らのレビューを参照して頂きたい[8]。

発生・分化におけるオートファジーの役割

下等動物の発生や分化過程におけるオートファジーの役割については古くから調べられており、オートファジーの機能不全によって発生や分化過程に異常をきたすことが報告されている。これらの異常はオートファジーの分解不全によって生じるものだと考えられるが、線虫では体細胞からの生殖基質 (P-granules) の選択的な分解にオートファジーが関与することも報告されている[9]。一方で、真核生物の発生や分化過程、特に受精卵の発生過程における

オートファジーの生理機能についてはよく分かっていなかった。正確にはあまり意味がないと思われるかもしれない。なぜなら、前述したように全身の組織でオートファジーを欠損した Atg5 や Atg7 ノックアウトマウスでも出生直後までは正常に発育することから、それまでの胚発生過程にオートファジーは必要ないと考えられていたからである。しかし、筆者らは GFP-LC3 マウスの受精卵でオートファジーが活発に起こっていることを発見した[10]。全身 Atg5 ノックアウトマウスは、ヘテロ (Atg5^{+/-}) 同士の交配によって得ることができる。したがって、ヘテロメスマウスからはそれぞれ Atg5⁺ と Atg5⁻ の遺伝子型を持つ一倍体の卵子が作られるが、卵成熟の過程では1つの卵細胞中に Atg5⁺ と Atg5⁻ の遺伝子型 (Atg5^{+/-}) が存在している。すなわち、最終的に排卵される卵子の遺伝子型は Atg5⁻ であっても、その卵子の細胞質中には成熟過程で Atg5⁺ のゲノム由来するタンパク質が蓄積しており、このタンパク質が受精直後に機能している可能性があった。そこで、卵子特異的にオートファジーを欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作成した。このマウスでは卵成熟の過程で Atg5 遺伝子を欠損させることができ、受精直後の母性効果を排除することができる。このようにして作出した卵子特異的 Atg5 ノックアウトメスマウスを Atg5 ヘテロオスマウスと交配させたところ、産仔は得られるものの産仔の遺伝子型はすべてが Atg5⁺ を持っていた。この結果は Atg5⁺ の精子と受精したノックアウト卵だけが発生して、Atg5⁻ の精子と受精した場合（受精直後のオートファジーを完全に欠損した場合）には受精後のどこかの発生過程で致死となっている可能性を示唆していた。その後の解析から、Atg5⁻ の精子と受精した卵（オートファジーの完全欠損卵）は受精後の4細胞から8細胞期にかけて胚発生を停止することが明らかとなった。これらの結果から、受精直後に起こるオートファジーは着床するまでの胚発生に不可欠であることを初めて明らかとなった（図2）。なお、筆者らが調べた限りでは、卵子特異的 Atg5 ノックアウトマウス

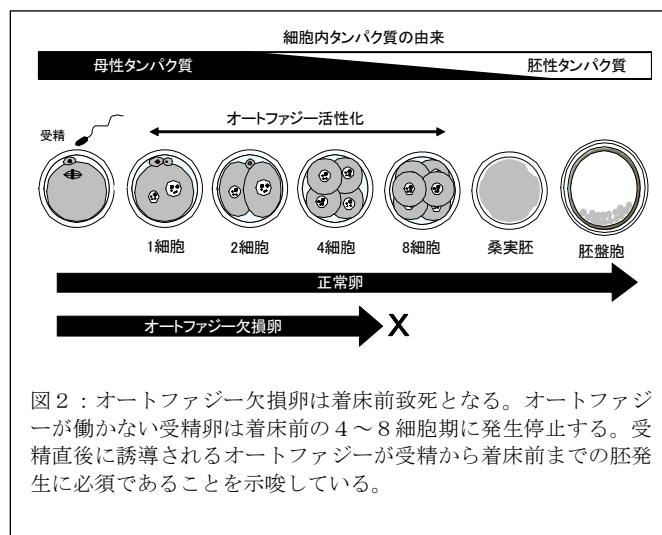


図2：オートファジー欠損卵は着床前致死となる。オートファジーが働かない受精卵は着床前の4～8細胞期に発生停止する。受精直後に誘導されるオートファジーが受精から着床前までの胚発生に必須であることを示唆している。

では卵成熟や受精は正常に起こることから、オートファジーは卵子形成や受精には影響を与えないようである。

オートファジー欠損卵が着床前致死となる原因

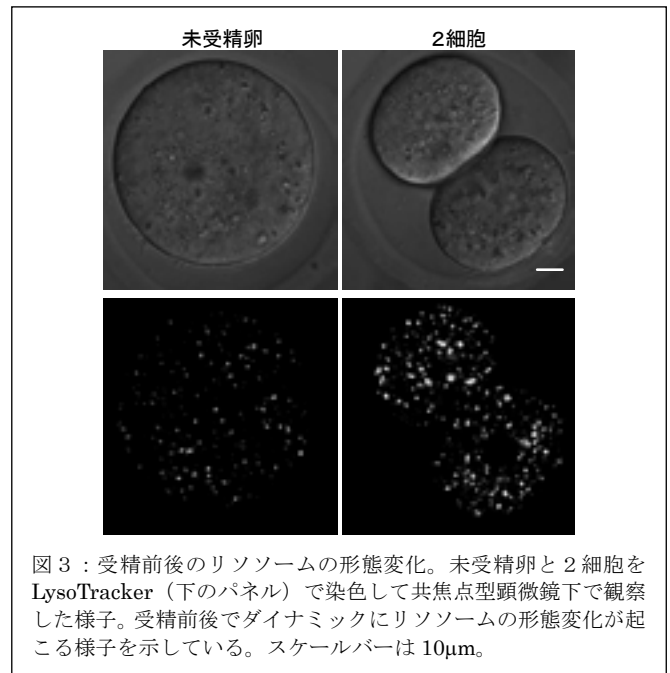
なぜ、オートファジーが働かないと受精卵の発生は止まるのか？受精直後の胚発生は母性由来の因子に依存しており、胚発生をさらに進めるためにはこれらの因子を大規模に短時間で分解する必要がある。この分解をオートファジーが担っており、分解産物であるアミノ酸が細胞内へ供給されていると考えられた。これらのアミノ酸は新規のタンパク質合成のための材料として利用されたり、胚発生を維持するための栄養になっているとも考えられる。実際にオートファジーが欠損した受精卵では、新規のタンパク質合成率が低下していることが明らかとなった。このことから、筆者らはオートファジー欠損卵が胚停止する原因の一つは新規のアミノ酸合成率の低下によるものだと結論付けた。しかし、オートファジーの生理機能が多彩であることを考えると、他にも何か役割を担っている可能性は否定できない。

多くの真核生物ではミトコンドリアは母親のみから遺伝（母性遺伝）することが知られている。父親由来のミトコンドリアは何らかの機構で選択的に排除されていると昔から考えられていた。これまでの研究から父性由来のミトコンドリアの分解にはユビキチン・プロテアソーム系が関与することが明らかとなっていた[11]。最近になって線虫を使った実験から受精直後に誘導されるオートファジーによって父性ミトコンドリアが選択的に分解されることが、佐藤らと Galley らによって独立に報告された[12,13]。Galley らはさらにマウス受精卵でもオートファジー関連タンパク質が父性由来のミトコンドリアの近傍に局在していることを示しており、ほ乳動物でも同様のメカニズムで精子由来のミトコンドリアが排除される可能性を示唆している。しかし、Luo らはオートファジーを欠損した受精卵でも精子由来のミトコンドリアの分解が起こることを報告しており[14]、今のところはっきりした結論には至っていない。オートファジーの基本的な生理機能は進化の過程で保存されているが、発生や分化過程のようにその動物種に固有の形態変化を伴う場合などはオートファジーの果たすべき役割が異なるケースもあり、今後の研究によって発生や分化におけるオートファジーの役割が明らかになることが期待される。

受精卵におけるリソソームの動態と機能

オートファジーの最終過程では、オートファゴソームで隔離された細胞質成分はリソソーム内で大規模に分解される。実際にリソソームを特異的に染色する LysoTrackerRed でマウスの受精卵を染色すると多数のリソソームが観察される。興味深いことに、受精前後ではリソソームのサイズや数が変化するという（図3）。これは受精後の発生過程でも同様

であり、時期特異的にリソソームの形態や局在は変化すると考えられる。リソソーム内の主要な消化酵素であるカテプシンは、未成熟型の前駆体が合成さ



れた後にリソソームへ運ばれる過程でプロセッシングを受け最終的に酸性環境下のリソソーム内で成熟型へと変化する。筆者らはその後の解析から未受精卵から桑実胚までは成熟型のカテプシンが豊富に存在する一方で、胚盤胞になると未成熟型のカテプシンが成熟型と入れ替わって発現することが明らかにした[15]。胚盤胞におけるカテプシンの成熟型と未成熟型の存在比は、一般的な培養細胞と同じ傾向であることから、未受精卵から桑実胚まではカテプシンの活性が高いと推察される。なぜ、桑実胚から胚盤胞への過程で未成熟型のカテプシンが増加するのか現時点ではよく分かっていないが、桑実胚から胚盤胞への移行期には受精卵の栄養要求性が変化することが知られており、受精卵内の栄養状態と関連してカテプシンの活性状態も変化しているのかもしれない。また、カテプシン阻害剤で受精卵を処理すると胚発生が停止することが明らかとなった。これらの処理卵にはリポフスチン様の構造体が蓄積していたことから、桑実胚までの過程では細胞質成分の分解を促進するためにカテプシンの活性が通常よりも高い可能性も考えられる。最近になってオートファジー制御に関わる mammalian target of rapamycin (mTOR) complex1 (mTORC1)などの分子が栄養状態に応じてリソソーム膜上に局在することが報告された[16]。これらの分子の受精卵内における動態は不明であるが、受精卵の発生過程でもリソソームを介した巧妙な栄養制御機構が存在しているように思われる。

おわりに

発生や分化の過程では短期間のうちに細胞はある

状態から別の状態へとダイナミックにその形態を変化させる。この過程で重要なことの一つは、別の状態へ移行するための新しいプログラムへと細胞がシフトすることである。そのためには元の状態の細胞にある材料を一旦消去（分解）する必要があると考えられる。特に受精直後の卵細胞質のほとんどは母性由来の因子で満たされていることから、それらの因子を積極的に分解する必要がある。受精直後に誘導されるオートファジーによって母性由来のタンパク質が大規模に分解され、その分解産物であるアミノ酸を新規のタンパク質合成のための材料や胚発生のための栄養として利用する方法は、卵細胞質のリモデリングを亢進しながら自給自足を行う極めて有効なシステムであると思われる。一方で、受精直後のオートファジー誘導を制御するメカニズムの全貌は未だ明らかになっていない。特に受精が引き金となる一連のシグナリング経路は培養細胞とは大きく異なり、卵に特異的な因子を介してオートファジーが制御されている可能性もあり、今後の研究成果が期待される。リソソームのように細胞に普遍的に存在するオルガネラも受精卵の発生過程ではダイナミックにその形態や機能を変化させていることも分かってきた。受精してから着床するまでの発生過程における栄養状態の変化、特にアミノ酸を介したシグナリング経路については未だ不明な点が多い。最近の研究からアミノ酸センサーや栄養状態の感知に関わる分子が明らかにされており[17,18]、これらの因子が受精卵の発生過程でどのような動態を示すのか非常に興味深い。受精卵におけるオートファジー研究からこれらの謎の一旦が明らかになることに期待したい。

最後に執筆の機会を与えて下さった岡山大学大学院環境生命科学研究科・農学部の国枝先生と佐藤先生に御礼申し上げます。なお、本項で概説した受精卵におけるオートファジーの研究は東京医科歯科大学の水島昇研究室（現：東京大学医学部）で行ったものです。

参考文献

[1] Mizushima, N. Autophagy: process and function, *Genes Dev.*, 21, 2861-73, 2007.

[2] Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T. et al., Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice, *Nature*. 441, 880-4, 2006.

[3] Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M. et al., Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice, *Cell*. 131, 1149-63, 2007.

[4] Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M. et al., Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice, *Nature*. 441, 885-9, 2006.

[5] Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T. et al., LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing, *EMBO J.*, 19, 5720-8, 2000.

[6] Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T. et al., Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice, *J. Cell Biol.*, 169, 425-34, 2005.

[7] Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M. et al., The role of autophagy during the early neonatal starvation period, *Nature*. 432, 1032-6, 2004.

[8] Mizushima, N. and Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues, *Cell*. 147, 728-41, 2011.

[9] Zhang, Y., Yan, L., Zhou, Z. et al., SEPA-1 mediates the specific recognition and degradation of P granule components by autophagy in *C. elegans*, *Cell*. 136, 308-21, 2009.

[10] Tsukamoto, S., Kuma, A., Murakami, M. et al., Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos, *Science*. 321, 117-20, 2008.

[11] Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J. et al., Ubiquitin tag for sperm mitochondria, *Nature*. 402, 371-2, 1999.

[12] Sato, M. and Sato, K. Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos, *Science*. 334, 1141-4, 2011.

[13] Al Rawi, S., Louvet-Vallee, S., Djeddi, A. et al., Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission, *Science*. 334, 1144-7, 2011.

[14] Luo, S.M., Ge, Z.J., Wang, Z.W. et al., Unique insights into maternal mitochondrial inheritance in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110, 13038-43, 2013.

[15] Tsukamoto, S., Hara, T., Yamamoto, A. et al., Functional analysis of lysosomes during mouse preimplantation embryo development, *J. Reprod. Dev.* 59, 33-9, 2013.

[16] Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R. et al., Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids, *Cell*. 141, 290-303, 2010.

[17] Han, J.M., Jeong, S.J., Park, M.C. et al., Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway, *Cell*. 149, 410-24, 2012.

[18] Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A. et al., A gene network regulating lysosomal biogenesis and function, *Science*. 325, 473-7, 2009.