

マウス初期胚発生において栄養供給・分化シグナルを制御する ミクロオートファジーの機能

川村 暢幸¹, 孫(和田) 戈虹¹, 和田 洋²

1. はじめに

生体はさまざまな周囲の環境に適応する必要性から、シグナル伝達分子によって担われるシグナル伝達機構を発達させており、それらへの応答として細胞の運命や行動が決定される。このシグナル伝達の制御と細胞運命の決定が特にダイナミックに行われるのが、多細胞生物の胚発生期である。

マウスの胚発生において、受精卵は細胞の数を増やすと同時に細胞を分化させる。この増殖と分化には大量の物資とエネルギーが必要となる。胎盤が形成される以前のこの時期において、母体からの栄養供給は、エンドサイトーシス経路によって行われることが知られている。また、エンドサイトーシス経路は細胞の増殖や分化、さらには細胞どうしの位置関係を支配するシグナル伝達システムにも深く関わる事が報告されている。

マウス 6 日胚において、栄養の吸収に重要な臓側内胚葉 (visceral endoderm: VE) と呼ばれる細胞グループではきわめて活発にエンドサイトーシスが起きており、細胞小器官 (オルガネラ) が発達している¹⁾。VE 細胞には頂端液胞 (apical vacuole: AV) と呼ばれる特徴的なオルガネラが存在する (図 1)。動物細胞では、通常、リソソームは大きな構造にはならないが、VE 細胞や空腸上皮細胞には非常に大きなリソソームが形成されることが知られている。頂端液胞はエンドサイトーシスマーカーやリソソームに含まれるタンパク質分解酵素であるカテプシン B を蓄積し、

限界膜にリソソーム膜タンパク質 Lamp2 が存在していることから、リソソームの性質を持つと考えられる²⁾。頂端液胞は細胞外から細胞内へ物質を取り込むエンドサイトーシス経路の終着点であり、母体からの免疫グロブリンや各種のシグナル分子を分解するオルガネラであると考えられる^{3,4)}。

今回、我々はこの特徴的なオルガネラ=頂端液胞を有する VE 細胞において、ミクロオートファジーと呼ばれる特徴的な膜動態が起こっていること、およびミクロオートファジーに関与する遺伝子と発生に関わるシグナル伝達経路の関連について明らかにしたので、その内容について概説したい。

2. VE 細胞で盛んに起こっているミクロオートファジー

我々は、VE 細胞の頂端液胞がどのように形成されるのかについて解析を行った。まず 2 種類の蛍光色素を時間差をつけて VE 細胞にエンドサイトーシスで取り込ませ、蛍光顕微鏡下でエンドサイトーシス経路について時系列的に観察してみたところ、細胞外の蛍光物質を取り込んだエンドソームが、頂端液胞に接着し、その後、エンドソームと頂端液胞の内容が混合した。つまり、VE 細胞においてエンドサイトーシスによって取り込まれた物質等は頂端液胞にたどり着き、そこでエンドソームと頂端液胞が融合することが確認できた。

また、このエンドソームと頂端液胞の内容が混合する直前に、エンドソームが頂端液胞の中に存在することを見いだした。電子顕微鏡による観察によっても、大きな頂端液胞の中に小胞が存在するような、二重に膜で囲まれた構造を確認することができた。我々はこの現象について、エンドソームが丸ごと頂端液胞に取り込まれた後、エンドソーム膜と頂端液胞の膜が分解されることによって、エンドソーム内容物が頂端液胞内に放出され混合するのではないかと考えた。

そこで、膜分解阻害薬 (リパーゼ阻害薬である Orlistat) 存在下で、2 種類の蛍光色素を段階的に取り込ませる実験を行ったところ、エンドソームが頂端液胞内に取り込まれ

¹ 同志社女子大学薬学部生化学研究室 (〒610-0395 京都府京田辺市興戸南銚立 97-1)

² 大阪大学産業科学研究所 (〒567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘 8-1)

Microautophagy in the visceral endoderm regulates nutritional provision and differentiation signals during mouse early development

Nobuyuki Kawamura¹, Ge-Hong Sun-Wada¹ and Yoh Wada²
(¹Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College, Kouto, Kyotanabe, Kyoto 610-0395, Japan; ²Division of Biological Sciences, Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, Mihogaoka 8-11, Ibaraki, Osaka 567-0047, Japan)

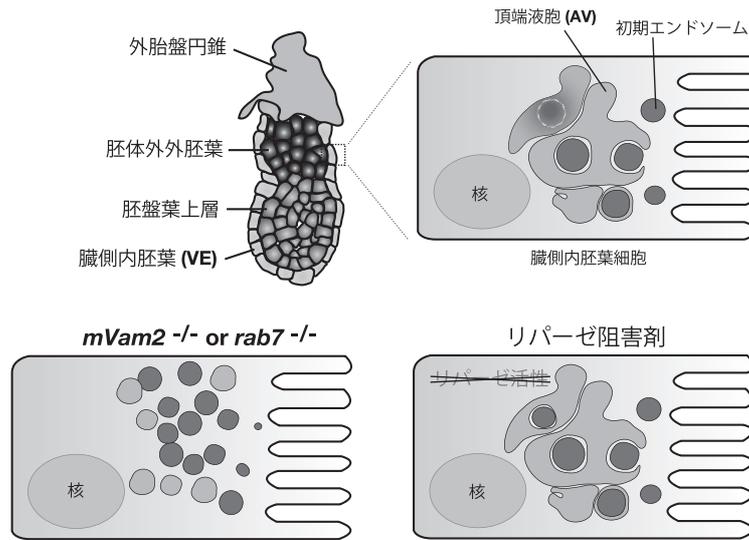


図1 臓側内胚葉 (VE) 細胞におけるマイクロオートファジー
 エンドサイトーシスにより VE 細胞表面から取り込まれた物質は、エンドソームを経て最終的に頂端液胞へ運搬される。頂端液胞では小さなエンドソームが丸ごと頂端液胞に取り込まれ、後でエンドソーム膜と頂端液胞の膜が分解されることによって、エンドソーム内容物が頂端液胞内に放出され混合するマイクロオートファジーが起きている。膜分解阻害薬 (リパーゼ阻害薬である Orlistat) 存在下では、エンドソームが頂端液胞内に取り込まれるものの、膜が分解されず内容物の混合が起こらない。また、*mVam2*、*Rab7* 遺伝子を欠損すると小胞が蓄積し VE 細胞に特徴的な頂端液胞が形成されない。

るものの、内容物の混合が起こらないという結果が得られた (図1)。このように、VE 細胞では、通常の小胞輸送とは異なり、エンドソームを頂端液胞が丸ごと取り込んだ後に膜を分解することで膜と物質の輸送が起こることがわかった⁵⁾。

さて、このユニークなエンドソーム～頂端液胞間の輸送現象は、マイクロオートファジーとして知られている膜オルガネラのダイナミクスとよく似ている。オートファジーは大きく分けてマクロオートファジー・シャペロン介在性オートファジー・マイクロオートファジーの三つの異なるメカニズムで進行することが提唱されている。マクロオートファジーでは、二重膜構造が細胞質の一部 (オルガネラを含むこともある) を取り囲み、閉じた小胞 (オートファゴソーム) を形成して、それがリソソーム連続膜を形成しつつ融合する結果、オートファゴソームの内容物を分解コンパートメントに送り込む。シャペロン介在性オートファジーでは、細胞基質のタンパク質にシャペロンが結合し、この分子複合体がリソソーム膜上の受容体に認識されてリソソーム内に送り込まれる。細胞内で不要になったものや、異常なタンパク質を選択的に分解するメカニズムとして機能するため、病態生理との関連が指摘されている。マイクロオートファジーはこれら二つのオートファジーとは異なり、液胞が分解されるべきオルガネラ・細胞基質と接触

し、自身の膜とともに対象オルガネラ・物質を液胞内部の空間 (内腔) に送り込み、分解する。酵母におけるマイクロオートファジーの報告はあるが、酵母以外の生物、哺乳類においては報告例が少なく、詳細に関しては未解明である^{6,7)}。今回みられたような、哺乳類の初期発生胚できわめて活発にマイクロオートファジーが起きていることは新しい発見である。

3. *mVam2*、*Rab7* は VE 細胞でのマイクロオートファジーに必須である。

酵母細胞には液胞と呼ばれる巨大なオルガネラが存在する。液胞は、動物細胞におけるリソソームに相当する細胞小器官である。酵母の遺伝学的な解析により、この液胞の形成に関与する遺伝子が 50 以上同定されている。*Vam2* は homotypic fusion and vacuole protein sorting (HOPS) complex と呼ばれる膜融合に機能するタンパク質複合体のサブユニットで、オルガネラ間の膜融合調節を担っている因子である⁸⁾。*Ypt7* は低分子量 G タンパク質で、HOPS complex の *Vam2* と相互作用し、こちらもオルガネラ間の膜融合調節を担っている⁹⁾。いずれもその遺伝子変異酵母株では液胞が断片化し、大きな液胞が形成できないという表現型を示す¹⁰⁾。我々は、酵母における液胞形成に必須な *VAM2* お

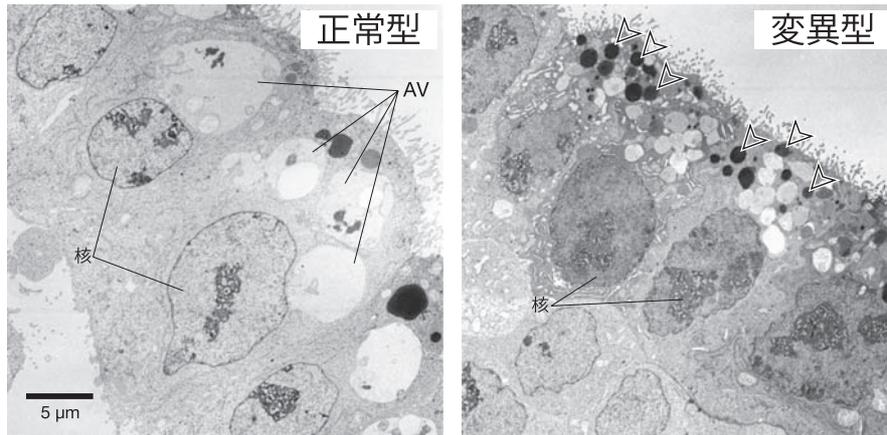


図2 *Rab7* 遺伝子欠損マウス胚 VE 細胞における小胞の蓄積

正常型マウスおよび *Rab7* 遺伝子欠損マウスの胎生 6.5 日胚 VE 細胞の電子顕微鏡象を示す。正常型胚では、大きな空胞＝頂端液胞が形成されているが、*Rab7* 遺伝子欠損胚（変異型胚）では小胞が多数蓄積し、頂端液胞の形成が起こらない。図中 AV で頂端液胞を、矢印で蓄積した小胞を示す。

および *YPT7* 遺伝子のマウスホモログである、*mVam2* および *Rab7* 遺伝子欠失により、リソソーム様オルガネラである頂端液胞の形成に異常が生じるのではないかと考え、遺伝子ノックアウトマウスを作製し解析を行った。

mVam2, *Rab7* 遺伝子ノックアウトマウスの胚を摘出し、VE 細胞を電子顕微鏡にて解析したところ、*mVam2*, *Rab7* いずれの遺伝子のノックアウトマウスでも、正常型胚の VE 細胞に特徴的な頂端液胞が形成されておらず、そのかわりに、小さなエンドソームらしき小胞が蓄積していた（図 1, 図 2）。また、*mVam2*, *Rab7* いずれの遺伝子欠損胚においても、2 種類の蛍光色素を時間差をつけて取り込ませる実験を行ったところ、エンドサイトーシスにより各色素を取り込んだ小胞が蓄積し、内容物が混合していなかったことから、先に形成されたエンドソームと、後から取り込まれたエンドソーム間の融合が起きないことが確認できた。これらのことから *mVam2*, *Rab7* いずれも、VE 細胞における頂端液胞の形成に必要な遺伝子であることが示された^{5,11)}。

4. *mVam2*, *Rab7* は初期発生に必須である

また、*mVam2*, *Rab7* 遺伝子欠損マウス胚の発生については、いずれの遺伝子欠損マウス胚も受精後 7 日前後で発生が停止し、胎生致死となった。それらの胚について *in situ* ハイブリダイゼーション法により各種発生マーカーの発現について調べたところ、受精後 6 日程度までは発生が進行し前後軸の決定が行われているが、受精後 7 日以降、中胚葉マーカーである *Brachyury* の発現はみられたものの、原腸陥入が進行せず、発生が停止したと考えられた（図 3）^{5,11)}。

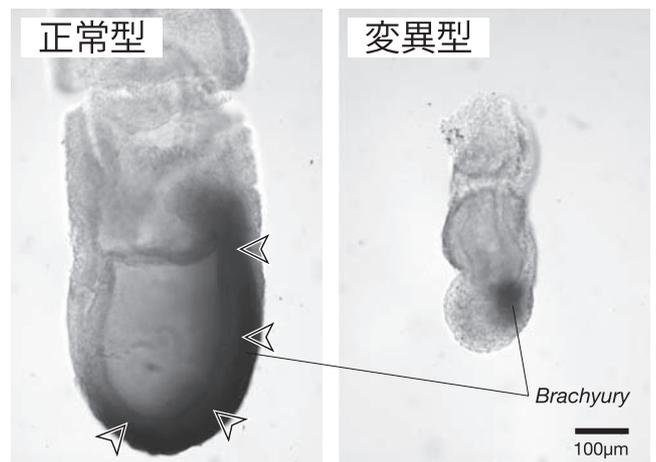


図3 *Rab7* 遺伝子欠損マウス胚における中胚葉の低形成

正常型マウスおよび *Rab7* 遺伝子欠損マウスの胎生 7.5 日胚に対して、*in situ* ハイブリダイゼーション法により中胚葉マーカーである *Brachyury* 遺伝子を検出した結果（図中、黒で染色）を示す。正常型胚、*Rab7* 遺伝子欠損胚（変異型胚）ともに、前後軸の決定はなされているが、異常型胚では *Brachyury* 陽性領域の遠位方向への陥入が進まず、原腸陥入が停止している。図中、矢印で原腸陥入が進行している部分（正常型胚）を示す。

mVam2 遺伝子欠損マウス胚で、骨形成タンパク質 (BMP) シグナルの活性化状態について BMP 経路の細胞質メディエーターである Smad1/Smad5 のリン酸化状態を比較し検討したところ、本来 BMP シグナルが抑制されていない部位でも活性化されており、その結果として発生異常が起きることが予想された。このことは、*mVam2* タンパク質が細胞内膜動態の制御を通じて、BMP シグナルの制御に寄与していることを示唆している^{11,12)}。

Rab7 遺伝子欠損マウス胚では、*mVam2* 遺伝子欠損マウス胚と同様に原腸陥入が進行しないという表現型を示す

のに対し、BMP シグナルの活性化状態については、野生型胚と大きな差がみられなかった（未発表）。興味深いのは、*mVam2* 遺伝子と *Rab7* 遺伝子欠損マウス胚の VE 細胞では、マイクロオートファジーが起きず、頂端液胞が形成されないという表現型は同様であるのに対し、BMP シグナルの伝達については異なる結果が得られた点である。

5. *PipkIII* 遺伝子ノックアウトマウスと *VPS52* 遺伝子変異マウスの表現型

我々はエンドサイトーシス経路が哺乳動物初期発生のシグナル制御に不可欠であることを示してきた。最近、細胞内膜動態の制御がマウス初期胚発生に重要な役割を果たすことを支持する知見が得られつつある。細胞内膜動態に関与する因子として、膜構成リン脂質の存在もあげられる。特に、ホスファチジルイノシトール (PtdIns) のイノシトール環にリン酸が付加されたリン脂質 [PtdIns(3)P, PtdIns(3,5)P₂ など, PtdIns(X)P_n] がオルガネラの特異性を規定し、細胞内情報伝達を制御することが明らかにされてきている。*PipkIII* は PtdIns(3)P のイノシトール環 5 位にリン酸基を付加する脂質キナーゼ (PtdIns kinase type III) で、初期エンドソーム膜の PtdIns(3)P を PtdIns(3,5)P₂ に変換する。PtdIns の変換は、初期エンドソームから後期エンドソームへのオルガネラの変換に必須であることが知られており、出芽酵母では *PipkIII* のオーソログである *Fab1* タンパク質を欠損すると液胞が超巨大化する。この *PipkIII* 遺伝子変異マウス胚では VE 細胞の頂端液胞が超巨大化し、同時に受精後 6 日で胚の形態に異常を示し、胎生致死となることが明らかになった。同時に、蛍光色素を取り込ませエンドサイトーシス経路の観察を行ったところ、巨大な頂端液胞へは色素が移行せず、初期エンドソームから頂端液胞に至る経路のどこかで膜動態が停止していることが示唆された^{13,14)}。

エンドソームからの輸送小胞のトランスゴルジ網膜への融合（逆行輸送）に関わっている VFT/GARP 複合体 (*VPS52*, *VPS53*, *VPS54*) の構成タンパク質を欠損する酵母株では、本来液胞内に存在するカルボキシペプチダーゼ Y が細胞外に排出される、本来後期ゴルジ体に存在する膜タンパク質が液胞膜に存在する、といった膜動態の異常を示す¹⁵⁾。*VPS52* 遺伝子変異マウスは、受精後 6 日程度で特に胚盤葉上層細胞の増殖と分化に抑制がみられ、発生が停止し、胎生致死となる。*VPS52* 遺伝子は成体マウスでは普遍的に発現がみられる。初期胚では、受精後 5 日においては VE 細胞に強く発現がみられるが、胚盤葉上層細胞には発現していない。VE 細胞で *VPS52* 遺伝子を発現させたまま、胚盤葉上層細胞でのみ *VPS52* 遺伝子の発現を抑制したところ、受精後 9.5 日程度までは発生が進行するとい

う結果が得られた¹⁶⁾。これらの結果は、特に受精後 6~7 日の中胚葉の誘導と形成段階において VE 細胞内の膜動態がその制御に非常に重要な役割を果たしていることを示している。

6. おわりに

mVam2, *Rab7*, *PipkIII*, *VPS52* 遺伝子欠損マウス胚でみられた細胞内の表現型や初期発生の異常は、VE 細胞におけるエンドサイトーシス経路・頂端液胞の形成が、組織レベルの形態形成に重要な役割を果たしていることを示唆している。

初期胚の VE 細胞で観察されたマイクロオートファジーという現象については、その生理的な意義はいまだ解明されていないが、以下のような機能を提唱したい。1) エンドサイトーシスが活発に起きている細胞内において、通常のエンドソームとリソソームが連続膜を形成し融合するパターンを繰り返していくと、リソソーム膜表面の面積がとりとめなく増大していく結果となる。一方、マイクロオートファジーでは、膜構造体をいったん丸ごと取り込んでから膜を消化するため、膜表面積の増大を防ぐことができる。2) 細胞膜表面にあるシグナル伝達分子の受容体は、そのまま細胞質に陥入し、受容体のシグナル伝達部位が細胞質に向けた状態でエンドソームになる。このエンドソームは通常は連続膜を形成する膜融合過程を経ると、細胞質にシグナル伝達部位が露出したままとなるが、マイクロオートファジーにより丸ごと取り込むと、シグナル伝達部位が細胞質から速やかに遮断され、細胞内メディエーターの活性化を速やかに抑制することができる。

しかし、*mVam2* 遺伝子欠損胚でみられた BMP シグナルの異常は、*Rab7* 遺伝子欠損胚では顕著ではなく、欠損遺伝子により違いがみられ、画一的なエンドサイトーシス経路によるシグナル伝達の抑制という考え方では説明できない。特定の膜輸送関連遺伝子が特定のシグナル伝達経路を調節していると考えられる。今後、*mVam2*, *Rab7*, *PipkIII*, *VPS52* をはじめとする膜輸送関連遺伝子の機能と膜動態・初期胚発生における表現型を解析していくことが必要となる。また、それによって、哺乳類細胞におけるマイクロオートファジーという膜動態の意義についても明らかになっていくものと考えられる。

- 1) Enders, A.C., Given, R.L., & Schlafke, S. (1978) *Anat. Rec.*, 190, 65-77.
- 2) Nada, S., Hondo, A., Kasai, A., Koike, M., Saito, K., Uchiyama, Y., & Okada, M. (2009) *EMBO J.*, 28, 477-489.
- 3) Kugler, P. & Miki, A. (1985) *Histochemistry*, 83, 359-367.
- 4) Miki, A. & Kugler, P. (1986) *Histochemistry*, 85, 169-175.
- 5) Kawamura, N., Sun-Wada, G.H., Aoyama, M., Harada, A.,

- Takasuga, S., Sasaki, T., & Wada, Y. (2012) *Nat. Commun.*, 3, 1071.
- 6) Obara, K. & Ohsumi, Y. (2008) 生化学, 80, 215-223.
- 7) Mizushima, N. & Levine, B. (2010) *Nat. Cell Biol.*, 12, 823-830.
- 8) Nakamura, N., Hirata, A., Ohsumi, Y., & Wada, Y. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 11344-11349.
- 9) Haas, A., Scheglmann, D., Lazar, T., Gallwitz, D., & Wickner, W. (1995) *EMBO J.*, 14, 5258-5270.
- 10) Wada, Y., Ohsumi, Y., & Anraku, Y. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 18665-18670.
- 11) Aoyama, M., Sun-Wada, G.H., Yamamoto, A., Yamamoto, M., Hamada, H., & Wada, Y. (2012) *Dev. Cell*, 22, 1163-1175.
- 12) Sun-Wada, G.H. & Wada, Y. (2013) 生化学, 85, 806-809.
- 13) Sasaki, T., Takasuga, S., Sasaki, J., Kofuji, S., Eguchi, S., Yamazaki, M., & Suzuki, A. (2009) *Prog. Lipid Res.*, 48, 307-343.
- 14) Takasuga, S., Horie, Y., Sasaki, J., Sun-Wada, G.H., Kawamura, N., Iizuka, R., Mizuno, K., Eguchi, S., Kofuji, S., Kimura, H., Yamazaki, M., Horie, C., Odanaga, E., Sato, Y., Chida, S., Kontani, K., Harada, A., Katada, T., Suzuki, A., Wada, Y., Ohnishi, H., & Sasaki, T. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 1726-1731.
- 15) Conibear, E. & Stevens, T.H. (2000) *Mol. Biol. Cell*, 11, 305-323.
- 16) Sugimoto, M., Kondo, M., Hirose, M., Suzuki, M., Mekada, K., Abe, T., Kiyonari, H., Ogura, A., Takagi, N., Artzt, K., & Abe, K. (2012) *Cell Rep.*, 2, 1363-1374.

著者寸描

●川村暢幸 (かわむら のぶゆき)



同志社女子大学薬学部生化学研究室特別任用助教。博士(薬学)。

■略歴 1978年静岡県沼津市に生る。2000年九州大学薬学部卒業。05年東京大学大学院薬学系研究科修了。同年より同志社女子大学薬学部特別任用助手、08年より現職。

■研究テーマと抱負 マウス初期胚発生における細胞内膜動態因子の機能解明。様々な膜動態制御因子を欠損させたとき、細胞レベルでの表現型は似ているのに、発生形態が全く異なっていたりする点に、不思議だなあと感じながら取り組んでいます。

■趣味 くるまいじり, PC組み立てと分解, 菌の栽培, 娘と息子の写真を撮ること。