

74. 動物個体発生におけるオートファジーの生理機能の解明

佐藤 美由紀

Key words : オートファジー, 初期胚発生, *C. elegans*

群馬大学 生体調節研究所
生体膜機能分野

緒言

マクロオートファジー（以下オートファジーと省略）は細胞質の成分を隔離膜と呼ばれる膜で囲い込んでオートファゴソームを形成し、その内容物をリソソームへ運んで分解する大規模な分解機構である（図1 A）¹⁾。オートファジーは栄養飢餓に応答して自己の成分を非選択的に分解・再利用するシステムとして発見されたが、近年では特定の基質（タンパク質凝集体や不良ミトコンドリア、感染細菌など）をオートファゴソームへ取り込み、分解する“選択的オートファジー経路”も存在することが明らかとなっている。酵母や培養細胞を用いた解析からオートファジーを制御するATG遺伝子群の同定とその機能解析が進み、オートファジーの基本メカニズムが明らかとなってきている。さらにオートファジー関連因子の組織特異的ノックアウトマウスの解析により、出生後の個体におけるオートファジーの重要な生理的機能も明らかになりつつある。一方、動物の発生期におけるオートファジーの役割については未だ知見が限られている。そこで本研究ではモデル生物である線虫 *C. elegans* を用いて、初期発生におけるオートファジーの生理機能について解析した。また、網羅的 RNAi 法を用いて初期胚における新たなオートファジー関連因子の探索を試みた。

方法、結果および考察

1. 線虫初期胚における2段階のオートファジー活性化

オートファゴソームのマーカーである Atg8/LC3 はオートファジーが誘導されると細胞質から点状のオートファゴソーム膜へ局在を変化させるため、オートファジー活性のモニターとして広く利用されている。また、オートファゴソームの内膜に局在した Atg8/LC3 は自身も分解されるため、Atg8/LC3 の分解はオートファジー活性の指標にも用いられる。線虫の生殖腺で GFP を融合した LGG-1 (Atg8/LC3 ホモログ) を発現させ、生きた個体内で卵子～初期胚においてオートファジー活性をモニターできる形質転換体を作製した。この線虫を観察すると、初期胚において2回（受精直後と32細胞期周辺）のオートファジー活性の一過的な上昇が起きることが明らかとなった（図1 B, C）。受精直後に誘導されるオートファジーでは、精子から持ち込まれたミトコンドリアなど父性オルガネラが特異的に分解される^{2,3)}。それに対し、2回目の誘導においては胚のすべての細胞で同調的にオートファジー活性が上昇することから、何らかの成分を積極的に分解している可能性が考えられた。この時期には、体細胞へと運命付けられた細胞で生殖顆粒の構成因子がオートファジーにより分解されることが知られており、基質の候補に挙げることが出来る⁴⁾。また、卵子に由来する成分をより広範囲に分解し、細胞質成分の転換を促している可能性も考えられる。

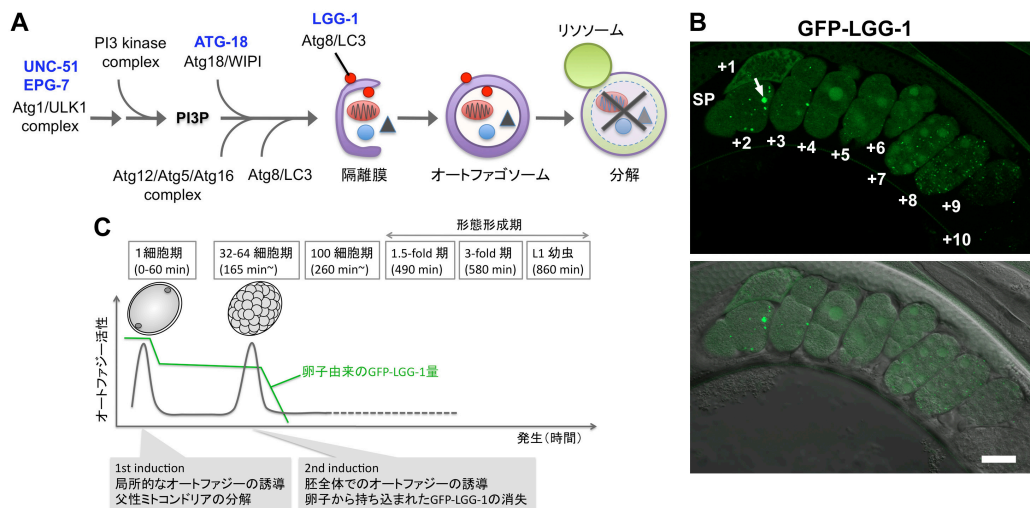


図1. 線虫初期胚におけるオートファジーの誘導.

A) オートファジー経路を制御する Atg タンパク質群. 線虫ホモログは青字で示した. B) 線虫初期胚におけるオートファジーの誘導. オートファゴソームマーカーである GFP-LGG-1 の動態を成虫子宮内の初期胚で観察した. 数字は貯精嚢 (SP) からの位置に対応し, 数字が大きくなるほど発生が進行した胚を示す. +1 ~ +2 は受精直後の 1 細胞期胚で, 一方の極にオートファゴソームが形成されている (矢印). +8 ~ +9 は 32~64 細胞期胚を示し, 胚全体で多数のオートファゴソームが形成されている. +10 以降の胚では卵子由来の GFP の蛍光が消失している. Scale bar: 10 μ m. C) 初期胚における 2 回のオートファジー誘導と, 卵子由来の GFP-LGG-1 量の模式図.

また, この 2 回のオートファジーの誘導に対する既知のオートファジー関連因子の関与を検討した. UNC-51 (ULK1/Atg1 ホモログ) と EPG-7 (FIP200/Atg11 ホモログ) はオートファジーの誘導に必要なキナーゼ複合体の構成因子, ATG-18 はオートファゴソーム形成の初期に働く PI(3)P 結合タンパク質である (図 1 A) ⁴⁾. *unc-51*, *epg-7*, *atg-18* すべての変異体において, 受精直後に精子近傍に誘導されるオートファジーは阻害されていた (図 2, 1-cell stage). 一方, 2 回目のオートファジー誘導に関しては異なる結果が得られた. *atg-18* 変異体では異常な大きさの GFP-LGG-1 陽性構造が多数形成され, 発生の進行にともないその構造がさらに蓄積した (図 2 L-N). 野生型では, 2 回目のオートファジー誘導後には卵子から持ち込まれた GFP-LGG-1 が消費され, GFP の蛍光が観察されなくなるが (図 2 C), *atg-18* 変異体では後期胚でも GFP の蛍光が維持されていた (図 2 M, N). *atg-18* 変異体で蓄積する構造は不完全なオートファゴソーム中間体と考えられる. 一方, *epg-7* では GFP-LGG-1 陽性の構造のサイズが若干大きいものの, GFP-LGG-1 のシグナルは野生型同様に消失した (図 2 E, F). また, *unc-51* では GFP-LGG-1 陽性構造のサイズがさらに大きくなり, GFP-LGG-1 の分解のタイムコースも野生型と比べると遅くなっていたが, コンマ期には GFP のシグナルが消失していた (図 2 H-J). このことは, 2 回目のオートファジーの誘導には UNC-51 キナーゼ複合体が必ずしも必須ではない可能性を示している.

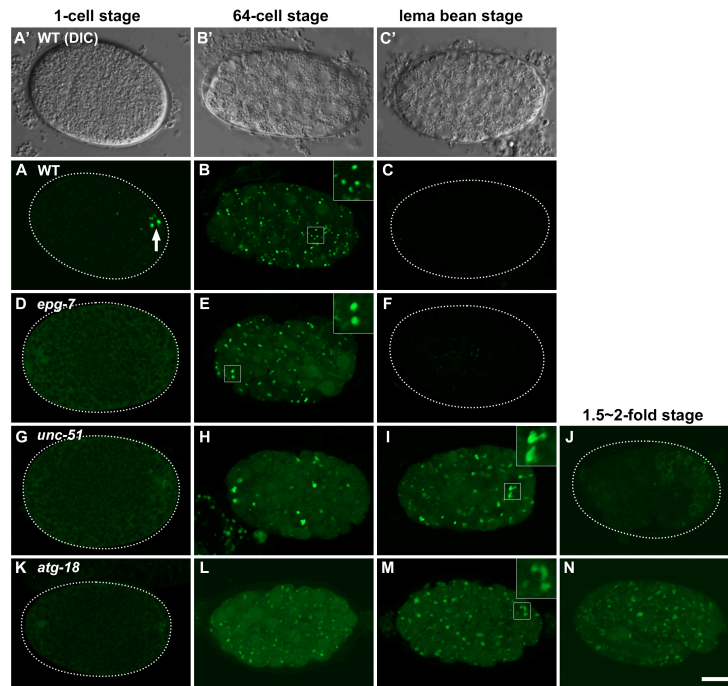


図2. GFP-LGG-1の動態に対するオートファジー関連因子の変異の影響。

初期胚における GFP-LGG-1 の動態を野生型 (A-C) または *epg-7* (D-F), *unc-51* (G-J), *atg-18* (K-N) の各変異体の胚において観察した。野生型については対応するノマルスキー像 (A'-C') を示した。白線で囲んだ領域の拡大図 ($\times 2.5$) も示した。野生型 1 細胞期の矢印は侵入した精子近傍に形成されたオートファゴソームを示す (A)。各変異体では 1 細胞期における GFP-LGG-1 の集積が阻害されていた。*epg-7* または *unc-51* の 64 細胞期の胚では野生型より大きな GFP-LGG-1 陽性の構造が形成され、タイミングは遅れるものの GFP-LGG-1 の代謝により後期胚において GFP のシグナルが消失した。*atg-18* では通常より大きな GFP-LGG-1 陽性の構造が形成されたが、GFP-LGG-1 が代謝されず蛍光が後期胚まで蓄積していた。Scale bar: 10 μ m。

2. 胚発生に対するオートファジー関連因子の役割

また、オートファジー関連因子の変異が胚発生に与える影響を検討した。オートファゴソームの膜形成に関わる *atg-18* や *lgg-1* の変異体は高い致死性を示し、胚発生後期または L1 幼虫期で致死となった。これら変異体では胚発生中期までは野生型同様に発生が進行するが (図 3 A), 胚発生後期 (2~3-fold 期) 以降に異常を示し、約半数の胚は胚性致死となった。孵化した L1 幼虫においても表皮の萎縮、腸または筋肉の細胞内に異常な構造が蓄積している様子が観察され、大部分の幼虫は L1 幼虫期に死亡した (図 3 B)。一方で、オートファジーの誘導を制御する Atg1/ULK1 キナーゼ複合体の構成因子をコードする *unc-51* や *epg-7* の変異体ではこのような致死性はみられず、生育可能であった。また、形態的にも大きな変化は認められなかった (図 3 A, B)。このようにオートファジー関連因子の間で表現型が大きく異なることが判明した。Atg1/ULK1 キナーゼ複合体を必ずしも必要としないオートファジー経路が存在する可能性が考えられるが、*unc-51* 変異体で形成される GFP-LGG-1 陽性構造を今後さらに詳しく解析する必要がある。また、LGG-1 や ATG-18 がオートファジー以外にも必須な機能を持っている可能性も考えられた。

3. 網羅的 RNAi 法を用いた新たなオートファジー関連因子の探索

線虫初期胚において新たなオートファジー関連因子の探索を目的に網羅的 RNAi スクリーニングを行った。その結果、*vps-11* の RNAi を行うと父性ミトコンドリアの分解が阻害されること、また父性ミトコンドリアを取り込んだオートファゴソームは形成されるものの分解されずに蓄積してしまうことが明らかとなった (図 4B, C)。VPS-11 はリソソームとエンドソームの融合を制御する HOPS と呼ばれる複合体のサブユニットであることが知られている (図 4 A) 5)。VPS-11 以外のサブユニットを機能阻害しても *vps-11 (RNAi)* 同様の表現型が観察されることから、HOPS 複合体が

オートファゴソームとリソソームとの融合にも関与していると考えられた。また、これ以外にもオートファジーの制御に関与する候補因子を同定しており、今後さらに解析を進める予定である。

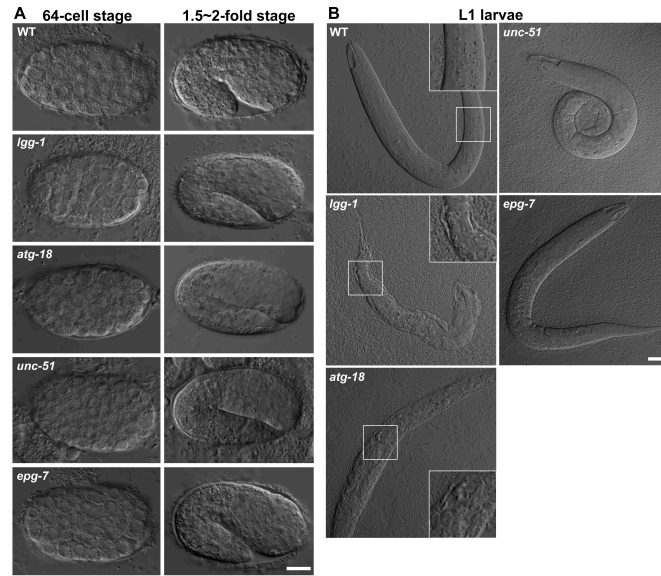


図3. オートファジー関連変異体の胚発生に対する影響。

A) 野生型, または *lgg-1*, *atg-18*, *unc-51*, *epg-7* の各変異体において, 64 細胞期, または 1.5~2-fold 期の胚を観察した。2-fold 期までは顕著な異常は観察されなかった。B) 野生型, または各変異体において L1 幼虫を観察した。 *lgg-1* や *atg-18* 変異体では表皮の萎縮, 腸または筋肉の細胞内に異常な構造が蓄積している様子が観察され, 多くの幼虫は L1 幼虫期で致死となった。 *lgg-1*, *atg-18* については白線で囲んだ領域の拡大図 (×2) も示した。 Scale bar: 10 μm.

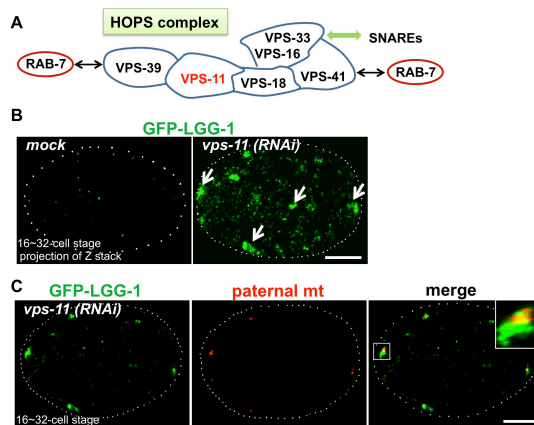


図4. HOPS 複合体の機能阻害によるオートファゴソームの蓄積。

A) HOPS 複合体の構成。 B) 野生型または *vps-11 (RNAi)* の 16~32 細胞期胚において GFP-LGG-1 を観察した。 *vps-11 (RNAi)* ではオートファゴソームが代謝されずに蓄積していた (矢印)。 C) *vps-11 (RNAi)* の 16~32 細胞期胚において GFP-LGG-1 と父性ミトコンドリアを観察した。 父性ミトコンドリアを含んだオートファゴソームが代謝されずに残存している様子が認められた。 Scale bar: 10 μm.

共同研究者

本研究の共同研究者は群馬大学生体調節研究所の佐藤 健, 富澤将太, 佐藤克哉である。最後に, 本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Mizushima, N. & Komatsu, M. : Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, **147** : 728-741, 2011.
- 2) Sato, M. & Sato, K. : Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science*, **334** : 1141-1144, 2011.
- 3) Sato, M. & Sato, K. : Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1833** : 1979-1984, 2013.
- 4) Zhang, Y., Yan, L., Zhou, Z., Yang, P., Tian, E., Zhang, K., Zhao, Y., Li, Z., Song, B., Han, J., Miao, L. & Zhang, H. : SEPA-1 mediates the specific recognition and degradation of P granule components by autophagy in *C. elegans*. *Cell*, **136** : 308-321, 2009.
- 5) Solinger, J. A. & Spang, A. : Tethering complexes in the endocytic pathway: CORVET and HOPS. *FEBS J.*, **280** : 2743-2757, 2013.