

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05637

研究課題名(和文) マウス卵細胞質の脂肪滴の可視化と生理機能に関する研究

研究課題名(英文) Physiological function and visualization of lipid droplets in mouse oocyte/embryo

研究代表者

塚本 智史 (Tsukamoto, Satoshi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 技術安全部・主任研究員(定常)

研究者番号：80510693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪滴はリン脂質の一重層からなる膜と中性脂肪を中心部に含んだ構造体である。脂肪滴は中性脂肪を単に蓄えるだけでなく、多様な生理機能を持つオルガネラである。ほ乳動物の卵細胞質には多量の脂肪滴が含まれているが、その生理機能はよく分かっていない。本研究は、特に受精前後の脂肪滴に着目して、脂肪滴の動態や蓄積に関わる分子機構の一端を明らかにするのが目的である。本研究によって、卵細胞質に蓄積された脂肪滴は受精前後に劇的にその局在を変化させることが明らかとなった。また、受精後の脂肪滴は、細胞内のリパーゼによって分解されるだけでなく、受精直後に活発に起こるオートファジーによる選択的分解が関与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Lipid droplet (LDs) are structures with a lipid ester (mainly triacylglycerol or cholesteryl ester) core coated by a phospholipid monolayer. LDs are dynamic organelles involved in intracellular lipid metabolism and energy production. LDs are present in tissue throughout the body, but their size and composition vary greatly. LDs also accumulate in the oocyte cytoplasm during oogenesis. However, the physiological function of LDs remains largely unknown. In our study, by using gene-modified mice and live-imaging system, we found that LD morphology is dynamically changed before and after fertilization. Furthermore, we demonstrated that LDs accumulated in oocytes could be degraded after fertilization by not only cellular lipase but also selective-autophagy.

研究分野：繁殖生物学、生殖工学

キーワード：受精 卵子 脂肪滴 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

細胞内に蓄えられた脂肪は最も効率的なエネルギーであり、その貯蔵と利用のバランスは巧妙に制御されていると考えられる。細胞内で脂肪滴はリン脂質の一重層からなる膜とトリグリセリドやコレステロールエステルなどの中性脂肪を中心部に蓄えた構造体である。真核細胞に広く含まれる脂肪滴は、これまで脂質を蓄えるだけの構造体だと思われてきたが、近年の研究から、脂肪滴は活発な代謝機能を担う重要なオルガネラの一つとして認識されるようになってきている。脂肪滴は光学顕微鏡で容易に観察できるため、卵細胞質の脂肪滴の存在自体は古くから知られている。しかし、ほ乳動物の卵子や受精卵を用いた脂肪滴のこれまでの研究は、局在やサイズの変化に着目したものがほとんどで、脂肪滴の生理機能にまで踏み込んだ研究は全く進んでいない。一方で、酵母や培養細胞、線虫やハエなどのモデル生物を使った研究から、脂肪滴の形成に関わる遺伝子群が同定され、その生理機能が次々と明らかになっている。過剰な脂肪滴の蓄積は肥満や糖尿病などの代謝性疾患と関わるだけでなく、ハエの卵細胞質では余剰なヒストンタンパク質の保持に関わることが報告されており、脂肪滴の新たな役割がクローズアップされている。

2. 研究の目的

脂肪滴は、ほとんどすべての組織や細胞に観察される構造体である。これまで脂肪滴は余剰な中性脂肪を貯蔵するだけの単純な構造体だと考えられてきたが、近年の研究から代謝や細胞内シグナリングなど多様な生理機能を持つオルガネラとして認識されるようになった。一方で、ほ乳動物の卵細胞質には多量の脂肪滴が含まれることが古くから知られていた。しかし、その存在意義の多くは不明のままである。そこで、本研究ではマウス卵細胞質における脂肪滴に着目して、初期胚発生過程における脂肪滴の分布状況や生理機能を様々な視点から検討して理解することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究内容は、マウス卵細胞質における脂肪滴の動態観察と脂肪滴合成に関わる遺伝子を改変したノックアウトマウスを用いた解析および受精後の脂肪滴の分解機能の検討に大別できる。脂肪滴は細胞内で様々な条件に応じてダイナミックにその形態を変化させることが想定される。そこで申請者が開発した脂肪滴可視化マウス由来の卵子・受精卵を細胞培養装置付き蛍光顕微鏡下で培養しながら観察することで、卵細胞質内の脂肪滴の挙動を正確に捉える。さらに脂肪滴形成に関わる遺伝子を欠損したノックアウトマウスを作製して、このノックアウトマウス由来の卵子や受精卵を用いて、受精前後の脂肪滴の動態観察や胚発生に与える影響を検討

する。さらに受精直後に活発に誘導されるオートファジーによって脂肪滴が分解される可能性についても解析する。

(1) 卵細胞質における脂肪滴の動態観察

一般的に脂肪滴は NileRed や BODIPY によって染色されることが多い。しかし、この方法では脂肪滴以外のリン脂質も同時に染色される可能性や自家蛍光の多さが指摘されている。申請者が行った予備実験では、卵細胞質中の脂肪滴も確かに NileRed をはじめとする染色試薬で検出できるが、染色することでその後の胚発生に影響が及んでしまい、生きたまま脂肪滴を可視化することは困難であった。そこで、脂肪滴の膜表面に特異的に局在することが知られる ADRP/Perilipin2 に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合させたタンパク質を全身の組織や臓器で発現するトランスジェニックマウス (脂肪滴可視化マウス) を開発した。予備実験からこのマウス由来の卵細胞質を蛍光観察すると、脂肪滴がこれまでよりも鮮明に観察できることが分かった。そこで開発した脂肪滴可視化マウスを使って、受精前後の卵細胞質における脂肪滴の状況を解析する。

(2) 卵特異的脂肪滴欠損マウスの作製と表現型の解析

脂肪滴の合成や分解に関わる遺伝子を全身で欠損したノックアウトマウスは代謝異常や栄養不良などで発育が正常に行われない可能性が想定される。そこで、全身性に目的遺伝子を欠損したマウスの作製と並行して Cre-loxP システムを用いて、卵特異的に脂肪滴の機能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する。特に脂肪滴の形成に重要な役割を担うと考えられる ADRP/Perilipin2 を標的とする。短期間でこれらの遺伝子改変マウスを作製する必要があるためゲノム編集技術を受精卵に応用する。作製した遺伝子改変マウスを用いて、まず卵子形成過程の正常性を調べるために、週齢ごとに卵巣切片を作成し病理学的な解析を行う。また、ホルモン投与によって正常な卵子が採取される場合には、体外培養や体外受精によって卵成熟能や受精能その後の発生能についても検討する。さらに老化による脂肪滴の働きも考慮するために長期的な交配実験も実施して繁殖能についても解析する。

(3) オートファジーによる脂肪滴の分解状況の解析

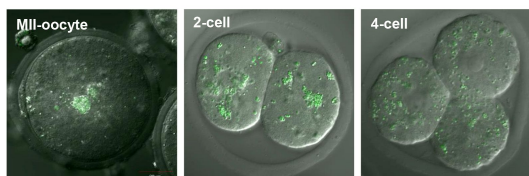
卵細胞質にあらかじめ蓄積された脂肪滴の分解にオートファジーが関わっているか否かを調べるために (特にオートファジー活性が高い受精後の時期に焦点を当てる) オートファジー阻害下における脂肪滴の動態を解析する。脂肪滴の蓄積によって周辺のオルガネラの局在に影響を受けている可能性もあるため、電子顕微鏡を用いた微細構造の観察も併せて実施する。一方で、受精直後に活発に起こるオートファジーによって脂肪滴

が分解される分子機構についても検討を行う。

4. 研究成果

(1) 脂肪滴可視化マウス由来の卵子や受精卵を生きのまま蛍光観察するために、アステック社のリアルタイム培養細胞装置システム (CCM-MULTI) を導入して、受精直後から数日間培養しながら経時的に蛍光観察ができる条件を検討し、蛍光観察を行わない通常培養した受精卵と同等の発生が可能な観察条件を見出した。次に構築した条件下で、受精卵の脂肪滴の動態を詳細に観察したところ、受精前までは卵細胞質内で凝集している脂肪滴は、受精直後に分散する傾向が高いことが明らかとなった (図 1)。さらに 4 細胞期以降に細胞質内で再合成される可能性が高いことも分かった。

図 2 : 脂肪滴可視化マウス由来の未受精卵



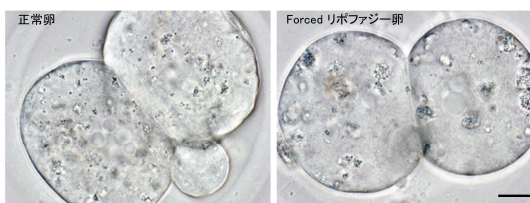
(左: MII-oocyte) 受精後の 2 細胞 (中央) 4 細胞 (右) を蛍光顕微鏡で観察した様子。

(2) ゲノム編集技術を用いて全身性に ADRP/Perilipin2 を欠損するノックアウトマウスを複数ライン作製した。当初の予想に反して、このノックアウトマウスは正常に誕生し成育した (野生型マウスと比較すると、出生後してから離乳するまでの成長がやや遅い印象がある)。このノックアウトメスマウスにホルモン投与によって排卵を誘起させたところ成熟卵子 (MII-卵母細胞) が採取された。野生型マウスと比較すると、排卵数には有意な差は観察されなかった。次に採取した卵子の脂肪滴の動態を観察したところ、一部の卵子では脂肪滴が凝集していることが明らかとなった。一方で、凝集していない卵子と野生型マウス由来の精子を用いて体外受精を行うと、これらの卵子は正常に受精し発生することが分かった。またノックアウトメスマウスを長期間野生型オスマウスと交配させると、産仔数や出産回数が減少する傾向があった。

(3) 受精後のオートファジーを特異的に阻害すると、8 細胞期までに胚発生は停止するがこの際に脂肪滴の大規模な蓄積は観察されなかった。電子顕微鏡を用いた観察からも、オートファジー欠損下における明確な脂肪滴の蓄積は観察されなかった。そこでリパーゼ阻害剤で受精卵を処理すると、発生に伴い脂肪滴が蓄積することが明らかとなった。このことから、受精後に起こる脂肪滴の分解は、主にリパーゼが担っていると考えられる。次に、受精後に活発に起こるオートファジーによって卵細胞質中の脂肪滴を人工的に分解

させることで、オートファジーによる脂肪滴の選択的分解の可能性を検討した。受精後の卵細胞質内にオートファジーの選択的アダプターの 1 つである p62/Sqstm1 を脂肪滴の表面上に発現させたところ、卵細胞質中で分散していた脂肪滴が凝集し、細胞膜の近傍へ移動することが明らかとなった (図 2)。オートファジー阻害下では、このような脂肪滴の変化は観察されなかったことから、オートファジー依存的に脂肪滴の動態が変化すると考えられる。このような受精卵では、細胞内の脂肪含量が、通常の受精卵の半分ほどに減少することも分かった。さらに電子顕微鏡を用いたその後の解析から、細胞膜周辺に運ばれた脂肪滴の周辺には多数のリソソームが局在することが分かった。これらの結果は、脂肪滴の表面上にオートファジーアダプターを発現させるだけで、内在性のオートファジー活性によって脂肪滴が選択的に分解されることを示唆しており、受精直後のオートファジーによって脂肪滴の品質管理が行われる可能性も考えられる。なお、我々はこのようなオートファジーによるシステムを利用して脂肪滴を分解させる機構を Forced リポファジーと名付けた。

図 2 : 受精後の卵細胞質内の脂肪滴上にオー



トファジーアダプター-p62/Sqstm1 を発現させると、通常は分散して局在する脂肪滴 (左: 正常卵) が、凝集しながら細胞膜近傍へ移動する (右: Forced リポファジー卵)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Tatsumi T, Takayama K, Ishii S, Yamamoto A, Hara T, Minami N, Miyasaka N, Kubota T, Matsuura A, Itakura E*, Tsukamoto S*, Forced lipophagy reveals that lipid droplets are required for early embryonic development in mouse, *Development*, 査読有, 145(4), 2018
DOI: 10.1242/dev.161893.

Tatsumi T, Tsukamoto S*, Degradation of maternal factors during preimplantation embryonic development, *J Reprod Dev*, 査読有, 2018 (in press)
DOI: 10.1262/jrd.2018-039.

[学会発表] (計 6 件)

塚本 智史, 初期胚発生におけるオートファジーの役割, 第 62 回日本生殖医学会学術

講演会(モーニングセミナー) 2017年11月17日、海峡メッセ下関(山口県下関市) 招待講演

辰巳 嵩征、山本 篤、久保田 俊郎、宮坂 尚幸、塚本 智史、マウス受精卵におけるオートファジーによる脂肪滴選択的分解(リポファジー)の役割、第62回日本生殖医学会学術講演会、2017年11月16日~17日、海峡メッセ下関(山口県下関市)、口頭発表

辰巳 嵩征、塚本 智史、Induction of p62-mediated lipophagy in mammalian cells and mouse early embryos、第110回日本繁殖生物学会大会・Fourth World Congress of Reproductive Biology、2017年9月26日~30日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) ポスター発表

辰巳 嵩征、山本 篤、塚本 智史、受精誘導型オートファジーによる脂肪滴選択的分解に関する研究、第109回日本繁殖生物学会大会、2016年9月12日~14日、麻布大学(神奈川県相模原市)、口頭発表

塚本 智史、初期胚発生におけるオートファジーの役割、第108回日本繁殖生物学会大会シンポジウム「生命のリサイクル: 初期発生から次世代へ」、2015年9月20日、宮崎市民プラザ(宮崎県宮崎市) 招待講演

塚本 智史、原 太一、南 直治郎、佐藤健、受精前後のマウス卵細胞質における脂肪滴の動態観察、第108回日本繁殖生物学会大会、2015年9月17日~20日、宮崎大学(宮崎県宮崎市)、口頭発表

〔その他〕

研究成果のプレス発表

<http://www.qst.go.jp/information/itemid/034-003885.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 智史 (TSUKAMOTO, Satoshi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・技術安全部・生物研究推進課・主任研究員

研究者番号: 80510693