

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23687027

研究課題名(和文) 初期胚発生におけるタンパク質・オルガネラの選択的分解のメカニズムと生理機能

研究課題名(英文) Selective degradation of proteins and organelles during early embryogenesis

研究代表者

佐藤 美由紀 (Sato, Miyuki)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：70321768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,600,000円

研究成果の概要(和文)：卵子は受精によって多能性を獲得し、たった1個の受精卵からすべての細胞が作られる。本研究により、受精後にはオートファジーが誘導され、精子から持ち込まれたミトコンドリア等を選択的に分解すること、この分解がミトコンドリアDNAの母性遺伝に必要であることを世界に先駆けて発見した。また、この時期にはエンドサイトーシスも活性化し、役割を終えた膜成分の積極的な分解が起きること、この分解に特殊なユビキチン修飾が関与することを見出した。本研究によって卵子が多能性を獲得する時期にリソソーム分解系が果たす新たな生理機能が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Fertilization triggers cell remodeling from each gamete to a totipotent zygote. Using *C. elegans* as a model system, we have shown that lysosomal degradation pathways play important roles in cellular remodeling during this developmental transition. Endocytosis and autophagy, two pathways leading to the lysosomes, are highly upregulated during this period. A subset of maternal membrane proteins is selectively endocytosed and degraded in the lysosomes before the first mitotic cell division. UBC-13-dependent K63-linked ubiquitination is required for the proper sorting of membrane proteins. Autophagy is also induced shortly after fertilization and executes the degradation of paternally inherited embryonic organelles, e.g. mitochondria and membranous organelles. This mechanism underlies the maternal inheritance of the mitochondrial genome. Our study revealed physiological roles of lysosomal pathways during early development.

研究分野：発生細胞生物学

キーワード：オートファジー エンドサイトーシス リソソーム 分解 受精 線虫 ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

卵母細胞は受精によってすべての細胞に分化しうる全能性を獲得し接合子へと変化する (oocyte-to-zygote transition). この過程は高度に分化した生殖細胞から全能性を持った接合子への非常に大きな質的变化ととらえることができる. このとき染色体の構造や遺伝子の発現様式の転換が重要であるのはもちろんであるが, 細胞質成分の再編成が起きることも知られている. 例えば受精卵における卵母細胞由来 mRNA の大規模な分解や, 減数分裂特異的なタンパク質のプロテアソームによる選択的分解である. これら分解を介した再編成は, 正常な胚発生 (体細胞分裂) に必須である ( ). しかしながら, 初期胚において細胞を形作る膜成分やオルガネラの変化についてはこれまでほとんど知見がなかった.

われわれは線虫 *C. elegans* の生殖腺をモデルにした *in vivo* 解析系を構築し, 受精前後の時期には発生のイベントと連動して同調的分泌やエンドサイトーシスの一過的な活性化が生じ, 膜動態がダイナミックに変化していることを見出していた ( ). また, 受精後には別のリソソーム分解系であるオートファジーが誘導されるという予備的結果も得ていた. 一方, ミトコンドリア DNA は母性遺伝することが知られ, 父方のミトコンドリア DNA は受精前後の時期に排除されることが知られていたが, その具体的なメカニズムはわかっていなかった ( ).

## 2. 研究の目的

本研究は特にエンドサイトーシスやオートファジーといったリソソーム分解系に注目し, 線虫の生殖腺をモデルに以下の二つの視点で研究を行った.

1) 受精卵においてこれら分解系がどのような基質をどのように分解するのか, その分子メカニズムを解明する.

2) リソソーム分解系による膜成分の分解・再編成が果たす生理的役割を明らかにする.

それにより, 受精に伴う細胞の機能/性質の変化と構造の関係を理解し, 生殖という生物にとって最も重要ともいえる問題の基本原則を明らかにすることを目指した. このような基礎研究は幹細胞研究や生殖医療など応用分野の発展においても不可欠であると考えている.

## 3. 研究の方法

(1) 線虫生殖腺において蛍光タンパク質 (GFP や RFP) で標識した各種マーカータンパク質を発現する形質転換体を作製し, 受精前後のオルガネラや特定のタンパク質の動態を詳細に観察した.

(2) 受精卵で誘導されるオートファジーに

ついて分解を受ける基質の同定を行った. また, オートファジー関連因子の関与を系統的に解析した. オートファジーの生理的意義を明らかにするため, オートファジー関連因子の表現型解析を行った.

(3) エンドサイトーシスで分解される基質を GFP で可視化した線虫株を用い, 網羅的 RNAi 法によってエンドサイトーシスに関わる因子の探索を行った. 同定した因子については作用機序を明らかにするためさらに詳細な解析を行った. また, RNAi や破壊株の表現型解析を行い, 発生や成育に対する影響を調べた.

(4) エンドサイトーシスやオートファジーを誘導するシグナル経路を明らかにするため, 様々なシグナル経路や発生イベントの変異の影響を調べた.

## 4. 研究成果

(1) オートファジーによる父性オルガネラの選択的分解

オートファジー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 ( ). 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 ( ). われわれは線虫の受精卵では侵入した精子近傍に局所的にオートファゴソームが形成されることを見出した. さらにマーカーを用いた詳細な観察から, その基質は父方 (精子) に由来するミトコンドリアや MO (membranous organelle) といった父性オルガネラであることを見出した ( ).

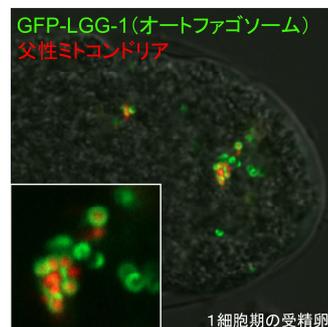


図1. 父性ミトコンドリアを選択的に取り囲むオートファゴソーム.

これら父性オルガネラは受精によって卵母細胞に持ち込まれるが, すみやかにオートファゴソームに取り囲まれ, 16細胞期までには分解される. また, オートファジー経路の変異体においては父性オルガネラの分解が阻害され, 幼虫期まで父性オルガネラが残

存した。われわれはこの父性オルガネラの選択的分解を“allophagy (allogeneic organelle autophagy)”と命名した( )。さらにallophagyを阻害すると父性ミトコンドリアDNAが次世代にまで遺伝してしまうことも判明し、線虫におけるミトコンドリアDNAの母性遺伝に必須であることを示した( )。

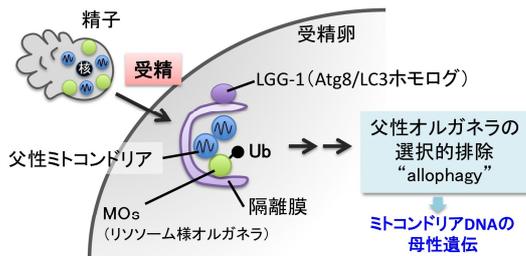


図2. オートファジーによる父性オルガネラの選択的分解とミトコンドリアDNAの母性遺伝。

allophagyを誘導するシグナルについても解析した。allophagyではオートファゴソームが父性オルガネラの周囲を選択的に取り囲むこと、また変異体を使って多精を引き起こすと侵入した複数の精子核の周辺にそれぞれオートファゴソームが形成されることから、精子オルガネラの侵入自体が引き金となりオートファジーを誘導していると考えられた( )。

また、オートファジー経路の*lgg-1*や*atg-18*の破壊株は高頻度に胚発生後期、または孵化した直後の第一幼虫期で致死となったことから、オートファジーの活性が正常な発生に必須であることが判明した( )。

## (2) K63 ユビキチン鎖によるエンドサイトーシスの制御

受精卵ではエンドサイトーシスが一過的に活性化する。卵母細胞に由来する各種膜タンパク質の動態を調べたところ、多くの細胞膜タンパク質がエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれ、リソソームで分解されていた。一方で、同じ細胞膜に局在するタンパク質でも分解を受けずに安定に存在するタンパク質種もあったことから、このエンドサイトーシスは基質選択的であることがわかった( )。また、エンドサイトーシスの制御にはユビキチン化が関与することが知られている( )。この時期の細胞内のユビキチンの動態を詳細に調べたところ、エンドソーム上に大量のユビキチン鎖が一過的に集積することが明らかになった。またこのユビキチン鎖は主にK63結合であり、K48結合ユビキチン鎖は検出されなかった(図3; )。

さらに、膜タンパク質のエンドサイトーシスに関わる因子を網羅的RNAi法により探索

したところ、UBC-13とUEV-1を同定した。これら二つの因子はK63結合ユビキチン鎖の生成に特異的に関わるユビキチン結合酵素複合体として機能することが知られている( )。*ubc-13*または*uev-1*変異体の受精卵では、膜タンパク質が細胞膜から取り込まれるものの、エンドソームから再び細胞膜へと輸送されてしまい、安定に存在する様子が観察された(図4)。またこれら変異体では、受精卵エンドソーム上へのK63結合ユビキチン鎖の集積が著しく低下していた。これらの結果から、UBC-13・UEV-1によるK63結合ユビキチン鎖の生成がエンドソーム上での膜タンパク質のソーティングに必要であることが示唆された(図3; )。また、ユビキチン化は受精後の細胞周期の進行に関わるAnaphase-promoting complex (APC)の下流で制御されていることも明らかとなった(図3; )。

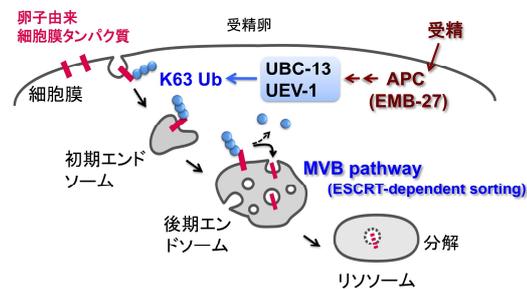


図3. 受精卵におけるK63結合ユビキチン化を介したエンドサイトーシスとそれを制御するシグナル経路。

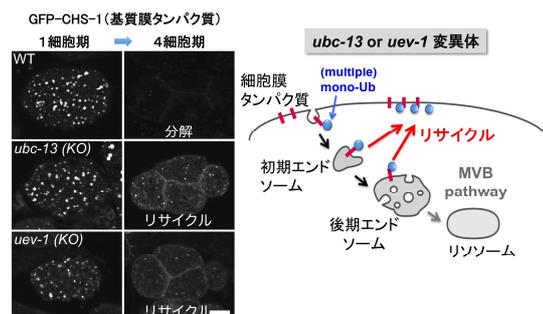


図4. *ubc-13*・*uev-1*変異体ではエンドサイトーシスで取り込まれた基質が細胞膜へリサイクルされる。

エンドサイトーシスの初期ステップを制御する*rab-5*の機能阻害を行うと、細胞分裂は進行するものの初期胚発生に異常を生じ、強い胚性致死性を示した。この結果は受精卵におけるエンドサイトーシスが正常な胚発生に必須であることを示している。*ubc-13*や*uev-1*の変異体は25で部分的な胚性致死を示した。これら変異体では基質の選択性は低下しているが、エンドサイトーシスそのものは阻害されていないため、弱い表現型を示すと考えられる( , 未発表)。

受精前後の卵子から胚への変換期には細胞内で様々な変化が起きるが、材料の取り扱いが難しいことなどから近代的な細胞生物

学や分子遺伝学の手法を用いた解析は非常に限られていた。今回さまざまな手法が利用可能な線虫を材料に用いることで、卵子から胚への変換期の解析モデル系となることを提示した。また、この時期にはリソソーム分解系が積極的な役割を果たしていること、さらにこの分解がミトコンドリア DNA の母性遺伝のメカニズムでもあることを見出した( )。その後、類似の現象は哺乳類でも保存されていることが報告されており、動物初期発生の共通原理の理解にもつながると期待される。

#### <引用文献>

Stitzel, M. L. and Seydoux, G. (2007). Regulation of the oocyte- to-zygote transition. *Science* 316, 407-8.

Sato, K., Sato, M., Audhya, A., Oegema, K., Schweinsberg, P. and Grant, B. D. (2006). Dynamic regulation of caveolin-1 trafficking in the germ line and embryo of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 17, 3085-94.

Sato, M., Grant, B. D., Harada, A. and Sato, K. (2008). Rab11 is required for synchronous secretion of chondroitin proteoglycans after fertilization in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci* 121, 3177-86.

Ankel-Simons, F. and Cummins, J. M. (1996). Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories on human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13859-63.

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

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

Sato, M. and Sato, K. (2012). Maternal inheritance of mitochondrial DNA: degradation of paternal mitochondria by allogeneic organelle autophagy, allophagy. *Autophagy* 8, 424-5.

Sato, M. and Sato, K. (2013a). Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta* 1833, 1979-84.

Sato, M., Konuma, R., Sato, K. and Tomura, K. (2014). Fertilization- induced K63-linked ubiquitylation mediates clearance of maternal membrane proteins. *Development* 141, 1324-31.

Traub, L. M. and Lukacs, G. L. (2007). Decoding ubiquitin sorting signals for clathrin-dependent endocytosis by CLASPs.

*J Cell Sci* 120, 543-53.

Eddins, M. J., Carlile, C. M., Gomez, K. M., Pickart, C. M. and Wolberger, C. (2006). Mms2-Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation. *Nat Struct Mol Biol* 13, 915-20.

Sato, M. and Sato, K. (2013b). Dynamic regulation of autophagy and endocytosis for cell remodeling during early development. *Traffic* 14, 479-86.

#### 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17件)

Zhang H, Chang JT, Guo B, Hansen M, Jia K, Kovács AL, Kumsta C, Lapierre LR, Legouis R, Lin L, Lu Q, Meléndez A, O'Rourke EJ, Sato K, Sato M, Wang X, Wu F. Guidelines for monitoring autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* (2015) 11(1):9-27. doi: 10.1080/15548627.2014.1003478. 査読あり.

Saegusa K, Sato M, Sato K, Nakajima-Shimada J, Harada A, Sato K. *Caenorhabditis elegans* chaperonin CCT/TRiC is required for actin and tubulin biogenesis and microvillus formation in intestinal epithelial cells. *Mol Biol Cell* (2014) 25(20):3095-104. doi: 10.1091/mbc.E13-09-0530. 査読あり.

Sato K, Norris A, Sato M, Grant BD. *C. elegans* as a model for membrane traffic. *WormBook* (2014) doi: 10.1895/wormbook.1.77.2. 査読なし.

Sato M, Konuma R, Sato K, Tomura K, Sato K. Fertilization-induced K63-linked ubiquitylation mediates clearance of maternal membrane proteins. *Development* (2014) 141(6):1324-31. doi: 10.1242/dev.103044. 査読あり.

佐藤美由紀, 佐藤健. 精子由来ミトコンドリアのオートファジーによる分解. *医学の歩み* (2014) 250:479-482. <http://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiBookDetail.aspx?BC=925007> 査読無し.

佐藤健, 佐藤美由紀. 受精における精子ミトコンドリアの運命と母性遺伝. *細胞工学* (2014) 33(4):414-419. <http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901535.html> 査読無し.

Sato M, Sato K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta* (2013) 1833(8):1979-84. doi: 10.1016/j.bbamcr.

2013.03.010. 査読あり.

Sato M, Sato K. Dynamic regulation of autophagy and endocytosis for cell remodeling during early development. *Traffic* (2013) 14(5):479-86. doi: 10.1111/tra.12050. 査読あり.

佐藤美由紀, 佐藤健. ミトコンドリア DNA の母性遺伝を制御する多様な分子機構. *生化学* (2013) 85(5):357-362. [http://www.jbsoc.or.jp/back\\_no/85-5](http://www.jbsoc.or.jp/back_no/85-5) 査読あり.

佐藤美由紀. 受精卵における細胞内リモデリングのメカニズム. *日本女性科学者の会 学術誌* (2013) 13:9-13. [https://www.jstage.jst.go.jp/browse/sjws/13/0/\\_contents/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/browse/sjws/13/0/_contents/-char/ja/) 査読無し.

Sato M, Sato K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA: degradation of paternal mitochondria by allogeneic organelle autophagy, allophagy. *Autophagy* (2012) 8(3):424-5. doi: 10.4161/auto.19243. 査読あり.

佐藤美由紀, 佐藤健. ミトコンドリアゲノムの母性遺伝のメカニズム —オートファジーによる父性ミトコンドリアの分解—. *化学と生物* (2012) 50(7):479-480. [http://www.jsbba.or.jp/pub/journal\\_kasei/kasei\\_contents/vol50\\_7\\_2012.html](http://www.jsbba.or.jp/pub/journal_kasei/kasei_contents/vol50_7_2012.html) 査読無し.

佐藤美由紀, 佐藤健. 線虫受精卵における父性ミトコンドリアのオートファジーによる選択的分解～ミトコンドリア DNA の母性遺伝のメカニズム～ *実験医学* (2012) 30:614-618. <https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758100816/index.html> 査読無し.

佐藤健, 佐藤美由紀. 精子由来ミトコンドリアは受精依存的に誘導されるオートファジーによって選択的に分解される. *細胞工学* (2012) 31:590-591. <http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901306.html> 査読無し.

佐藤健, 佐藤美由紀. 動物におけるミトコンドリア DNA の母性遺伝の分子機構. *生体の科学* (2012) 63:436-437. <http://medicalfinder.jp/toc/2425/2012/63/5> 査読無し.

Sato M, Sato K. Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science* (2011) 334(6059):1141-4. doi: 10.1126/science.1210333. 査読あり.

Sato M, Saegusa K, Sato K, Hara T, Harada A, Sato K. *Caenorhabditis elegans* SNAP-29 is required for organellar integrity of the endomembrane system and general exocytosis in intestinal epithelial cells. *Mol Biol Cell* (2011) 22(14):2579-87. doi: 10.1091/mbc.E11-04-0279. 査読あり.

[学会発表](計21件)

Miyuki Sato, et al. Dynamic Regulation of Autophagy and Endocytosis for Cell Remodeling during Early Development in *C. elegans*. 第37回日本分子生物学会年会 (2014.11.25) パシフィコ横浜. 招待講演.

佐藤美由紀. 線虫受精卵における父性オルガネラの選択的分解に關与する新規因子の探索. 第8回オートファジー研究会 (2014.11.10) シャトレゼガトーキングダムサッポロ.

Miyuki Sato, et al. Fertilization-induced K63-linked ubiquitination mediates clearance of maternal membrane proteins. *C. elegans* Development, Cell Biology and Gene Expression Meeting in association with the 6th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting (2014.7.17) 奈良県新公会堂.

坂口 愛沙, 佐藤 美由紀, 他. 線虫受精卵においてダイナミックに変化する RAB-11 の動態制御機構の解析. 第66回日本細胞生物学会年会 (2014.6.12) 奈良県新公会堂・東大寺総合分化センター.

佐藤美由紀. 父性ミトコンドリアの選択的オートファジーの分子機構解明を目指して. YoungMito2014 (2014.5.22) 大阪府箕面山荘.

Shota Tomizawa, Miyuki Sato, et al. Mechanism of selective degradation of paternal mitochondria by autophagy. 第36回日本分子生物学会年会 (2013.12.4) 神戸ポートアイランド.

佐藤美由紀. 受精によって誘導されるオートファジーの分子機構の解明を目指して. 第7回オートファジー研究会 (2013.12.20) ヤマハリゾート 嬌恋.

佐藤美由紀. 受精卵におけるオートファジーとエンドサイトーシスの生理機能. 細胞内ロジスティクスシンポジウム (2013.9.17) 淡路夢舞台. 招待講演.

佐藤美由紀, 他. オートファジーによる父性ミトコンドリアの選択的分解と母性遺伝. 第86回日本生化学会大会 (2013.9.11) パシフィコ横浜. 招待講演.

佐藤美由紀, 佐藤健. 受精後に誘導されるエンドサイトーシスを介した細胞膜成分の再編成のメカニズム. 第65回日本細胞生物学会大会 (2013.6.19) ウィンク愛知.

Miyuki Sato, Ken Sato. Fertilization-triggered autophagy degrades paternal mitochondria in *C. elegans* embryos. 第85回日本生化学会大会 (2012.12.15) 福岡国際会議場. 招待講演.

Miyuki Sato, Ken Sato. Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. The 6th International Symposium on Autophagy 2012 (2012.10.28) 沖縄万国津梁館. 招待講演.

Miyuki Sato, Ken Sato. Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Cell Biology. (2012.5.30) 神戸国際会議場 . 招待講演 .

佐藤美由紀 , 佐藤健 . Fertilization triggers selective degradation of membrane proteins and organelles in *C. elegans* embryos. 第34回日本分子生物学会大会 (2011.12.16) パシフィコ横浜 .

Ken Sato, Miyuki Sato. Selective degradation mechanisms of meiotic membrane proteins in *C. elegans* embryos. 第84回日本生化学会大会 (2011.9.23) 国立京都国際会館 . 招待講演 .

〔その他〕

ホームページ等

<http://makukinou.showa.gunma-u.ac.jp/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

佐藤 美由紀 (SATO, Miyuki)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：70321768