

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2014～2016  
課題番号：26291041  
研究課題名(和文) 初期胚組織構築を制御するマイクロオートファジーの研究  
  
研究課題名(英文) Microautophagy in the mouse early embryogenesis  
  
研究代表者  
和田 洋 (Wada, Yoh)  
  
大阪大学・産業科学研究所・准教授  
  
研究者番号：50212329  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：エンドサイトーシスは細胞外シグナルの受容、栄養供給を通じて、様々な生理機能の制御に必須な役割を果たす。マウス初期胚では「マイクロオートファジー」とよばれる極めてユニークなメカニズムでエンドサイトーシスが進行する。マイクロオートファジーには低分子量GTP結合タンパク質rab7が必須である。rab7を欠失するマウス胚は、初期発生、中胚葉組織を形成する原腸陥入途中で発生が停止する。組織特異的なrab7破壊の結果から、rab7の機能はnon cell autonomousな機構で中胚葉誘導に関与することが示された。rab7変異胚では異所的にWntの負の制御因子が蓄積し、中胚葉誘導が阻害されていた。

研究成果の概要(英文)：Rodent embryos at peri-gastrulation has a cylindrical structure where the epiblast is surrounded by a stratified epithelium (visceral endoderm: VE). The VE is highly active in endocytosis and develops large lysosomal compartments known as apical vacuoles. The membrane dynamics of apical vacuoles are distinct from those of canonical lysosomes: delivery of endosomes to the large apical vacuoles occurs via microautophagy, and this process requires the function of the small GTP-binding protein rab7. The rab7-deficient embryos exhibit developmental defects at gastrulation. The mutant embryo failed to assemble the mesodermal tissues due to severe reduction of Wnt- $\beta$ -catenin signalling activity. Deletion of the rab7 function only in VE resulted in developmental defects similar to those in the systemic gene knockout, suggesting that the rab7 function regulated the Wnt signalling through a non-cell autonomous mechanism.

研究分野：細胞生物学

キーワード：シグナル伝達 初期発生 エンドサイトーシス リソソーム ミクロオートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

細胞・組織間の情報伝達を担う分子は細胞によって産生されたあと、細胞外に分泌され、産生細胞自身に、あるいは他の細胞に作用する。細胞内では、特定の分子の活性は、タンパク質分解、リン酸化をはじめとする翻訳後修飾によって制御することができる。しかし、細胞表面、細胞外の分子活性の制御はこれらの方法では実現できない。発生プログラムの進行に伴い、細胞外の環境を適切に変化させ、組織のパターニングを進めるには、分泌シグナルや細胞外マトリクスの産生、分泌といった、「正」の制御機構のみならず、シグナル活性をオフにする「負」の制御機構を理解することが必須となる。シグナルの産生、それに引き続く分解と消去が時空間的に正しく制御されることにより、胚全体のパターニングが実現されていると考えられるが、どのようなメカニズムでシグナル活性の消去・分解がなされているのか、その機構は未解明のまま残されている。

さて、細胞間情報伝達の制御に細胞内膜輸送が必須であることは広く知られている。エンドサイトーシスによるシグナル受容体の取り込みによって細胞表面の受容分子の数が減り、細胞間シグナル分子に反応しなくなる、いわゆるダウンレギュレーションは古くから知られている。また、リガンド-受容体複合体が細胞内のメッセンジャーを活性化する場合が初期エンドソームであることが見出されており、エンドサイトーシスを介した細胞内膜輸送は負の制御のみならず、細胞応答をオンにする機構としてもはたらいている。とすれば、細胞間情報伝達が短時間のうちに限られた空間でダイナミックに変化する初期胚においてエンドソーム・リソソームの膜系はなんらかの制御機能を有するであろう。

私たちは後期エンドソーム-リソソームの膜ダイナミクスを担うタンパク質複合体、HOPS に着目し、シグナル伝達による組織構築など、個体レベルでの哺乳動物における生理機能を明らかにしたいと考えていた。そこで HOPS 複合体のサブユニットのひとつ、mVam2 分子の遺伝子をマウスで機能喪失させることを行った。

mVam2 変異マウスは受精後 6 日(E6.0)前後より野生型に比べて形態が異常となり、E7.8 には肥大化した胚体外組織と低形成の胚体からなる異常胚となって発生が停止する。mVam2 変異胚での Bmp シグナルに反応する Smad1 のリン酸化状態を指標にシグナル活性を検討したところ、異所的に Bmp 活性の上昇がおきることに気がついた。Bmp シグナルは原腸陥入期の胚では神経誘導を負に制御する因子として知られている。さらには、原腸

陥入前には、胚体外・胚体の区画化に関与することもその当時、あきらかにされつつあった。野生型胚では Bmp シグナルは、着床直後の初期胚(E5.2)では遠位側先端部から近位部にかけて活性がみられる。発生が進むにしたがって、遠位側の Bmp 活性は低下し、原腸陥入期(E6.2~6.7)では、胚本体を包む VE での活性はほとんど見られず、胚体外外胚葉に接する VE に限局する様になる。しかし mVam2 変異胚では、E6.2 においても VE 全体でリン酸化された Smad1 が観察され、Bmp シグナルが上昇したままであることが明らかとなった。すなわち、mVam2 依存のエンドサイトーシス経路は BMP シグナルの時間的・空間的な活性分布を規定し、初期発生のパターニングを制御していることを見出した。

この研究の過程で、私たちは奇妙な現象に出会っている。初期胚のエンドサイトーシス経路には他の細胞では見られていない、ユニークな過程がはたらいている。初期胚の吸収上皮組織 visceral endoderm (VE)の細胞内には、核の近傍、頂端面側に(=母体に面する方向)大きな空胞 apical vacuole が存在しており、その空胞と頂端側形質膜の間には様々な電子密度と形態を示す膜構造が発達している。HRP の取り込み実験と電顕観察を組み合わせた結果、これらのオルガネラは頂端面形質膜から物質をとりこみ、空胞に輸送するエンドサイトーシス経路を構成することがわかった。VE は母体から栄養を取り込み、胚本体(epiblast: epi)に受け渡している。

私たちは VE でのエンドサイトーシスを見ているうち、いくつか奇妙な現象を見いだした。蛍光デキストランでフルにラベルした apical vacuole の内腔には、蛍光を発しない球状の構造がしばしば観察される。また、赤と緑のデキストランを用いてパルスラベリングの観察をすると、赤でフルラベルされた apical vacuole に、あとから来た緑の球が包み込まれること、電子顕微鏡下で、apical vacuole 内に球状の構造が観察され、その電子染色の程度や大きさが細胞表面と apical vacuole の間の細胞質にあるエンドソームと同じであること、などが明らかになった。このような観察から、エンドソームから apical vacuole への輸送では、一般的な膜融合が起きるのではなく、エンドソームが丸ごと飲み込まれてそのあと、apical vacuole 内で膜が分解されて、エンドソームの内容物が apical vacuole 内腔に放出される、マイクロオートファジーが起きていると考えた。脂質、リン脂質分解酵素を阻害する低分子化合物オルリスタットの存在下で赤と緑のデキストラン取り込みを行うと、三十分後でも両者は混合することなく、赤の apical vacuole 内に緑の球状

構造=取り込まれたエンドソーム = が貯まることから、エンドソームの中身の移行には膜の分解が必要とされることが示され、ミクロオートファジーが起きていることが支持される。apical vacuole は動物細胞では例外的に大きいという形態的特徴に加えて、ミクロオートファジーというユニークなメカニズムによって形成されるオルガネラであることが明らかになった。

## 2. 研究の目的

これらの結果をさらに発展させるため、HOPS 複合体の機能発現に必須である低分子量 GTPase, Rab7 の機能欠損に伴う表現型に着目する。Rab 低分子量 GTPase タンパク質は 50 を越えるメンバーをもつ大所帯のタンパク質ファミリーを構成している。それぞれの rab タンパク質は特異的な細胞内局在を示し、特定の膜融合のプロセスを制御している。後期エンドソームのダイナミクスを担う rab7 は HOPS 複合体と相互に機能を制御しており、エンドソーム・リソソームの膜ダイナミクスに必須な分子として知られている。

本研究では、rab7 変異がもたらす発生異常の機序を分子レベルで明らかにし、ミクロオートファジーを含むエンドサイトーシスが発生プログラム実現に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

rab7 を欠失するマウス胚は、初期発生、原腸陥入途中で発生が停止する。初期発生を支配するシグナル伝達に着目し、Nodal/Tgf-beta シグナル、Bmp シグナル、Fgf シグナル、さらに canonical Wnt シグナルを whole mount in situ hybridization による応答遺伝子発現の有無とパターン、あるいは細胞内セカンドメッセンジャーのリン酸化状態と分布を全胚蛍光抗体染色で亜観察することにより検討した。

Rab7 遺伝子は初期胚全体で発現している。一方、ミクロオートファジーの活性は VE に特異的に見られ、他の組織では顕著ではない。Rab7 機能が、どの組織で胚発生に必須であるのかを検討する。Rab7 の遺伝子改変は Cre recombinase 依存の組換えによって Rab7 機能が破壊できる。また、臓側内胚葉特異的に Cre を発現する *Ttr-Cre*、胚体外胚葉特異的に Cre を発現する *Sox2-Cre* をもつマウスを用いる。これらのマウスを交配して、VE 特異的に Rab7 機能を破壊した場合に生じる表現型、Epi 特異的にそれを、systemic な遺伝子破壊マウス胚と比較した。

## 4. 研究成果

rab7 変異をヘテロに持つ親マウス同士の

交配から得られる rab7 欠損胚は、中胚葉マーカー Brachyury が近位側 epi の将来後方になる部位に局所的に発現しはじめることから、胚の前後軸の決定がなされ、中胚葉組織の誘導が起きている。しかし、中胚葉形成に必須な、上皮-間葉変換がほとんど進まず、E-cadherin の蓄積と N-cadherin の低発現から中胚葉組織の構築が行われていなかった。また Brachyury 発現細胞が遠位側に発達せず、原条の形成不全が認められる。胚体外中胚葉組織も低形成となり、原腸陥入が完了せず、以降の組織構築ができないために胎性致死となる。

この rab7 変異胚での中胚葉組織の萎縮は、*mVam2* 変異胚とは異なっている。*mVam2* では原腸陥入期の遠位側の胚体が小さく、近位側の胚体外組織が大きくなっていて、*mVam2* では側板中胚葉 *MesP1* の発現がほとんど見られないが、他方、胚体外中胚葉マーカー *Bmp4* や *Flk1* の発現は亢進しており、胚体中胚葉特異的に欠損が見られるのに対して、rab7 変異胚では Brachyury をはじめとして中胚葉マーカーの発現は極めて低い。

この表現型の違いから、rab7 変異が与える発生プログラムからの逸脱は、*mVam2* のそれとは異なると考えられる。rab7 変異胚でリン酸化 Smad1/5 の空間パターンを検討したところ、正常胚とほぼ同様に、遠位 VE で弱く近位 VE で強いパターンを保持しており、Bmp シグナルの時空間制御が異常となっているとは考えられない。

また、TGF- $\beta$  経路のパターニングに関して抗リン酸化 Smad2 抗体を用いて whole mount 胚蛍光抗体染色を行ったところ、変異胚でも顕著な異常が見られない。*Cerl-1*, *Lefty-1* の発現は低下しており anterior visceral endoderm(AVE)の不全が見られるものの、先に述べたように前後軸は崩壊していないため比較的マイルドな異常となっていた。Fgf 経路の指標 p42/44 タンパク質のリン酸化パターンも野生型と変異胚でちがいが観察されない。

EMT の不全から制御因子 Snail の発現異常が予測できた。rab7 変異胚では Snail が発現していなかった。Brachyury の発現低下などの表現型をあわせると canonical Wnt 経路の異常が考えられる。そこで、Wnt シグナルの直接のターゲット、*Axin2* を確認したところ、変異胚では *Axin2* の発現がほとんど起きていない。しかし、*Wnt3* の発現は野生型胚と同レベルで胚体外外胚葉で起きていることから、*Wnt3* の転写以降、受容に至る過程のどこかで Rab7 の機能が必須であることがわかった。

中胚葉は胚性外胚葉(epi)から分化する組織である。epi は原腸陥入前後の時期には顕著なエンドサイトーシス活性を示さず、またエンドソーム・リソソームなどのオルガネラも

電子顕微鏡下にはっきりとしない。一方、epiとは異なる組織である VE はきわめて活発なエンドサイトーシス活性をもつ細胞で、apical vacuole を発達させる細胞である。エンドサイトーシスの欠失が、見かけ上 endocytosis 活性をしめさない epi から生じる中胚葉のパターニングを異常とする、メカニズムがどのようなものであるか、という疑問が生じる。

そこで VE 特異的に Cre recombinase を発現させることのできる *Ttr-Cre* トランスジーンをもつ *rab7<sup>w/Δ</sup>* マウスと *rab7<sup>flox/flox</sup>* マウスを交配し、得られた初期胚を E6.7 あるいは E7.5 で観察した。CreTg, Rab7flox/D 胚では VE での Rab7 タンパク質が消失するが、epi での Rab7 は野生型と変化していない。この VE 特異的 *rab7* 欠失胚では VE の apical vacuole は断片化していた。発生の表現型としては *Brachyury* の発現を開始することができるが、原条形成はできなかつた。すなわち、VE 特異的 *rab7* 変異胚は systemic *rab7* 欠失胚と同様な表現型を示す。

また、epi 特異的に Cre を発現する *Sox2-Cre* を用いて同様の解析を行ったところ、Cre<sup>Tg</sup>, *rab7<sup>flox/Δ</sup>* 胚では epi での Rab7 タンパク質のシグナルが消失する。しかし、この変異胚は E7.5 以降も発生を続け、E8.7 には somite を形成するに至った。それ以降には顕著な後方構造の消失を伴って致死となるが、原腸陥入期には明らかな異常を示していない。

これらの部位特異的な遺伝子破壊実験の結果は、Rab7 の機能が、本来中胚葉になる細胞ではなく、周辺の細胞で必要とされることを意味している。すなわち、Rab7 の機能は細胞非自律的 (non cell autonomous) な機構により中胚葉誘導に参与している。

エンドサイトーシス、とりわけその後期ステージは物質の隔離や分解によって、基本的には、対象の活性を「負」に制御する方向に作用すると考えられる。「負」制御メカニズムの不全が Wnt シグナルのスイッチを OFF にする機構はどのようなものであろうか。細胞外に分泌される Wnt 分子は細胞表面の受容体に結合して細胞内へ移行し、細胞内メッセンジャー、β-catenin の安定化を引き起こして転写調節へとつながっていく。*Ttr-Cre* や *Sox2-Cre* の発現の結果から、non cell autonomous なメカニズムを想定しないといけないため、受容体結合後の、細胞内でのプロセスの不全は考えにくい。細胞外には、Wnt 受容体と拮抗してシグナルを「負」に制御する細胞外分泌タンパク質 Dkk が存在する。Dkk タンパク質に注目してその量と局在を蛍光抗体法で観察したところ、*rab7* 欠失胚では VE と epi の間の細胞間、あるいは VE の細胞内に高濃度に蓄積していた。高濃度の Dkk は Wnt 受容体を競合して、Wnt シグナルを伝達

させなくする。この Wnt 拮抗タンパク質の局在の時空間制御の破綻が、*rab7* 変異のもたらす発生異常の原因と結論した。このモデルは Rab7 依存のエンドサイトーシス経路が Wnt antagonist の時空間パターンを実現化するのに必須であることを意味している。また、non cell autonomous な作用メカニズムを説明できる。

## 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8件)

1. Takahashi, K., Mashima, H., Miura, K., Maeda, D., Goto, A., Goto, T., Sun-Wada, G.-H., Wada, Y., and Ohnishi, H. (2017). Disruption of small GTPase Rab7 exacerbates the severity of acute pancreatitis in experimental mouse models. *Sci Rep* 7, 2817. 10.1038/s41598-017-02988-3
2. Wada, Y., Sun-Wada, G.H., Kawamura, N., and Yasukawa, J. (2016). Membrane dynamics in mammalian embryogenesis: Implication in signal regulation. *Birth defects research Part C, Embryo today* 108, 33-44. 10.1002/bdrc.21124
3. Cotter, K., Liberman, R., Sun-Wada, G., Wada, Y., Sgroi, D., Naber, S., Brown, D., Breton, S., and Forgac, M. (2016). The α3 isoform of subunit a of the vacuolar ATPase localizes to the plasma membrane of invasive breast tumor cells and is overexpressed in human breast cancer. *Oncotarget* 7, 46142-46157. 10.18632/oncotarget.10063
4. Sun-Wada, G.H., and Wada, Y. (2015). Role of vacuolar-type proton ATPase in signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1847, 1166-1172. 10.1016/j.bbabbio.2015.06.010
5. Kawamura, N., Sun-Wada, G.H., and Wada, Y. (2015). Loss of G2 subunit of vacuolar-type proton transporting ATPase leads to G1 subunit upregulation in the brain. *Sci Rep* 5, 14027. 10.1038/srep14027
6. Wada, Y., Sun-Wada, G.H., Kawamura, N., and Aoyama, M. (2014). Role of autophagy in embryogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 27C, 60-66. 10.1016/j.gde.2014.03.010
7. Matsumoto, N., Daido, S., Sun-Wada, G.H., Wada, Y., Futai, M., and Nakanishi-Matsui, M. (2014). Diversity of proton pumps in osteoclasts: V-ATPase with α3 and α2 isoforms is a major form in osteoclasts. *Biochim Biophys Acta* 1837, 744-749. 10.1016/j.bbabbio.2014.02.011
8. Kurauchi-Mito, A., Ichihara, A., Bokuda, K., Sakoda, M., Kinouchi, K., Yaguchi, T., Yamada, T., Sun-Wada, G.H., Wada, Y., and Itoh, H.

(2014). Significant roles of the (pro)renin receptor in integrity of vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* 37, 830-835.  
10.1038/hr.2014.92

〔学会発表〕(計4件)

1. Kawamura N. et al., Neurons without G2 subunit of vacuolar-type proton transporting ATPase: A better source for enzyme structure and Functional studies. The 3<sup>rd</sup> NovAlix conference, Biophysics in drug discovery, July 7-10, 2016 Strasbourg, France
2. Sun-Wada GH et al Embryonic defect in *ATP6Voc* mutant mice lacking the vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase *c* subunit Keystone Symposium on Endoderm Lineages in Development and Disease, Feb 8-13, 2015 Keystone, USA
3. Wada Y. et al., Microautophagy, a unique membrane dynamics, in rodent visceral endoderm is involved in the regulation of canonical Wnt pathway and morphogenesis. Keystone Symposium on Endoderm Lineages in Development and Disease, Feb 8-13, 2015 Keystone, USA
4. Wada Y et al., Upregulation of Vacuolar-type ATPase G1 Subunit by a Genetic Loss of Subunit G2 in Neuron The 15<sup>th</sup> IUBMB-24<sup>th</sup> FAOBMB International Conference, Oct 21-26, 2014, Taipei, Taiwan.

〔図書〕(計1件)

1. Wada, Y., and Sun-Wada, G.H. (2016). Role of Autophagy in Mammalian Embryogenesis: Response to Developmental Programs. In *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*, pp136-146 M.A. Hayat, ed. (Oxford, UK: Elsevier).

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/organization/thi/thi\\_05/](http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/organization/thi/thi_05/)

6. 研究組織

(1)研究代表者

和田 洋 (WADA YOH)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：50212329