

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月18日現在

機関番号：82502

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658087

研究課題名（和文）

受精直後のオートファジーによる精子ミトコンドリア選択的分解に関する研究

研究課題名（英文）

Involvement of autophagy on sperm mitochondria degradation in mice

研究代表者

塚本 智史 (TSUKAMOTO SATOSHI)

独立行政法人放射線医学総合研究所・研究基盤センター・技術員

研究者番号：80510693

研究成果の概要（和文）：本研究では、受精直後における精子由来の（父性）ミトコンドリアの分解にオートファジーが関与するか否かを多面的に検討した。その結果、オートファジーが機能しない受精卵でも精子ミトコンドリアの分解は進行することが明らかとなった。これらの結果から、マウス受精卵における精子ミトコンドリアの分解にはオートファジー非依存的な分解系の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of our study is whether autophagy is involved in the sperm mitochondria degradation in mouse embryos. We showed that degradation of sperm mitochondria normally occurred in the absence of autophagy, indicating the possibility that other degradation pathway could be involved in the sperm mitochondria degradation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学 獣医学・応用動物科学

キーワード：オートファジー、ミトコンドリア、精子、受精卵、マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) ミトコンドリアの母系遺伝

一部の生物を除き、ほとんどの生物ではミトコンドリアは母親側から子に伝わる（母系遺伝と呼ばれる）。この分子メカニズムについて、これまでに様々な説が提唱されてきたが、父親（精子）由来のミトコンドリアが何らかのメカニズムで選択的に排除されるものだと理解されている。

(2) 精子ミトコンドリアの選択的排除の謎

これまでの研究から、マウスの場合、受精して8細胞期頃までには精子由来のミトコンドリア（精子ミトコンドリア）はすみやかに消失することが示されている（Cummins, Zygote, 1998）。さらに、精子ミトコンドリアはユビキチン化されることが示されており（Sutovsky, Nature, 1999）、ユビキチンによって標識された精子ミトコンドリアが

ロテアソームで分解されるという説が一般的になっている。

(3) オートファジーの関与

卵子内に進入した精子ミトコンドリアの近傍には多数の発達したオートファジー小胞（未だ不明な構造体）が出現することが古くから報告されている。この小胞によって精子ミトコンドリアが分解されるという説も支持されており確証はなかった。最近、我々のグループは受精直後のマウス初期胚でオートファジーが活発に起こることを明らかにした（Tsukamoto, Science, 2008）。オートファジーとはリソソームを分解の場とする細胞質成分の大規模な分解系である。オートファジーは隔離膜という二重の膜で取り囲んだ直径 $1 \mu\text{m}$ の範囲の細胞質成分をまとめて分解する。自身の細胞質を食べているようにも見えることから「自食」とも呼ばれる。オートファジーの主な役割は、恒常的な細胞内新陳代謝（変性タンパク質や老廃物の除去）と栄養飢餓時のアミノ酸供給だと考えられる。しかし、最近の研究からミトコンドリアがオートファジーによって選択的に分解されることも明らかとなっており、受精直後に起こる精子ミトコンドリアの分解にも関与している可能性が高いと予想された。

2. 研究の目的

精子ミトコンドリアの分解にオートファジーが関与するか検証し、ミトコンドリア母系遺伝の分子メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) mitoDsRed マウスを使った解析

全身のミトコンドリアが DsRed（赤色蛍光色素）で標識される mitoDsRed マウス（Hasuwa, Exp. Anim, 2010）の精巣上体尾部から精子を回収し野生型マウス由来の卵子を用いて体外受精を行い、精子ミトコンドリアの局在や分解状況について経時的に蛍光観察する。

(2) GFP-LC3 マウスを使った解析

オートファジーモニターマウスである GFP-LC3 マウス（Mizushima, Mol. Biol. Cell, 2004）由来の卵子と上記（1）の mitoDsRed マウス由来の精子を用いて体外受精を行い、GFP-LC3（緑色）と精子ミトコンドリア（赤色）の時空間的な局在変化について経時的に蛍光観察する。

(3) 電子顕微鏡による観察

GFP 抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察を行い、GFP-LC3 マウスの受精卵内の（精子ミトコンドリア近傍に出現すると予想される）構造体がオートファゴソームであるかどうかの検討を行う。

(4) 卵特異的オートファジー欠損マウスを使った解析

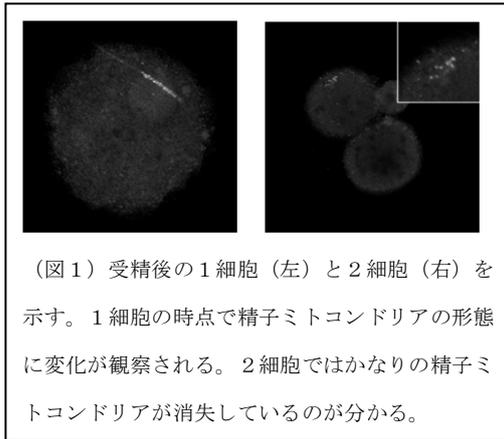
mitoDsRed マウス由来の精子と卵特異的にオートファジーを欠損したマウス由来の卵子（卵特異的オートファジー欠損卵*）を用いて体外受精を行い、精子ミトコンドリアの局在や分解状況について野生型由来の受精卵との差異を観察する。

*オートファジー欠損卵は受精後の 4～8 細胞期に発生停止するが、精子ミトコンドリアの分解はこの時期までに完了するため、今回の実験目的には使用可能と判断した。

4. 研究成果

(1) 精子ミトコンドリアの分解の様子

まず、精子のミトコンドリアが赤色蛍光色素で標識される mitoDsRed マウスの精子と野生型マウス由来の卵子を用いて体外受精を行い、受精直後から精子ミトコンドリアの分解状況を詳細に検討した。その結果これまでの報告通り、精子ミトコンドリアは受精後の 8 細胞期頃には消失するが、受精後の 1 細胞期の細胞質中ですでにその構造体を変化させており、2 細胞期では分解がさらに進んでいることが分かった（図 1）。

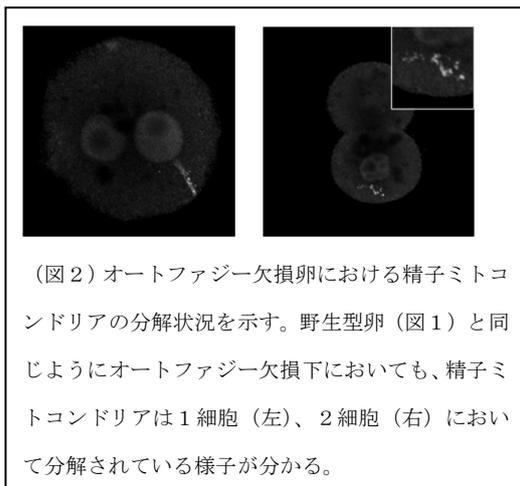


(図1) 受精後の1細胞(左)と2細胞(右)を示す。1細胞の時点で精子ミトコンドリアの形態に変化が観察される。2細胞ではかなりの精子ミトコンドリアが消失しているのが分かる。

また、GFP-LC3 マウスを使った観察から、1細胞、2細胞ともに受精卵内の精子ミトコンドリアの近傍にはオートファゴソームは存在するものの、共局在する割合は少ないことが分かった。

(2) オートファジー欠損下における精子ミトコンドリアの分解の様子

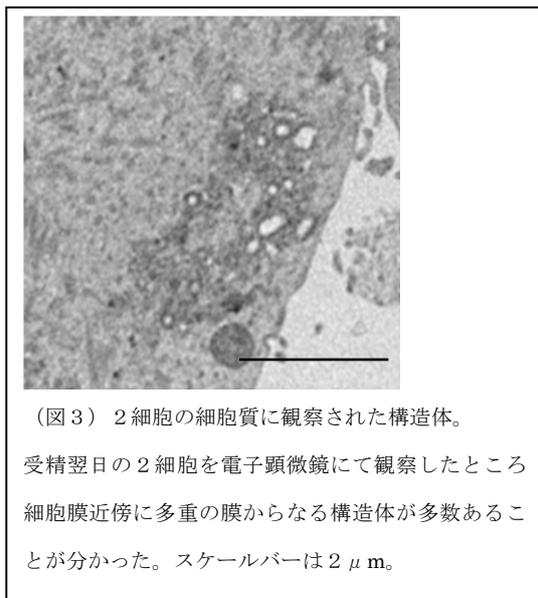
次に、オートファジーが欠損した受精卵内での精子のミトコンドリアの動態と分解状況を中心に解析を進めた。その結果、我々が観察した限りにおいてはオートファジー欠損下でも精子由来のミトコンドリアの分解は正常に進むことが明らかとなった(図2)。



(図2) オートファジー欠損卵における精子ミトコンドリアの分解状況を示す。野生型卵(図1)と同じようにオートファジー欠損下においても、精子ミトコンドリアは1細胞(左)、2細胞(右)において分解されている様子が分かる。

(3) その他の分解系の関与

我々が観察した限りにおいては、マウス受精卵ではオートファジーの欠損下でも精子ミトコンドリアの分解は進行するようである。しかし、最近になって線虫を使った解析から受精直後の精子ミトコンドリアがオートファジーによって選択的に分解されることが相次いで報告された(Sato, Science, 2011. AI Rawi, Science, 2011. Zhou, Cell Res, 2011)。オートファジーの機能は種間で保存されていることが多く、マウス受精卵でも同様の役割を担っている可能性がある。しかし、線虫の受精卵における精子ミトコンドリアの分解状況と我々が観察したマウス受精卵における分解状況は様子がかなり異なるのが事実である。今回の研究にはすべて固定した受精卵を観察のための材料にした。生きたままの状態(ライブセル)観察が可能な実験系を構築することで、真の精子ミトコンドリアの分解状況が明らかになるとのではないかと考えられる。さらに、電子顕微鏡を使った解析から、マウス受精卵の細胞質には培養細胞には観察されないような多数の膜から成るオルガネラの存在が明らかとなった(図3)。このような卵に固有のオルガネラが精子ミトコンドリアの分解に関与する可能性が示唆された。



(図3) 2細胞の細胞質に観察された構造体。

受精翌日の2細胞を電子顕微鏡にて観察したところ細胞膜近傍に多重の膜からなる構造体が多数あることが分かった。スケールバーは2 μ m。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

①Satoshi Tsukamoto、The role of autophagy during spermatogenesis in mice、Asian Reproductive Biotechnology Society、2010年11月9日、クアラルンプール

②塚本 智史、マウス胚発生におけるオートファジー(自食作用)の役割、第115回日本畜産学会、2012年3月28日、名古屋大学

〔図書〕(計1件)

①塚本 智史、オートファジーの受精卵発生における役割、Hormone Frontier in Gynecology、Vol18(1)、2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 智史 (TSUKAMOTO SATOSHI)

独立行政法人放射線医学総合研究所・研究
基盤センター・技術員

研究者番号：80510693

(2) 研究協力者

南 直治郎 (MINAMI NAOJIRO)

京都大学農学研究科・准教授

研究者番号：30212236