

成熟未受精卵における自発的アポトーシスの分子メカニズム

土屋 勇一

東邦大学医学部生化学講座

背景と目的：われわれの体を構成する数 10 兆個の細胞も、もとはたった 1 個の受精卵からでき上がる。成熟卵はその半分を担う極めて大事な細胞だが、その寿命は極めて短いとされる。近年の研究から多くの生物において、一定時間受精できなかった成熟卵はアポトーシスを起こして死ぬことが分かってきた。すなわち成熟した未受精卵は自発的アポトーシス機構を備えており、その解明は生殖医療の観点からも重要な課題である。しかし哺乳類の成熟卵はわ

ずかな量しか取れず、またヒト成熟卵を研究に用いるには倫理的な制約がある。そこでわれわれは、大量に材料が調製可能で、倫理的・技術的問題が少なく、生化学的解析に適するアフリカツメガエル成熟卵を用いて研究を行っている。

卵抽出液における自発的アポトーシス：成熟卵のゼリーを除去し試験管に詰めて遠心分離により破碎すると、細胞質・ミトコンドリアや細胞内膜を主成分とする卵抽出液が得られる (図 1A)。卵抽出液は細胞膜を持たない無細胞

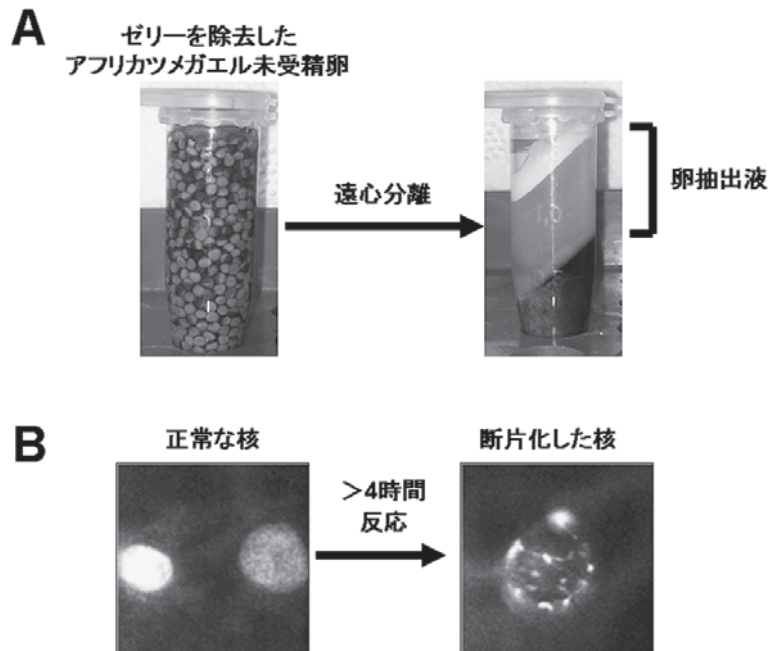


図1 アフリカツメガエル卵抽出液における自発的アポトーシス
 A：卵抽出液の作製方法。ゼリーを除去した未受精卵を遠心チューブに詰め (左)、15000 Xg で 10 分間の遠心分離により破碎すると卵抽出液が得られる (右)。B：卵抽出液における自発的アポトーシス。アフリカツメガエル脱膜精子核を間期卵抽出液に加えると、約 1 時間で正常な核を形成し DNA 複製を行うが (左)、4 時間以上経過するとアポトーシスに特徴的な核の断片化が生じる (右)。

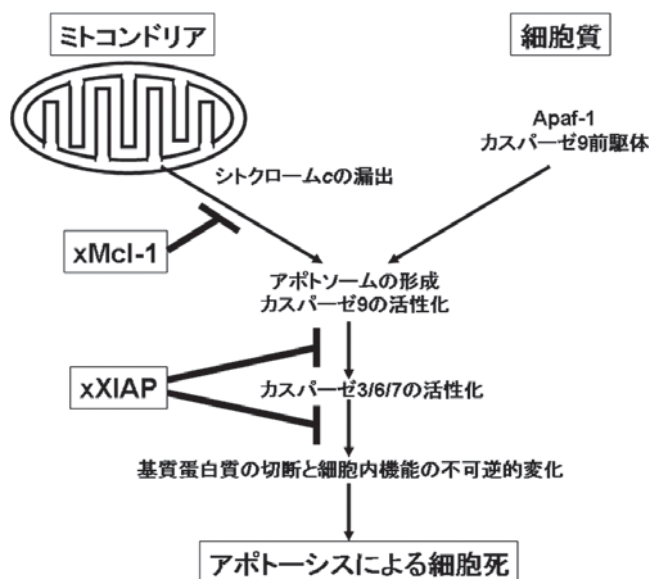


図2 xMcl-1とxXIAPによるアポトーシス制御のモデル
 アフリカツメガエル卵抽出液においては、xMcl-1がシトクロームcの漏出を防ぎ、xXIAPがカスパーゼ経路の活性化を防いでいる。xMcl-1は常時分解されているため、蛋白質合成が低下すると枯渇して、シトクロームcの漏出が始まる。初期の段階では、xXIAPが活性化したカスパーゼを自分もろとも分解へ導くが、やがてxXIAPも枯渇するとカスパーゼ経路を止められなくなり、アポトーシスが実行される。

系でありながら、細胞内のさまざまな現象を試験管内で再現できる優れた特徴を持つ。この卵抽出液を室温で4時間以上放置しておくと、自発的にミトコンドリアからシトクロームcが漏出して内因性アポトーシスを実行する(図1B)。この現象には新規の遺伝子発現や蛋白質合成、外界からの薬物やストレスは必要ないことから、卵抽出液中に蓄積した母性因子によって引き起こされると推測されるが、詳細は不明であった。

卵抽出液におけるBcl-2ファミリー蛋白質の機能：
 Bcl-2ファミリー蛋白質はミトコンドリア外膜に小孔を形成して、膜間腔に存在するシトクロームcを細胞質に漏出させる。この反応を促進する蛋白質と抑制する蛋白質がそれぞれ複数種存在し、両群の機能的バランスによりアポトーシス開始が制御されると考えられており、本実験系への関与が予想された。そこでわれわれはアフリカツメガエルのBcl-2ファミリー蛋白質を13種類同定して、組換え蛋白質の過剰発現による機能解析をシステムティックに行った。このうち特に重要と思われる蛋白質に対しては特異的抗体を作製して、内在性蛋白質の免疫除去を行ったところ、xBidが生理的なアポトーシス促進因子として、一方xMcl-1が生理的なアポトーシス抑制因子としてそれぞ

れ機能することが明らかになった。ただしxBidとxMcl-1を同時に免疫除去するとアポトーシス開始は正常のタイミングに戻ったことから、他のBcl-2ファミリー蛋白質を含めた未知因子の関与が推測され、更なる解析が必要である。またxMcl-1は卵抽出液においてプロテアソームにより常時分解される短寿命蛋白質であり、N末端の31-79残基が分解に必要であることを見いだした。

卵抽出液におけるアポトーシス抑制蛋白質の分解：細胞質に漏出したシトクロームcはアポトソームと呼ばれる複合体を形成して、カスパーゼと総称される一群の細胞内蛋白質分解酵素を活性化する。活性化したカスパーゼはさまざまな基質蛋白質を切断して、細胞を不可逆的な死に至らしめる。過去にわれわれは、卵抽出液においてカスパーゼ経路を阻害する生理的なアポトーシス抑制因子xXIAPを同定した。すなわちxMcl-1は内因性アポトーシス経路の上流を、xXIAPは下流を抑制しており、同時免疫除去の結果から、両者は相加的に機能していることが分かった。xXIAPは健康な卵抽出液中では安定だが、アポトーシス開始時に急速に消失した。これはxXIAPが活性化したカスパーゼと結合して、自分もろとも分解へ導くためと考えられている。したがって蛋白質合成が阻害されると、分解された蛋白質の補充ができず、まずxMcl-1が、ついでxXIAPが相次いで消失する。すなわち卵の劣化による蛋白質合成能の低下が、2種類のアポトーシス抑制蛋白質の枯渇を引き起こし、自発的アポトーシスを発動させると推測される(図2)。

成熟卵のパラドックス：前述の通り成熟卵は自発的アポトーシス機構を備えていることが明らかになったが、その生理的意義は何であろうか？アポトーシスを起こさなければ、寿命が延びて受精のチャンスも増加するはずなのに、なぜ成熟卵はあえて危険な「時限爆弾」を抱えて生まれるのだろうか？この「成熟卵のパラドックス」に対する答えは不明だが、著者は以下の仮説を立てている。成熟卵は個体発生の礎となる極めて重要な細胞でありながら、卵管あるいは体外といった過酷な環境に無防備な状態で排卵される。したがって劣化やダメージの蓄積により蛋白質合成能が低下した成熟卵はアポトーシスを起こして積極的に排除され、蛋白質合成能の高い健康な成熟卵のみがアポトーシスを免れて受精を許されるのではないだろうか？すなわち成熟卵の持つ自発的アポトーシス機構は、優れた個体を発生させるために必要な選別機構なのかもしれない。

本講演の要旨は、*J Biol Chem* **286** : 15806-15814, 2011に掲載された内容である。

土屋勇一先生 略歴



- 1968年5月 生
 - 1991年3月 東京大学理学部生物化学科卒業
 - 1993年3月 東京大学理学系大学院修士課程修了
 - 1996年3月 東京大学理学系大学院博士課程修了
 - 4月 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 流動研究員
 - 1998年4月 東邦大学医学部助手 (生化学講座)
 - 2007年4月 東邦大学医学部助教 (生化学講座) (名称変更)
 - 現在に至る
-