

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18396

研究課題名(和文)グリコゲン欠損マウスを用いたグリコーゲン代謝系による神経幹細胞制御機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of function of glycogen metabolism in the neural stem cell

研究代表者

後藤 仁志(Gotoh, Hitoshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20462202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：グリコーゲンはグルコースより形成され、その代謝はエネルギー供給などの役割を担っていることが知られている。本研究ではグリコーゲン合成の核となるGlycogenin(Gyg)遺伝子に着目し、その機能解析によってグリコーゲン代謝の脳の発生における意義を解析した。まず、発生期の脳皮質でGyg遺伝子の発現を調べたところ、神経幹細胞に強く発現していた。shRNA法によりその発現を阻害すると神経幹細胞の分化・移動が亢進することを見出した。また、Gyg KOマウスを作製し、脳皮質の発生を解析したところ、同様の異常が認められた。

このことから、グリコーゲン代謝経路は脳皮質の発生に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Glycogen is formed from glucose and its metabolism is known to play a role in energy supply. In this study, we focused on Glycogenin (Gyg), which is the core enzyme of glycogen synthesis, and analyzed its role in the brain development. When we examined the expression of the Gyg gene in the cerebral cortex, it was strongly expressed in the neural stem cells. We introduced knockdown construct by in utero electroporation, and found that differentiation and migration of neurons were disturbed. We further established Gyg KO mice using Crispr/Cas9 method. However, Gyg KO mice showed early postnatal lethality and showed similar abnormality in cortical layer formation.

From these observation, it was suggested that the glycogen metabolic pathway is important for the development of the cerebral cortex.

研究分野：神経発生学

キーワード：神経発生 脳皮質 発生 エネルギー代謝 グリコーゲン

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞内エネルギー代謝は細胞の生命維持としてのみでなく、より積極的に細胞増殖・分化といった現象に関与することが知られている。特に幹細胞は分化細胞とは異なる細胞内エネルギー代謝を行い、その増殖・分化を制御していると考えられ、幹細胞としての性質維持のための機構として注目されている。

グリコーゲンはグルコースより形成される多糖類であり、その主な役割は組織におけるエネルギーの貯蔵であると考えられていた。近年では、ガン細胞の増殖や脳のグリア細胞によるエネルギーの供給源などさまざまな新たな機能が明らかとなってきた。

グリコーゲンの豊富に存在する肝臓や筋肉でのグリコーゲン代謝経路の働きについては、歴史的に詳細に調べられている。一方で、エネルギーを必要とすると考えられる発生期にグリコーゲンを介した細胞内代謝が果たす役割については不明であった。

2. 研究の目的

予備的検討において、グリコーゲンの発生期における分布を免疫組織化学染色などにより調べたところ、神経幹細胞に多く存在していることを明らかとしていた。このことから、グリコーゲン代謝系は神経幹細胞としての機能に何らかの働きをしている可能性が示唆されている。

しかし、グリコーゲン代謝経路の神経発生における役割は不明であった。そこで、本研究では、グリコーゲン関連酵素の、局在などを発生期をおって詳細に解析し、その機能を阻害することで大脳皮質の構築にどのような異常が認められるかを解析した。

3. 研究の方法

1) グリコーゲン代謝酵素の発現は免疫染色法および in situ hybridization 法を用いて解析した。

2) グリコーゲン代謝酵素の阻害には、shRNA の発現ベクターを構築し、このベクターを発生期の脳皮質に電気穿孔法を用いて導入することによって行った。

3) また、Crispr/Cas9 法を用いてグリコーゲン合成の核となる Glycogenin 遺伝子座をターゲットとした遺伝子コンストラクトを作製し、これを受精卵に導入することでノックアウトマウスのラインを樹立した。また、得られたヘテロ個体同士を交配することによって、ホモ胎児を得て、その神経発生における表現型

を解析した。

4. 研究成果

1) グリコーゲン代謝酵素の発生期の脳における発現

In situ hybridization 法によってグリコーゲン代謝に関連する遺伝子の mRNA の局在を解析した。その結果、胎生 12.5 日齢より後の大脳皮質の脳室層に強く発現が認められることを見出した(図. 1)。これらのタンパク質に対する特異的抗体を用いて免疫染色を試みたが、Gys1 に関しては特異的な染色像が認められなかったが、PygB はグリコーゲンのドット上の染色像が組織切片上に観察された。このドット状の染色は神経幹細胞のマーカーである Nestin のファイバー上に沿って分布していたことから、これらの因子は神経幹細胞に特異性よく局在していることが明らかとなった。

また、GFP 蛍光遺伝子を電気穿孔法によって胎児脳に導入し、GFP と細胞分化マーカーおよびグリコーゲンに対する抗体を用いた多重染色を行った。その結果、グリコーゲンは Pax6 陽性の神経幹細胞に多く認められ、Tbr2 陽性の中間増殖細胞(増殖能を有するが、神経細胞に分化する運命にある細胞)や、分化した神経細胞では消失していることを明らかとした(図 2)。これらのことから、グリコーゲンは Pax6 陽性の神経幹細胞に特異性よく存在していることが明らかとなった。

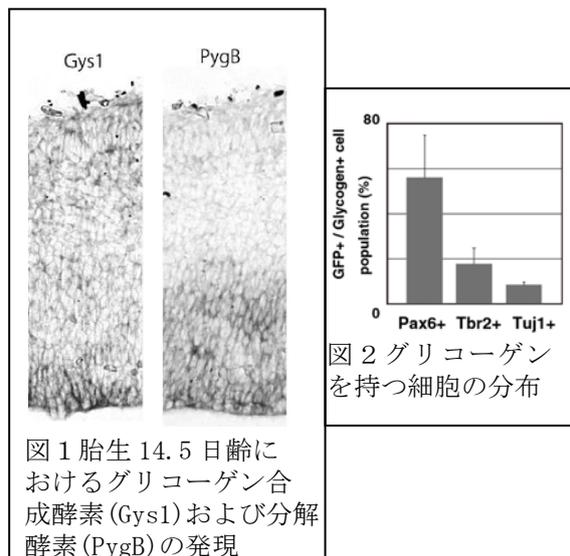


図 1 胎生 14.5 日齢におけるグリコーゲン合成酵素(Gys1)および分解酵素(PygB)の発現

図 2 グリコーゲンを持つ細胞の分布

2) グリコーゲン代謝酵素の阻害による神経発生におけるグリコーゲン代謝の役割の解析

グリコーゲン代謝を制御する分子のうち、グリコーゲン合成の核となる Glycogenin 遺伝子に着目して、その発現を抑制する shRNA 発現コンストラクトを作製した。培養細胞などを用い

てノックダウンの効率を測定した後、このコストラクトを E14.5 日齢の脳皮質に電気穿孔法を用いて導入した。E15.5 日に解析を行うと、遺伝子が導入された細胞では、コントロール実験と比較して細胞周期の S 期のマーカーである EdU の取り込み能が減少していた。このことから、グリコーゲン代謝を阻害すると細胞周期の変化や細胞分化の促進が起こる可能性が示唆された。そこで、同様に shRNA 発現ベクターを導入し、48 時間後の胎仔脳を解析すると、遺伝子導入細胞がコントロールと比較してより表層に移動することが明らかとなった(図 3)。これらの所見より、グリコーゲン代謝経路は神経幹細胞の維持に重要な働きをすることと考えられる。

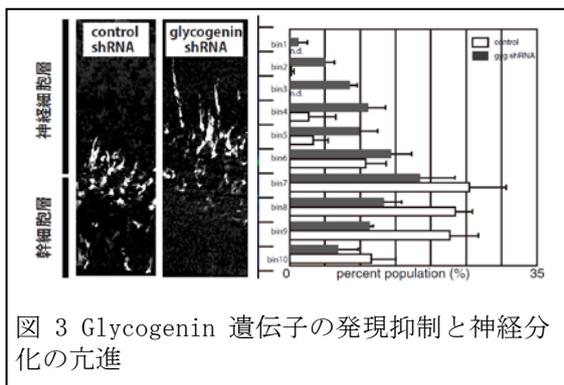


図 3 Glycogenin 遺伝子の発現抑制と神経分化の亢進

3) Glycogenin 遺伝子ノックアウトマウスの樹立とその表現型の解析

Glycogenin 遺伝子の欠損による個体全体への発生への影響をより詳しく解析するために、Crispr/Cas9 法を用いて Glycogenin ノックアウトマウスの作製を行った。sgRNA と Cas9 を発現するプラスミドベクターを Addgene より導入し、ここに Glycogenin に対する sgRNA を発現するオリゴヌクレオチドを挿入した。Neuro2A 細胞にこのコンストラクトを導入して、Surveyor assay を行いゲノムの切断効率を評価した。最も切断効率の良かったベクターを C57/BL6 系統の受精卵にマイクロインジェクションを行った。その結果、複数の F0 産子を得た。PCR およびサンガーシーケンシングによる解析から、Glycogenin 遺伝子のエキソンに 7bp の欠失を持つラインを樹立した(図 4)。

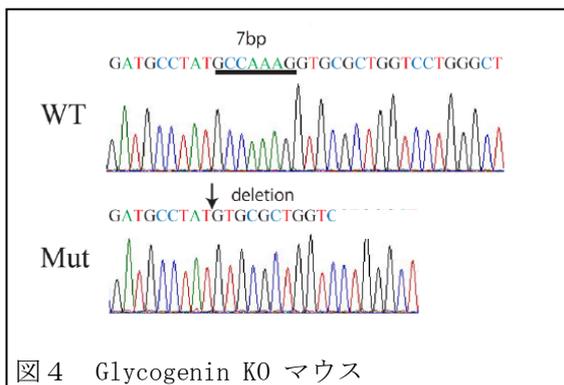


図 4 Glycogenin KO マウス

樹立した Glycogenin ヘテロマウス同士を掛け合わせることで、ホモノックアウトマウスの作出を試みた。ホモノックアウトマウスは出生直後に致死となることが明らかとなった。出生後致死となる原因は今のところ不明であるが、呼吸不全の可能性が高いと考えている。

また、ノックダウン実験で見られたような脳発生における異常が認められるか否かを解析した。EdU を E14.5 日の母獣に投与し、胎仔を 18.5 日にサンプリングを行い解析を行った。その結果、14.5 日齢で標識された細胞の移動が遅くなる現象が観察された(図 5)。

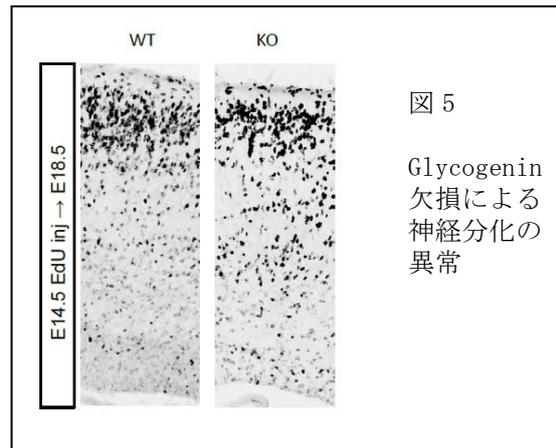


図 5
Glycogenin 欠損による神経分化の異常

このことから、グリコーゲン代謝経路が神経系の発生に関与していることが明らかとなった。ノックダウン実験のフェノタイプとノックアウトマウスを用いたフェノタイプは異なっていたが、これは急性に発現を阻害した場合と発生期にわたり Glycogenin の発現を抑制したときのほかの細胞代謝経路の変化が異なるためであると考えられる。作製したノックアウトマウスは新生仔致死となるが、ほかのグループからの報告で低確率ながらホモ産子が生存するため、サンプル数を増やすことにより、発生期の乱れが新生仔期の脳形成にどのような影響を与えるか解析することが可能であると考えられる。

また、Glycogenin 遺伝子の欠損によりもたらされる遺伝子発現の変化について、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq によって解析した。現在、発現変動を示すいくつかの候補遺伝子を見出しており、今後発現変化やそれらの生理的意義の解析を進めていく予定である。

以上の結果より、本研究を通じて神経系の発生におけるグリコーゲン代謝経路の重要性が初めて明らかとなった。

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 1 件)

1)Hitoshi Gotoh, Tadashi Nomura, Katsuhiko Ono

Glycogen serves as an energy source that maintains astrocyte cell proliferation in the neonatal telencephalon.

J Cereb Blood Flow and Metab、
37(6):2294-2307(2017) 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1)2016 年 神経科学会大会(パシフィコ横浜)

Hitoshi Gotoh, Tadashi Nomura, and Katsuhiko Ono

Glycogen metabolism regulates fatal neural stem cell maintenance in a glycogenindependent manner

2)2017 年 神経科学会大会(幕張メッセ)

Hitoshi Gotoh, Tadashi Nomura, and Katsuhiko Ono

Glycogenin controls cortical neural stem cell proliferation through regulating glycogen metabolism

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://f.kpu-m.ac.jp/biology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 仁志 (Hitoshi Gotoh)

京都府立医科大学・大学院 医学研究科・神経発生生物学・助教

研究者番号: 20462202

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

小野 勝彦 (Katsuhiko Ono)

京都府立医科大学・大学院 医学研究科・神経発生生物学・教授

研究者番号: 30152523

野村 真 (Tadashi Nomura)

京都府立医科大学・大学院 医学研究科・神経発生生物学・准教授

研究者番号: 10323007

(4) 研究協力者

()