

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K07408

研究課題名（和文）グリコーゲン代謝関連シグナル経路による初期胚発生制御機構の解明

研究課題名（英文）Role of glycogen metabolism-related signaling pathways in early embryonic development

研究代表者

日下部 杜央（KUSAKABE, Morioh）

京都大学・生命科学研究科・講師

研究者番号：80378843

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：動物の主要なエネルギー源である多糖高分子グリコーゲンは、両生類の卵に豊富に存在していることが以前から知られている。我々は両生類のモデル生物であるアフリカツメガエルの初期胚発生過程において、複数のグリコーゲン代謝関連酵素が異なる時空間的発現パターンを示すこと、およびそれぞれが異なる発生過程を制御することを見出し、グリコーゲン代謝関連経路の初期胚における機能分担の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト胎児の初期発生は妊娠中の母親の栄養状態に影響を受けることが知られている。本研究において我々は、両生類であるアフリカツメガエルを用いて、栄養状態と初期発生の関連について、特にグリコーゲン代謝関連経路に着目して解析を行った。アフリカツメガエルの発生方式は両生類特有の特徴を有するので、本研究で得られた知見をヒトや動物一般に当てはめることはできないが、栄養状態が初期胚発生を制御するしくみの一端を理解するための手がかりになるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：Amphibian eggs are classically known to contain an abundant amount of glycogen, a macromolecular polysaccharide essential for energy supply in animals. In this study, we found that different glycogen metabolism-related enzymes display different temporal and spatial expression patterns during embryonic development of the amphibian model organism *Xenopus laevis*. Moreover, loss-of-function experiments indicated that these enzymes have different developmental roles. These results suggest a functional diversity of glycogen metabolism-related pathways in early embryos.

研究分野：生物科学

キーワード：アフリカツメガエル 発生 代謝

1. 研究開始当初の背景

ヒト胎児の初期発生は、母親の栄養・代謝状態と関連することが疫学的に知られている。たとえば、水溶性ビタミンの一種である葉酸（別名ビタミン B9）は葉物野菜等に含まれる栄養分であるが、母親の葉酸摂取不足は胎児のメジャーな発生異常の一つである神経管閉鎖障害のリスクを高めることが以前から知られており、妊娠予定の女性に対して適量の葉酸を摂取することが公的に推奨されている。葉酸代謝経路の重要なアウトプットの一つは、DNA、RNA、タンパク質等のメチル化反応に必要なメチル基を供給することである。このメチル基供給に到るまでの代謝反応は別の水溶性ビタミンであるビタミン B12 を必要とするが、母親のビタミン B12 摂取不足も葉酸摂取不足と同様に胎児の神経管閉鎖障害のリスクを高めることが知られている。さらに、肥満・糖尿病などによる母親の糖代謝の異常（高血糖状態）は、胎児の神経管閉鎖障害、心臓発生異常などの発生異常のリスクを高めることも知られている。したがって、栄養・代謝状態と初期発生をリンクさせる分子機構を追究することは、基礎発生生物学の面だけでなく、ヒト母子保健学的にも重要な研究課題といえる。

代表的な栄養物質であるブドウ糖（グルコース）が多数連結した多糖高分子グリコーゲンは、ヒトも含む動物の細胞が貯蔵する主要なエネルギー源としてよく知られており、連結するグルコースの数とその連結方式により多様な分子量と分岐構造を示す。ヒト成体においては特に筋肉、肝臓に豊富に存在し、グルコース枯渇などの低栄養状態やエネルギー要求性ストレスなどに応答してグルコース 1リン酸へと分解され、さらにグルコース 1リン酸はグルコース 6リン酸へと変換される。生じたグルコース 6リン酸は解糖系代謝経路で代謝されてエネルギー（ATP）産生等に使われる、またはグルコースに変換されてから血液を介して他組織に運搬されるなどする。グリコーゲンとヒト母子保健との関連を示唆する知見としては、ヒト胎盤の特に細胞性栄養膜細胞にグリコーゲンが貯蔵されていることが古くから知られている。また、妊娠糖尿病や妊娠高血圧腎症では胎盤でのグリコーゲン貯蔵の異常が観察されている。胎盤におけるグリコーゲン貯蔵がヒト胎児の初期発生にどのように関わるのかは未だわかっていないが、一つの仮説として、高血糖による発生異常を防ぐために余分なグルコースをグリコーゲンとして胎盤に隔離する、という仕組みが提唱されている。

無尾両生類であるアフリカツメガエルは、多産であること、人工受精が可能であること、母体外発生のため非固定の経時的な観察が可能であること、塩類と緩衝剤から構成される単純かつ安価な培地もしくはカルキ抜きした水道水で胚を培養できること、そして胚が丈夫で種々の外科的実験操作に耐えうることから、脊椎動物初期胚発生研究のモデル生物として長年にわたり使用されてきた実績がある。ヒトなどの哺乳類は子宮内発生であり発生過程において母体から胎盤を介して栄養分を受け取ることが可能であるが、アフリカツメガエルは母体外発生のため自らの発生過程に必要な栄養分を卵にあらかじめ貯蔵しておき、摂食可能なオタマジャクシの段階に達するまでは内在性の栄養分のみで発生過程を進める必要がある。一般に両生類の卵は栄養源としてグリコーゲン、卵黄、脂肪滴を豊富に含むこと、そして両生類卵の乾燥重量の 5% はグリコーゲンであること、グリコーゲンの消費が原腸陥入の直前で活発になることが知られている。アフリカツメガエルの卵も同様にグリコーゲンを豊富に含み原腸陥入の直前に活発な消費を開始すると予想される。

我々は以前、多能性をもつことで知られているアフリカツメガエル未分化外胚葉組織（アニマルキャップ）において FGF/Ras シグナル伝達経路により発現が制御される可能性がある候補遺伝子群について、プレリミナリーな網羅的遺伝子発現解析を通して多数同定し、それらの発生過程における機能解析を行ってきた（Araki et al., *Gene Expr. Patterns* 7, 666-671 (2007)., Araki et al., *J. Biol. Chem.* 286, 6760-6768 (2011)., Endo et al., *Sci. Signal.* 4, ra2 (2011)., Takahashi et al., *Int. J. Dev. Biol.* 56, 393-402 (2012)., Takahashi et al., *Nat. Commun.* 6, 6017 (2015).）。上記候補遺伝子群のなかにグリコーゲン代謝関連遺伝子が含まれていたことから、グリコーゲンと初期胚発生の関係に着目して本研究課題を構想するに至った。

2. 研究の目的

アフリカツメガエル初期胚発生におけるグリコーゲン代謝関連酵素および関連シグナル伝達分子の生理機能を明らかにすることが本研究課題の直接の目的である。間接的には、糖代謝異常に起因するヒト出生前発生異常のメカニズムを理解するための基盤情報提供も目指す。

3. 研究の方法

アフリカツメガエルの初期胚および卵母細胞、そして一般的な遺伝子操作のための大腸菌を主

要な実験系として利用する。種々のグリコーゲン代謝関連遺伝子、および種々の組織特異的マーカー遺伝子群の発現解析については、Real time quantitative PCR、Whole mount in situ hybridization 等の手法を用いる。グリコーゲン代謝関連経路の loss-of-function 実験は、モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドのマイクロインジェクションによる関連遺伝子転写産物からの翻訳抑制、もしくは市販の関連酵素インヒビター化合物の培養培地への添加等により行う。グリコーゲン代謝関連タンパク質の検出は、抗体を用いたウェスタンブロッティングもしくは組織染色等により行う。

4. 研究成果

アフリカツメガエルのグリコーゲン代謝関連酵素遺伝子について、FGF/Ras シグナル伝達経路により発現が制御されるアイソフォームと制御されないアイソフォームがあることを見出した。それぞれのアイソフォームについて、受精直後の4細胞期から尾芽胚期に至るまでの初期胚発生における発現量の変化を Real time quantitative PCR によって調べたところ、FGF/Ras シグナル伝達経路により発現制御を受けないアイソフォームは受精直後に高い発現を示し、原腸陥入の進行とともに発現が減少していき、神経胚期から尾芽胚期までは継続して低い発現のままだった。一方 FGF/Ras シグナル伝達経路により発現制御を受けるアイソフォームは、卵割期はほぼ発現が検出されない状態だったが、原腸陥入開始とともに発現量が急激に増加し、その後尾芽胚初期をピークとして高い発現を継続して示した。これらの結果により、発生時期によってグリコーゲン代謝関連酵素のアイソフォームが使い分けされている可能性が示唆された。

次に、グリコーゲン代謝関連酵素のアイソフォームについて、胞胚期から尾芽胚期に至るまでの初期胚発生における空間的な発現パターンの変化を Whole mount in situ hybridization によって調べた。FGF/Ras シグナル伝達経路により発現制御を受けないアイソフォームは、胞胚期においては動物極側に強い発現が見られたが植物極側にはほとんど発現が見られなかった。後期原腸胚期においては予定外胚葉領域、中期神経胚期においては予定体節中胚葉に弱い発現が見られたがそれ以外の領域ではほとんど発現が検出されなかった。初期尾芽胚期では体節に強い発現が、腹側前方血島に弱い発現が観察され、それ以外の領域ではほとんど発現が検出されなかった。中期尾芽胚期では体節に発現していたが、後期尾芽胚期では体節における発現はほとんど消失してしまい脳や心臓に発現するようになった。一方、FGF/Ras シグナル伝達経路により発現制御を受けるアイソフォームは塩基配列データベース上では L 型と S 型のホメオログが存在しており、それぞれについて発現パターンを調べた。FGF/Ras シグナル伝達経路により発現制御を受けるアイソフォーム L 型は、胞胚期においては動物極側領域に弱い発現が見られたが、後期原腸胚期においては動物極側領域含めて全体的にほとんど発現が見られなくなり、中期神経胚期においては予定体節中胚葉に弱い発現が見られた。そして初期尾芽胚期では体節での発現、中期尾芽胚期では体節と脊髄での発現、後期尾芽胚期では脳や脊髄での発現が観察された。FGF/Ras シグナル伝達経路により発現制御を受けるアイソフォーム S 型は、胞胚期においては発現が見られなかったが、後期原腸胚期と中期神経胚期においては予定体節中胚葉に強い発現が見られた。そして初期尾芽胚期、中期尾芽胚期、後期尾芽胚期でも体節における強い発現が継続して観察された。これらの結果により、グリコーゲン代謝関連酵素のアイソフォームがそれぞれ時空間的に異なる発現制御を受けている可能性が示唆された。

続いて、モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてグリコーゲン代謝関連酵素のアイソフォームのノックダウン実験を行った。FGF/Ras シグナル伝達経路により発現制御を受けないアイソフォームをノックダウンすると、胞胚期までは目立った異常は見られなかったが、初期原腸期ではコントロール胚では原腸陥入が始まっているのにノックダウン胚では原腸陥入が始まらなかった。さらに、コントロール胚が原腸陥入を完了する時期になっても、ノックダウン胚は原腸陥入を全く起こさないまま、白濁して死亡した。これらの表現型の分子的基盤を探るために、ノックダウン胚における各組織特異的マーカー遺伝子の発現量の変化を Real time quantitative PCR によって調べ、いくつかのマーカー遺伝子についてコントロール胚と比べ発現の上昇あるいは減少が観察された。このような遺伝子発現の変化が表現型の背景にある可能性がある。一方 FGF/Ras シグナル伝達経路により発現制御を受けるアイソフォームの L 型と S 型を同時にノックダウンすると、尾芽胚期において体軸の屈曲が観察された。これらの結果により、グリコーゲン代謝関連酵素のアイソフォームが受精後の初期発生において使い分けされており異なる発生時期と場所において異なる機能を有することが示唆された。さらに、受精前のアフリカツメガエル卵母細胞が stage III から stage VI へと成熟するにつれてグリコーゲン含量が大きく増加するという生化学的データが他のグループから報告されたため、in vitro で培養した卵母細胞を用いて受精前の卵におけるグリコーゲン代謝関連経路の機能について卵成熟や細胞死などに着目して検討を進めた。

冒頭の「1. 研究開始当初の背景」に述べた通り、ヒト発生異常の疫学的知見から、糖代謝とヒト初期胚発生の関連が予想されている。ヒト卵は直径が約 0.1 mm でありアフリカツメガエル卵（直径約 1-1.3 mm）に比べて極端に小さく、卵黄やグリコーゲンのような栄養分を大量に貯蔵する物理的な余裕はない。それゆえヒト初期胚は子宮に着床して母体から栄養などを受け取りながら発生するが、アフリカツメガエル初期胚はそのようなことはせず自らが貯蔵してい

た栄養分を用いて発生する。また、両者とも脊椎動物に共通する初期胚発生イベント（卵割、原腸陥入、神経管閉鎖など）を経験するが、その様式は大きく異なる。したがって、本研究課題で得られたアフリカツメガエルでの知見をヒトなど他の動物に安易に当てはめることは許されないが、同じ脊椎動物として部分的な共通性がある可能性はある。グリコーゲンと糖代謝と深く関連することから、グリコーゲンと初期発生をリンクさせる分子機構をさらに追究することによって、高血糖状態がヒト初期胚発生異常のリスクを高める仕組みの一端が見えてくることが期待できるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------