

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770207

研究課題名(和文) 栄養・代謝状態による神経管閉鎖制御の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms linking nutritional and metabolic status to neural tube closure

研究代表者

日下部 杜央 (KUSAKABE, MORIOH)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：80378843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：神経管閉鎖の異常は栄養・代謝状態と関連することが疫学的に知られているが、その分子機構は不明である。私は、栄養・代謝状態を感知するメタボリックセンサーAMPKがアフリカツメガエル初期胚において神経管前部の閉鎖過程に重要であることを示した。さらにAMPKのノックダウン胚において、細胞骨格関連タンパク質のリン酸化が減少することを見出し、AMPKが細胞骨格を制御することにより神経管閉鎖を制御する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Although epidemiological studies have suggested that defects in neural tube closure are associated with metabolic status, the underlying molecular mechanism(s) remains elusive. We found that the metabolic sensor AMPK is essential for anterior neural tube closure in *Xenopus*. Our biochemical experiments revealed that a cytoskeleton-regulating protein is an AMPK substrate in vivo. These results suggest the possibility that AMPK links the metabolic sensing pathway to the cytoskeleton-regulating machinery in neural tube closure.

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：発生・分化 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の神経系は、最初は平板なシート状の組織（神経板）として背側外胚葉から形成される。その後、神経板上に左右相称に盛り上がった肥厚が、正中線に向かって移動して融合し、管構造（神経管）へと変化する。この管形成過程は「神経管閉鎖」と呼ばれている。神経管閉鎖の異常（神経管閉鎖障害）は、地域・人種により異なるが、ヒトではおよそ0.1-1%の確率で起こることが知られており、先天性心疾患に次いで2番目に多い出生前発生異常として知られている。神経管閉鎖障害を発症した胎児は、出生前あるいは出生後すぐに死亡するか、出生後に生存可能であった場合でも様々な障害を負う。そのため、神経管閉鎖障害の予防は、母子保健上もっとも重要な課題の一つである。

神経管閉鎖障害の発症は、遺伝的要因だけでなく、環境的要因にも左右される。例えば、20年以上前から、妊娠中の葉酸（野菜、果物、豆類等に多く含まれるビタミンの一種）の摂取により、神経管閉鎖障害のリスクが低下することが知られている（Blom et al., *Nature Rev. Neurosci.* 7, 724-731 (2006).）。しかしながら、葉酸の摂取が神経管閉鎖障害を防ぐメカニズムは明らかにされていない。また、母親が肥満や糖尿病の場合、胎児の神経管閉鎖障害のリスクが高まることも知られている（King, *Annu. Rev. Nutr.* 26, 271-291 (2006).）。肥満および糖尿病はともにグルコース代謝の異常と深い関連があることから、栄養・代謝状態によって神経管閉鎖が制御されることが予想されるが、その分子機構は不明である。

私は以前、ATP 欠乏・低グルコースにより活性化されるメタボリックセンサーであり、肥満や糖尿病の改善に関与するプロテインキナーゼ AMPK が、細胞骨格を制御する足場タンパク質の特定のセリン残基を *in vitro* でリン酸化することを示し、AMPK によるリン酸化が、栄養状態による細胞骨格制御を仲介する、という可能性を提示した。AMPK は、ほとんどの真核生物において保存されているプロテインキナーゼであり、代謝経路の制御などの様々な機能を持つことが知られているが、その初期発生における機能は不明な点が多い。そこで私は AMPK による細胞骨格制御の初期発生における機能の解析を行なったところ、AMPK がアフリカツメガエル初期胚の神経管閉鎖を制御することを示唆する予備的結果を得た。

2. 研究の目的

本研究では、アフリカツメガエル胚を利用した発生生物学的および生化学的アプローチにより、特にメタボリックセンサーAMPKに着目して、神経管閉鎖を制御する各種栄養源や

代謝産物、およびそのシグナル伝達機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

アフリカツメガエル胚は、胚が大きく丈夫なため組織の切り出しや移植等の外科的操作が比較的容易であること、DNA、mRNA、モルフオリノオリゴのインジェクションにより特定の遺伝子の過剰発現やノックダウンが可能であることから、脊椎動物の初期胚発生研究のモデル系として汎用されてきた。さらにアフリカツメガエル胚は母体外で発生し、神経管閉鎖の諸過程をリアルタイムで観察しやすいので、各種栄養分・代謝産物・シグナル伝達経路の神経管閉鎖への影響を評価する系として優れている。またアフリカツメガエルは多産で胚が大きいため、生化学的分析において十分量の検体を得ることが比較的容易である。これらの点が、哺乳類胚を用いた研究と比べて、神経管閉鎖制御の分子機構を同定する上で大きな利点になると考えられたため、私はアフリカツメガエル胚をモデルとして、神経管閉鎖を制御するシグナル伝達機構を解明することを試みた。具体的には、低栄養により活性化されるメタボリックセンサーである AMPK、およびマイクロアレイにより神経発生関連因子候補として同定した各種代謝酵素、シグナル伝達分子等に着目して、それらの神経管閉鎖における機能の解析を行なった。

4. 研究成果

私は、栄養・代謝状態を感知するメタボリックセンサーAMPK がアフリカツメガエル初期胚において神経管閉鎖を制御する可能性を示唆する予備的結果を得たので、AMPK ノックダウン胚の形態変化について詳細に解析したところ、AMPK は神経管の前部の閉鎖過程に重要であるが、後部の閉鎖過程にはほとんど関与しないことがわかった。さらにリン酸化 AMPK 抗体によるウェスタンブロッティングを行ない、胚発生の進行にともなってリン酸化 AMPK の量が増加することを見出した。さらに AMPK のノックダウン胚において、細胞骨格関連タンパク質のリン酸化が減少することを見出し、AMPK が細胞骨格を制御することにより神経管閉鎖を制御する可能性を示した。AMPK は alpha、beta、gamma の3つのサブユニットから構成され、哺乳類においては2種類の alpha サブユニット、2種類の beta サブユニット、3種類の gamma サブユニットが存在することが知られている。データベースを調査したところ、アフリカツメガエルにおいても、哺乳類と同様に、2種類の alpha、2種類の beta、3種類の gamma が存在することがわかった。そこでモルフオリノ

オリゴによるノックダウン実験を行なったところ、神経管閉鎖に関与するサブユニットと関与しないサブユニットがあることがわかった。したがって AMPK のサブユニット特異的な機能が神経管閉鎖に必要であることが示唆された。また、胚を解糖阻害剤下で培養したところ、神経管閉鎖に異常は見られなかった。

さらに我々は、神経管閉鎖を制御する新規シグナル分子の解析を試みた。アフリカツメガエル初期胚の外胚葉片は「アニマルキャップ」と呼ばれ、そのまま培養すると表皮に分化するが、成長因子 FGF の添加や、FGF の下流のシグナル伝達経路である RAS/MAPK 経路の活性化により、神経や中胚葉に分化することが知られている。我々は以前の研究により、アニマルキャップにおいて、FGF 添加もしくは活性化型 RAS の過剰発現によって発現が変動する遺伝子群をマイクロアレイにより同定していた。そのなかでも FGF 添加によっても、活性化型 RAS の過剰発現によっても発現が誘導される代謝酵素に着目して解析を進めた。この FGF/RAS 誘導代謝酵素、および同じファミリーに属する別の代謝酵素について、ノックダウン実験を行なった。4 細胞期の背側の 2 割球にモルフォリノオリゴをインジェクションしたところ、FGF/RAS 誘導代謝酵素のノックダウンでは神経胚期において神経管の閉鎖が阻害され、尾芽胚では頭部の縮小と体軸の屈曲が観察された。一方、同じファミリーに属する別の代謝酵素のノックダウンでは、胚全体が白くなり、神経胚期に入る前に発生が停止した。したがって、FGF/RAS 誘導代謝酵素が神経管閉鎖に必須であることが示唆された。

さらに、活性化型 RAS の過剰発現によって発現が抑制される核内分子に着目した。この RAS 抑制核内分子の初期胚における発現パターンを whole mount in situ ハイブリダイゼーションにより調べた。卵割期にはほとんど発現が見られなかったが、原腸胚前期になると、動物極側の予定外胚葉全体に発現していた。原腸胚後期になると、腹側外胚葉に発現が限局し、神経胚期・尾芽胚では、表皮領域に発現していた。さらにこの核内分子は、RAS シグナル経路だけでなく、Notch シグナル経路によっても発現が抑制された。次にモルフォリノオリゴを用いたノックダウン実験を行なった。モルフォリノオリゴを 4 細胞期胚の背側の 2 割球にインジェクションしたところ、神経管が閉じず、頭が小さい胚となった。この核内分子は神経管そのものには発現していないこと、神経管の周囲組織の伸展が神経管閉鎖と関連することが知られていることから、この核内分子は神経管の周囲の組織の形態を制御することで神経管閉鎖を制御する可能性が示唆された。

また、我々は以前、AGC family に属し、AKT に近縁なプロテインキナーゼ SGK が初期胚外胚葉の細胞死を防ぐことを示した。そし

て最近、SGK ノックダウン胚において、機能未知のユビキチンリガーゼの発現が増加することを見出した。このユビキチンリガーゼの発現パターンを in situ hybridization で調べると、胞胚期、原腸胚期では、動物極側の予定外胚葉全体に様に発現していた。神経胚期・尾芽胚初期では、神経と表皮の両方に発現していた。尾芽胚後期では、脳、耳、腎臓などに発現していた。さらにこのユビキチンリガーゼのノックダウンは、神経管閉鎖の遅れ、頭部構造の形成不全、体軸伸長の阻害を引き起こすことが明らかになった。このユビキチンリガーゼが細胞骨格を制御することを示唆する結果も得られた。

また、SGK とは別の AGC ファミリープロテインキナーゼのノックダウンにより、神経管閉鎖の遅れ、腸の形態形成阻害が観察された。アフリカツメガエル胚の神経管閉鎖および腸管形成には収束伸長運動 (convergent extension) が関わることが知られているので、このプロテインキナーゼは収束伸長運動の制御を介して機能すると考えられた。

さらに別の機能未知プロテインキナーゼについて過剰発現実験を行なうと、神経管の閉鎖が阻害され、体軸が屈曲した胚が生じた。このプロテインキナーゼの初期胚における発現パターンを whole mount in situ ハイブリダイゼーションにより調べたところ、神経管、表皮、耳、腎臓、排出口などに発現していることがわかった。

アフリカツメガエル初期胚外胚葉片 (アニマルキャップ) は、分泌因子 BMP のシグナルを阻害すると、神経に分化することが知られている。我々はアニマルキャップにおいて、BMP のシグナルの阻害によって発現が変動する遺伝子群を同定した。同定した遺伝子群のうち機能解析が進んでいない遺伝子を選んでモルフォリノオリゴによるノックダウン実験を行なったところ、BMP のシグナルの阻害によって発現が上昇する転写制御因子のノックダウンにより、神経管閉鎖の遅延が観察された。

現在、神経管閉鎖に関与するこれらの代謝酵素やシグナル分子と AMPK の相互作用について検討中である。

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)

[学会発表] (計 3 件)

- 1) Chie Shintani, Toshiyasu Suzuki, Tetsuro Araki, Isabel de Ridder, Morioh Kusakabe, and Eisuke Nishida
Analysis of the function of genes that are involved in *Xenopus* early development
The 12th International Student Seminar
Kyoto University, Kyoto, Japan

Feb. 17-20, 2014

ポスター発表(発表日: 2014年2月17日)

2) 新谷千栄、鈴木俊康、荒木徹朗、de Ridder
Lsabel、日下部杜央、西田栄介

アフリカツメガエルの初期胚において神経
発生に関わる新規因子の探索

第36回日本分子生物学学会

神戸ポートアイランド・神戸・日本

2013年12月3-6日

ポスター発表(発表日: 2013年12月4日)

3) Chika Takahashi, Toshiyasu Suzuki,
Eisuke Nishida and Morioh Kusakabe

Identification and characterization of
Xenopus kctd15, an FGF-repressed
ectodermal gene

JSDB-BSDB&BSCB Joint meeting of
Developmental Biology

The University of Warwick, Coventry, UK,
April 15-18, 2012.

ポスター発表(発表日: 2012年4月15日)

[その他]

ホームページ等

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/signa1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日下部 杜央 (KUSAKABE MORIOH)

京都大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号: 80378843