

平成 31 年 4 月 13 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07084

研究課題名(和文) 組織特異的な代謝活性化による形態形成制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of tissue-specific morphogenetic mechanism regulated by glycolytic activity

研究代表者

酒井 大輔 (Sakai, Daisuke)

同志社大学・研究開発推進機構・助教

研究者番号：90632646

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)：子宮内の低酸素環境と哺乳類胚の発生との関係を解析するために、低酸素環境下で活性化する解糖系に着目した。子宮外マウス全胚培養を用いて解糖系阻害剤を作用させたところ、神経管閉鎖不全を引き起こすことが明らかとなった。神経板を構成する神経上皮細胞が頂端面収縮をすることで湾曲し、神経管が形成される。免疫染色による解析の結果、解糖系阻害剤で処理したマウス胚の神経上皮細胞では、頂端面収縮の制御に重要なMLC2のリン酸化が起きていないことがわかった。またいくつかの解糖系遺伝子が神経板に特異的に発現していることを見出した。これらの結果から、代謝による新たな形態形成制御機構の存在が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚の形態形成というイベントは遺伝的プログラムによって進行すると考えられてきた。本研究では、胚を取り巻く環境が遺伝的プログラムを修飾し、形態形成を制御する可能性を検討した。本研究の成果により、子宮内の低酸素環境が細胞内の代謝系の活性化を介して、神経管閉鎖という胚発生過程で最もダイナミックな形態形成過程の一つを制御することが明らかとなった。これにより、新規の環境因子依存的な発生メカニズムの存在が明らかとなった。神経管閉鎖不全は無脳症や二分脊椎症などの先天性障害の原因であり、妊娠期の葉酸欠乏が原因であるとされている。本研究成果により、解糖系代謝異常もこれらの原因となり得ることが示された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the correlation between hypoxia and embryonic development, we focused on the anaerobic glycolysis, the cellular metabolism under hypoxia. Whole-embryo culture of mid-gestation embryos with glycolytic inhibitors caused neural tube closure defects at cranial levels without cell death. Therefore, anaerobic glycolytic activity seems to be essential for neural plate bending associated with cell shape changes. Consistent with this, we observed suppression of apical constriction and reduction of phosphorylated myosin light chain 2, activator of actin contraction in neuroepithelial cells of inhibitor-treated embryos. Our gene expression analyses demonstrated that some hypoxia-responsive glycolytic enzyme genes were specifically expressed in neural plate of mid-gestation embryos. Taken together, intrauterine hypoxic condition regulates neural plate bending via tissue-specific activation of glycolysis.

研究分野：発生生物学

キーワード：解糖系 神経管閉鎖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類は子宮内で胚および胎児を発生・発達させる胎生という繁殖形態をとる。そのため、胚は一過的に低酸素環境下で胚発生を進行することが知られている。細胞は低酸素状態では代謝を酸化的リン酸化から解糖系へと切り替え、生存のための防御を行う。近年、解糖系が細胞の生命活動の維持のみならず、多能性の維持や細胞移動など様々な機能に関与することが明らかとなっている。そこで申請者は、胚の形態形成過程における解糖系の機能を調べるために、解糖系の阻害剤である 2-DG および Oxamate 存在下でマウス胚を子宮外で培養した。その結果、解糖系の阻害により神経管の形成が特異的に障害されることを見いだした。この知見から、代謝活性による形態形成制御という新しい発生メカニズムの存在が示唆された。

2. 研究の目的

本研究課題では、解糖系が神経管形成のどのステップをどのように制御するのか分子レベルで解明する。また、組織内での解糖系の活性化を代謝産物の検出により試みる。特に、ATP の細胞内局在に着目する。また、組織特異的に解糖系を活性化するメカニズムの解明も試みる。

3. 研究の方法

子宮外マウス全胚培養法を利用し、神経管閉鎖直前の胎生 8 日目から 2 時間ずつ異なる発生ステージのマウス胚を解糖系阻害剤である 2-DG と Oxamate 存在下で培養する。そして、解糖系の活性化が必須な発生時期を同定する。さらにエレクトロポレーション法と子宮外マウス全胚培養法を組み合わせた遺伝子導入法を確立し、解糖系遺伝子の 1 つ *Ldha* に対する shRNA を用いたノックダウン実験を行う。次に、神経上皮細胞の増殖や細胞死、細胞の伸長、頂端面収縮といった、神経管形成の各ステップについて各マーカーを用いた免疫染色により解析する。これらの研究から、神経管形成のどのステップに解糖系の活性化が関与するのか解明する。

質量分析イメージングや解糖系の代謝産物である ATP や乳酸の蛍光レポーターを用いて胚組織内における解糖系の活性の可視化を試みる。

神経板特異的に解糖系が活性化されるメカニズムとして、低酸素センサー分子が神経板特異的に発現していることが示唆される。そこで、低酸素応答因子である *Hif1* やその活性調節因子である *Phd1-3* の発現パターンを whole-mount in situ hybridization 法で解析する。

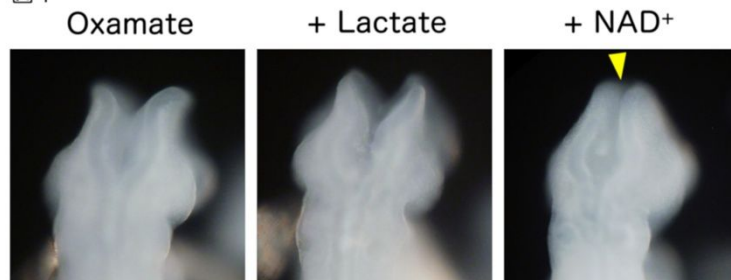
4. 研究成果

解糖系阻害剤である 2-DG および Oxamate を胎生 8 日目のマウス胚に子宮外全胚培養法を用いて投与したところ、体節数 4 から 6 の胎生 8 日目胚を 0.1mM 2-DG もしくは 28mM Oxamate 存在下で培養することで神経管閉鎖不全を特異的に誘導できることがわかった。神経管形成は大きく分けて、神経板を構成する神経上皮細胞の湾曲と、その後の神経板末端の融合からなる。解糖系阻害胚では神経板湾曲の初期段階が阻害されていることがわかった。またその際、体幹部の発生や血管形成にはほとんど影響が認められなかった。さらに、阻害剤と共に NAD^+ を添加することで神経管形成をレスキューすることに成功した (図 1)。この結果から、解糖系の活性化による ATP の産生が神経管閉鎖に必須であることが明らかとなった。

神経管形成をはじめとした形態形成は遺伝的プログラムによって制御されていると考えられていたが、環境因子が代謝の活性化を介して遺伝的プログラムを修飾し、形態形成を制御するという新規の発生メカニズムの存在が明るみとなった。

次に、ノックダウン実験を行うために、神経板特異的な遺伝子導入法の開発を行った。極小電極を自作することで、胎生 8 日目胚の神経板の片側のみに遺伝子を導入し、導入後 7 2 時間培養することに成功した。ベクター型の shRNA を用いた *Ldha* のノックダウンを試みたが、結果が安定しなかった。使用した U6 プロモーターが機能していないことが考えられたので、siRNA を用いて同様な実験を行った。その結果、遺伝子導入側でのみ神経板の湾曲が抑制され、神経管閉鎖における神経板特異的な解糖系活性化の必要性を証明することができた。しかし、エレクトロポレーションによる細胞のダメージが二次的に神経管閉鎖を阻害している可能性は否定できない。そこで、*Ldha* の flox マウスと神経上皮特異的な cre ドライバーである *Sox1-cre* マウスを交配し、神経上皮特異的な *Ldha* ノックアウトマウスを作製した。胎生 8 日目から 1 4 日目の胚を回収し、肉眼観察により神経管閉鎖への影響を調べたが、神経上皮特異的な *Ldha* ノックアウトマウス胚の神経管は正常に形成されていた。このことから、*Sox1-cre* による *Ldha* 遺伝子の欠失のタイミングが胎生 8 日目より遅いことが示唆された。そこで、定量 PCR による発現解析を行った結果、胎生 8 日目における *Ldha* の発現はわずか 20% ほどの減少であることがわかった。比較的高い発現量を示す *Ldha* の場合、ノックアウトマウスにおける残存活性が高く、神経管形成に影響が見られなかった可能性が考えられた。また、

図 1



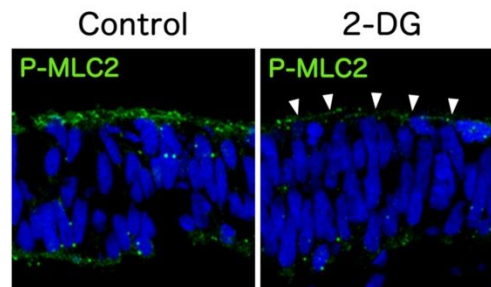
cre による *Ldha* 遺伝子の欠失そのものが不完全であることも考えられた。

解糖系阻害により誘発される神経管閉鎖不全の原因を組織学的手法により解析した。解糖系阻害胚を固定後、凍結切片を作成して免疫染色を行った。細胞増殖、細胞死、細胞骨格、頂端面収縮のマーカーの局在や発現を解析した結果、解糖系阻害により細胞増殖が若干減少するが細胞死は誘導されないこと、頂端面収縮に必須な Myosin Light Chain2 (MLC2) のリン酸化が阻害されていることがわかった(図2)。また、頂端面収縮を司るアクチンリングを頂端面側から観察したところ、解糖系阻害胚ではアクチンリングの収縮がコントロール胚に比べて顕著に低下していた。解糖系関連タンパクの局在を調べたところ、*Ldha*、*Aldoa*、*Pfkfb3* などが頂端面側にドット状に局在していることが明らかとなり、頂端面収縮への関与が示唆された。

解糖系活性化の指標である ATP と乳酸の組織内局在を質量分析イメージングにより検出し、神経板特異的な解糖系活性化の可視化を試みた。

予備実験では、成体マウス組織内におけるモノヌクレオチドの検出に成功していたが、胎生 8 日目の固定胚では十分な解像度が得られなかった。また、未固定胚では切片作製時の損傷が激しく、解析に適さないことがわかった。そこで、胎生 8 日目胚における乳酸と ATP の量を酵素活性を利用した定量法で解析した。しかし、検出限界以下と非常に微量であることがわかった。さらに、ATP の蛍光レポーター遺伝子である *Queen* を胎生 8 日目胚の神経板へとエレクトロポレーションにより導入し、組織内 ATP の検出を試みたが、蛍光を検出することはできなかった。これらの結果から、胎生 8 日目胚における乳酸や ATP は成体内組織と比較して極めて微量であり、既存の方法では検出が困難であることがわかった。今後、新しい検出法の開発が必要である。

図 2



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. Iulianella Angello, Daisuke Sakai, Hiroshi Kurosaka and Paul A Trainor. Ventral neural patterning in the absence of a Shh activity gradient from the floorplate. *Developmental Dynamics* (査読有り) 247(1), pp170-184. 2018.
2. Honami Ogoh, Kazutsune Yamagata, Tomomi Nakao, Lisa L. Sandell, Ayaka Yamamoto, Aiko Yamashita, Naomi Tanga, Mai Suzuki, Takaya Abe, Issay Kitabayashi, Toshio Watanabe and Daisuke Sakai*. *Mitf10* knockout mouse model reveals critical role of Af10-dependent H3K79 methylation in midfacial development. *Scientific Reports* (査読有り) 7(1):11922. 2017. *corresponding author
3. Daisuke Sakai, Jill Dixon, Annita Achilleos, Michael Dixon, and Paul A Trainor. Prevention of Treacher Collins syndrome craniofacial anomalies in mouse models via maternal antioxidant supplementation. *Nature Communications* (査読有り) 7, 10328. 2016.

[学会発表](計 11 件)

1. 酒井大輔、村上由希. 低酸素応答因子 *Hif1* は GABA 陽性の抑制性神経細胞の発生を制御する. 第 41 回日本分子生物学会. 2018
2. 酒井大輔. 多因子性顎顔面奇形疾患の発症機序. 第 42 回関西生殖発生毒性フォーラム. 2018
3. Honami Ogoh, Kazutsune Yamagata, Nakao Tomomi, Lisa L. Sandell, Ayaka Yamamoto, Aiko Yamashita, Naomi Tanga, Mai Suzuki, Takaya Abe, Issay Kitabayashi, Toshio Watanabe, Daisuke Sakai. A knockout mouse model reveals a critical role of Af10-dependent H3K79 methylation in midfacial development. 第 70 回日本細胞生物学会 第 51 回日本発生生物学会合同大会. 2018
4. Daisuke Sakai. Anaerobic glucose metabolism regulates neural tube formation. 第 50 回日本発生生物学会. 2017
5. 酒井大輔. 先天性顎顔面奇形を出生前に防ぐ. 第 39 回日本分子生物学会. 2016
6. 酒井大輔. 顎顔面奇形の発症機序と出生前予防. 第 27 回日本色素細胞学会. 2016

7. 酒井大輔. トリーチャーコリンズ症候群の発症機序の解明と出生前予防. 宮崎大学医学部 腫瘍生化学セミナー. 2016
8. 酒井大輔. トリーチャーコリンズ症候群における顎顔面奇形の発症機序と出生前予防. 新潟大学歯学部セミナー. 2016
9. Honami Ogo, Tomomi Nakao, Jun Motoyama, Toshio Watanabe and Daisuke Sakai. Deregulation of histone methylation is implicated in the etiology of frontonasal dysplasia. Gordon Research Conferences 2016, 7th Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration. 2016
10. Honami Ogo, Tomomi Nakao, Issay Kitabayashi, Jun Motoyama, Toshio Watanabe and Daisuke Sakai. The role of H3K79 methylation on craniofacial development. International Symposium 2015, Oral and Craniofacial Development and Disease. 2015
11. 酒井大輔. トリーチャーコリンズ症候群モデルマウスによる顎顔面奇形発症メカニズムの解明. 第55回 日本先天異常学会学術集会. 2015

〔図書〕(計1件)

1. Dennis, R. Warner, Daisuke Sakai, and Lisa, L. Sandell (S Gallagher and E Wiley eds). John Wiley & Sons, New Jersey. Mammalian Cell Culture. Current Protocols in Essential Laboratory Technique.10:4.3.1-4.3.33. 2015.

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。