

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19580343

研究課題名(和文)：オボアルブミンの生理機能とオボアルブミン欠如で生じる神経管欠損症の発生機構の解明

研究課題名(英文)：Studies on physiological functions of ovalbumin and occurrence of neural tube defects due to deprivation of ovalbumin in chick embryo.

研究代表者

杉元 康志 (SUGIMOTO YASUSHI)

鹿児島大学・大学院連合農学研究科・教授

研究者番号：10100736

研究成果の概要(和文)：

(背景)鳥類の発生において卵白タンパク質はアミノ酸供給源として重要な役割を果たす以外、外的微生物からの侵入を防御する働きを持っている。卵白の主要タンパク質・オボアルブミンは構造的にはセルピンファミリーに属しているが、プロテアーゼ阻害作用は有していないためその生理機能は不明である。本研究ではオボアルブミンの機能の解明を目的に、ニワトリ胚培養系を使って、オボアルブミンの胚への供給をブロックすることで形態形成に及ぼす影響を調べた。

(方法)ステージ7胚をペーパーリング法を用いて1%寒天培地上で24時間培養した。遺伝子発現はISH、WISH、リアルタイムPCR、マイクロアレイで解析した。

(結果)神経管閉鎖前胚ではオボアルブミンブロックにより、神経管閉鎖が阻害され、神経管欠損(NTD)胚となった。体節形成などにも異常が生じたことからオボアルブミンが形態形成に重要な働きを有することが考えられた。オボアルブミンブロック胚では神経管では細胞増殖の阻害とアポトーシス細胞の減少が見られ、一方、神経上皮細胞は過剰に増殖しており、表皮上皮組織の形成が促進していた。ブロック胚では形態形成因子である *fgf8* および *slug* の発現が低下しており、*Pax3* および *BMP4* が上昇していた。マイクロアレイ解析の結果、正常胚とオボアルブミンブロック胚では約1,100種の遺伝子に発現変化が観察され、細胞コミュニケーションおよび接着のシグナル伝達系の発現低下が顕著に見られ、その他、いくつかの形態形成に関わる遺伝子のシグナル伝達系にも異常な発現が観察された。

(結論)これまで不明であったオボアルブミンの生理機能について神経管閉鎖などの形態形成に重要な働きを有することが明らかになった。オボアルブミンは *fgf8* のような中枢神経形成に関わる因子と協調してBMPの作用を抑制することによって上皮組織細胞の増殖を抑え、神経細胞への分化を促進すると考えられる。よってオボアルブミンの供給を抑制すると神経細胞への分化が阻害され、神経細胞と上皮細胞のバランスが崩れ、NTDになると推定された。

(展望)ヒトで見られるNTD症は葉酸やイノシトールである程度防止することが出来る。しかし、その原因は不明であり、どのような遺伝子によるものかも特定されていない。ヒトにもオボアルブミンに似たセルピン系のタンパク質の存在も知られており、この遺伝子の変異あるいはタンパク質の機能不全により発生する可能性がある。今後、オボアルブミンと形態形成因子との相互作用およびヒトホモログオボアルブミンの同定と機能解明を進め、NTDの発症メカニズムを明らかに出来る。

研究成果の概要(英文)：

Ovalbumin has been classified as a homolog of serine protease inhibitor (serpin), although little is known of its function except that it may be a nutrient source. We have shown that, during embryonic development, native molecules of ovalbumin (N-ovalbumin) are incorporated into tissues without

degradation while undergoing configurational changes into a heat-stable form called ‘HS-ovalbumin.’ Here, to investigate the indispensability of HS-ovalbumin, we utilized an *in vitro* culture method by which chick embryos isolated from eggs at Stage 7 (before the neural tube begins to close) could develop normally for up to 24 h. When endogenous, remnant ovalbumin was blocked by adding anti-ovalbumin polyclonal IgG to the medium, the isolated embryos became irregular particularly in brain tissue, resulting in the so-called neural tube deficiency (NTD). The embryos with NTD showed reduced signals for apoptosis and cell proliferation. Moreover, IgG-treated embryos were rescued by adding a sufficient amount of HS-ovalbumin to the medium, attaining normal morphologies without NTD. HS-ovalbumin exhibited a higher rescue rate than N-ovalbumin and S-ovalbumin, the latter being another heat-stable counterpart that occurs artificially by heating N-ovalbumin *in vitro*. These results indicate that ovalbumin (particularly in the HS-form) is essential in embryonic organogenesis, including neural tube formation. present results show also that the ovalbumin-deprived embryos gave decreased *in situ* signals for TUNEL reagents and for PCNA/c-Myc proteins, which mirror changes in apoptosis and cell proliferation, respectively. Also the ovalbumin deprivation affect the embryos on many gene expressions including differentiation-inducing factors related to morphogenesis. Expressions of FGF8 and slug have decreased markedly, whereas those of BMP4 and Pax3 have increased over 3-fold. However, whether each of these alterations is a cause or a result of morphogenetic aberrancy is unclear. Since ovalbumin belongs to the serpin superfamily, there is a possibility that it shows direct interactions with some crucial differentiation-inducing factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度			
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：オボアルブミン、セルピン、形態形成因子、神経管閉鎖障害、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

卵生の胚が成長するためには母親からの貯蔵栄養を効率よく、利用することにより、鳥類においては卵黄以外にも卵白が備わっている。栄養源以外にも生体防御や輸送に関わっている成分も多い。しかし、胚に直接作用するものの報告は少なく、卵成分の胚への調節効果について興味を持たれている。オボアルブミンは卵白の主要タンパク質であるが、貯蔵タンパク質以外の生理機能は不明である。タンパク構造はプロテアーゼインヒビターであるセルピンに属していることから胚内での役割に興味を持たれていた。オボアルブミンの供給をブロックした初期胚では神経管閉鎖障害を起こし、いわゆる神経管欠損(NTD)胚となることを明らかにした。ヒトにおいてもNTDはよく見られる奇形発生で、その防止には妊娠前や初期にビタミン

の葉酸を服用することが推奨され、原因の究明が望まれている。ヒトでもオボアルブミンホモログは報告されており、オボアルブミンの供給をブロックしたニワトリ胚がNTDを発生することはヒトNTDの原因に共通すると考えられる。NTD発生のメカニズムを解明するためにオボアルブミン欠如胚がプログラムされた発生パターンにどのような影響を及ぼすかを遺伝子レベルで追究することがNTD発生の解明に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

オボアルブミンの供給をブロックしたニワトリ胚は神経管閉鎖障害を起こし、NTDとなる。オボアルブミンが神経管形成をはじめ胚の形態形成に関与する因子であると推察されることから、オボアルブミンの機能を明

らかにすることがヒトのNTD発生のメカニズムを解明する上で重要と考えられる。形態形成での遺伝子発現は綿密にプログラムされ、特徴ある形態形成因子が時間空間的に作用することで形態形成が完成する。オボアルブミンがそのような形態形成因子の発現に関与しているかを詳細に解析する必要がある。オボアルブミンは胚外から供給され、増殖する多くの胚細胞内に取り込まれ、核にもその存在が観察される。どのような経路でオボアルブミンが胚の核まで到達するのかは不明であるが、オボアルブミンの機能は胚内で発揮されると推定される。オボアルブミンはこの段階で熱安定型のHS型となっており、これが機能性オボアルブミンと考えられる。神経管形成にはいくつかの遺伝子が関わっており、Shh, Pax3 と 6, BMP2 と 4, FGF8, slug, Wntなどが重要な働きをしており、それらの発現のバランスにより神経管閉鎖は完成する。オボアルブミンの供給をブロックすることでこれらの因子の遺伝子発現にどのような影響を及ぼすかを解析することは重要である。本研究を遂行するに当たり、オボアルブミンブロック胚の網羅的な遺伝子発現および神経管形成因子の動態について調べ、NTD発生との関連を考察した。

3. 研究の方法

ステージ7のニワトリ胚を切り出し、シャーレ上でペーパーリング方を用いて培養を開始し、オボアルブミン抗体を添加して、胚へのオボアルブミンの供給をブロックした。これを24時間発生を継続させ、形態変化を観察した。この方法により、80%以上の確立でNTD胚を作製できた。胚組織のオボアルブミンの局在はオボアルブミン特異的抗体を用いて、検出した。細胞増殖はPCNA抗体とMyc抗体、アポトーシスはTUNEL法で観察した。遺伝子発現の変化はin situ hybridization (ISH)、whole mount in situ hybridization (WISH)、リアルタイムPCR、DNAマイクロアレイで解析した。

4. 研究成果

オボアルブミンは神経管が閉鎖する段階以前の胚組織に広く局在していた。神経管閉鎖前のステージ7の胚をin vitro胚培養システムで培養し、神経管閉鎖が完成するステージ12まで観察した。オボアルブミンの供給をオボアルブミン抗体でブロックした胚では神経管閉鎖が阻害され、NTD胚となり、ステージ10以降オボアルブミンは検出されなかった。NTD胚では細胞増殖が大きく阻害され、また、アポトーシス細胞も顕著に減少していた。NTD胚は細胞増殖の異常と

死すべき細胞のアンバランスが脳胞形成つまり神経管閉鎖に大きな影響を与えていると推定される。WISH および ISH の観察により、オボアルブミンブロック胚では FGF8 と Slug の発現が低下しており、これに対し、BMP4 と Pax3 の発現が亢進していた。Shh および Pax6 の発現は影響なかった。これらの遺伝子の発現の変化は定量PCRでも確認された。オボアルブミンはこれらに遺伝子に何らかの関わりを持つと推定された。マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現の解析を行った結果、解析した4万の遺伝子のうち約1,100種の遺伝子に変化が認められた。その中では、いくつかの中枢神経形成に関わる遺伝子に発現低下や亢進が認められたが、FGF8 と Slug の低下、Pax3 の亢進は確認できたが、サンプルは胚全体を用いたことから WISH および ISH ほどの差は認められなかった。神経管のみのサンプルでの解析を行う必要がある。しかし、細胞間コミュニケーションや接着に関連する遺伝子、葉酸代謝、タンパク質分解系、アルブミン合成、ストレス応答など遺伝子間ネットワークに変化が見られることが明らかになった。特に細胞間コミュニケーションや接着の破綻が神経管閉鎖障害に関与していると思われる。NTD胚では FGF8 の発現低下により、fgf8 タンパク質の BMP4 発現抑制を制御できず、未分化外胚様細胞の神経細胞への分化が阻害され、一方、bmp4 の亢進により神経上皮細胞へと分化が進むことにより、神経管が閉鎖できないと結論した。ヒトのNTD発生の場合にも、オボアルブミンホモログの異常により、神経細胞への分化誘導が抑制され、上皮細胞への分化が促進され、NTD胚となる可能性も示唆できる。

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)

[雑誌論文] (計10件)

1 Yamaguchi, T, Matsumoto, M., Sugimoto, Y., Soutome, S., Oho, T. Gene cloning and characterization of Streptococcus intermedius fimbriae involved in saliva-mediated aggregation. Research in Microbiology. 160: 809-816. 2009.

(査読あり)

2 Saito, K., Sugimoto, Y. et al. Effects of humidity-stabilizing sheets on the quality of

bigeye tuna meat. Food Science & Technology Research. 15:283-292. 2009. (査読あり)

3 Saito, K., Ahhmed, A.M. Kawahara, S. Sugimoto, Y .et al. Evaluation of the performance of osmotic dehydration sheets on freshness parameters in cold-stored beef biceps femoris... Meat Science, 82:260-265. 2009. (査読あり)

4 Hayashi, Y. H., Nagano, Enomoto, H., C-P. Li., Sugimoto, Y., Ubrahim., H.R., Hatta., H., Takeda, C., Aoki, T. Improvement of foaming property of egg white protein by phosphorylation through dry-heating in the presence of pyrophosphate. J Food Sci. 74:68-72. 2009. (査読あり)

5 Enomoto, H, Li CP, Morizane, K, Ibrahim HR, Sugimoto, Y, Ohki, S, Ohtomo, H, Aoki, T. Improvement of functional properties of bovine serum albumin through phosphorylation by dry-heating in the presence of pyrophosphate. J. Food Sci.73(2):84-91. 2008. (査読あり)

6 Hayashi, Y. Can-Peng Li, Enomoto, H. Ibrahim, HR, Sugimoto, Y. Aoki.T. Improvement of Functional Properties of Ovotransferrin by Phosphorylation through Dry-heating in the Presence of Pyrophosphate. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 21 (4): 596-602. 2008. (査読あり)

7 水本裕子、大野木宏、水谷滋利、榎木 竜嗣、浅田起代蔵、杉元康志、加藤郁之進. ブナシメジ由来ポリテンペルのHL-60細胞におけるアポトーシス誘導機構. 日本食品科学工学会誌 55: 612-618. 2008. (査読あり)

8 水本裕子、大野木宏、水谷滋利、榎木 竜嗣、浅田起代蔵、杉元康志、加藤郁之進. ブナシメジ由来 Hypsiziprenol A9 による cAMP 経路の抑制を介した HL-60 細胞のアポトーシス誘導. 日本きのこ学会会誌 16: 2008. (査読有り)

9 Shinohara, H, Horiuchi, M, Sato, M, Kurisaki,

J, Kusakabe, T, Koga, K, Minami, Y, Aoki, T, Kato, I, Sugimoto, Y. Transition of ovalbumin to thermostable structure entails conformational changes involving the reactive center loop. Biochim Biophys Acta. 1770:5-11. 2007. (査読あり)

10 Enomoto, H, Li CP, Morizane, K, Ibrahim, HR, Sugimoto, Y, Ohki, S, Ohtomo, H, Aoki, T. Glycation and phosphorylation of beta-lactoglobulin by dry-heating: effect on protein structure and some properties. J Agric Food Chem. 55(6):2392-2398. 2007. (査読あり)

[学会発表] (計 8 件)

1 木戸玲奈 杉元康志、他、日本分子生物学会、リゾチームアミロイド線維が細胞に与える影響、横浜市. 2009 年 12 月 10 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉元 康志 (SUGIMOTO YASUSHI)
鹿児島大学・大学院連合農学研究科・教授
研究者番号：10100736

(2) 研究分担者

岡 達三 (OKA TATSUZOU)
鹿児島大学・農学部・教授
研究者番号：50116795

日下部 宜宏 (KUSAKABE TAKAHIRO)
九州大学・(連合) 農学研究科 (研究院)・
准教授
研究者番号：30253595