

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06673

研究課題名(和文) エネルギー代謝勾配：組織パターン形成を制御する新規因子

研究課題名(英文) Gradients of energy metabolism: A novel player involved on the vertebrate embryo patterning

研究代表者

荻沼 政之(Oginuma, Masayuki)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：50825966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は我々の独自仮説である「エネルギー代謝経路が勾配を形成し「モルフォジェン」同様に組織パターン形成因子として働く」という考えを検証することで、発生・栄養代謝研究の新概念構築を目指した。そこでまず初めに、胚が透明であるゼブラフィッシュと、寿命が短く老化研究に最適なターコイズキリフィッシュの2種を用いてエネルギー代謝経路の代謝物であるATP、NAD⁺、pHをを個体レベルで可視化・定量できるレポーターラインを作製した。さらに、作製したラインを用いた解析から、胚の様々な組織形成過程や、成体組織で代謝勾配パターンを発見し、エネルギー代謝勾配による組織パターン形成機構が普遍的に働くことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、胚の組織形成過程や、成体や老化過程における組織維持過程における新概念の構築を目指した。特に、成体組織の老化を制御する機構は不明点が多く、本研究から得られた知見によって、組織老化を抑制する新しい治療法、創薬の可能性が生まれた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined our hypothesis that energy metabolic gradients organize tissue pattern formation as the canonical morphogen gradients. We developed metabolic reporter lines that visualize intracellular pH, NAD⁺ and ATP for the zebrafish and African killifish. From these reporter lines, we found that during embryonic development and in the adult body a lot of tissue and organ show the metabolic gradient pattern. From these results, we concluded that metabolic gradients are general mechanism that organize tissue pattern formations.

研究分野：発生生物学

キーワード：胚発生 組織形成 老化 代謝 ゼブラフィッシュ ターコイズキリフィッシュ

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

エネルギー代謝はグルコースを生体エネルギー分子である ATP に変換するとともに、細胞の構築に必要な物質を供給する、細胞の恒常性維持や増殖などの生命活動に欠かせない反応である。興味深いことに、近年、エネルギー代謝経路が細胞のエネルギー制御に留まらず、生じた代謝物を介して種々のシグナル経路、エピジェネティクス因子の機能・活性を制御することで複雑な生命現象を制御することが明らかになった。しかし、多くの代謝研究は癌等の病理学の観点から進められており、胚発生時における代謝の動態、機能はほとんど明らかになっていなかった。最近我々はマウス、ニワトリ胚を用いた解析からエネルギー代謝経路である解糖系の活性が初期胚後方で勾配を形成し、Wnt シグナル経路の活性の誘導を促すことで、胚の後方パターンを制御することを発見した(Oginuma et al., Dev Cell. 2017)。そこで本研究は、エネルギー代謝経路を個体レベルで可視化・定量できるシステムを構築し、その役割を解析することでこの仮説を検証し、発生研究・栄養代謝研究の新概念構築を目指す。

2. 研究の目的

近年、エネルギー代謝経路が細胞のエネルギー制御に留まらず、生じた代謝物が、タンパク質やヒストンのアセチル化、メチル化などの化学修飾を介して、種々のシグナル経路、またエピジェネティクス因子をコントロールし多種多様な生命現象を制御することが分かってきた。しかしながらこのような代謝の新機能の研究は、は癌等の病理学の観点から進められており、胚発生や組織形成時における代謝の動態、機能はほとんど明らかになっていない。一方で、我々は最近、脊椎動物初期胚の前後軸に沿って好氣的解糖系の活性勾配が形成され、この勾配が胚組織の形態形成を制御することを発見した(Oginuma et al., Dev Cell. 2017)。以上の結果を踏まえ、我々は「エネルギー代謝勾配が「モルフォジェン」同様に組織パターン形成因子として働き、それは様々な組織形態形成に寄与する普遍的な機構である」という作業仮説を立てた。本研究は、胚が透明でありイメージング解析に最適なモデル動物であるゼブラフィッシュと寿命が脊椎動物で最短であり老化解析に最適な新規モデル動物ターコイズキリフィッシュを用いて、エネルギー代謝経路の動態を個体レベルで可視化・定量できるシステムを構築し様々な組織形成過程、組織維持過程における代謝動態を観察し、エネルギー代謝勾配が形成される組織を探る。さらに、遺伝学的、薬理学的手法を用いてエネルギー代謝勾配の活性を改変することでその役割を調べ、仮説を検証する。以上によって、エネルギー代謝のパターンに注目することで、発生研究・栄養代謝研究の全く新しい概念の構築を行う。

3. 研究の方法

<計画 1>エネルギー代謝勾配の形成機構の解明

エネルギー代謝勾配の形成機構を明らかにするためには、代謝物を絶対定量する必要がある。代謝は連続した化学反応によって引き起こされるので、固定サンプルでその状態を保つことは難しく、生きたままの状態を観察する必要性が生じる。現在までに代謝経路・代謝産物を可視化する蛍光レポーター遺伝子が開発されているが、このような研究は培養細胞を用いた研究が主であり、個体レベルでの解析はほとんど行われていない。そこで我々は、蛍光生体イメージングに最も適したモデル動物であるゼブラフィッシュや、寿命が脊椎動物で最短であり老化解析に最適な新規モデル動物ターコイズキリフィッシュを用いてエネルギー代謝経路に関わる代謝物(代謝経路)の可視化レポーター遺伝子を、Tol2 トランスポゾン法を用いた導入した遺伝子改変個体を作製することで、胚発生、成体組織における代謝動態を可視化・定量化するシステムを構築する。これらのレポーターフィッシュを用いて、エネルギー代謝勾配の中核をなす代謝物(代謝経路)が“いつ”“どこ”“どの程度”働いているのかを正確に把握する。

<計画 2>エネルギー代謝勾配による位置情報決定機構の解明

我々は過去の実験で、解糖系が Wnt シグナルの上流で機能していることを明らかにした(Oginuma et al., Dev Cell. 2017)。このことからエネルギー代謝勾配は既知のモルフォジェンである Wnt シグナル経路勾配を介して胚の位置情報を制御している可能性が高いが、この分子基盤は不明である。そこで、所属研究室作成された Wnt シグナル活性を可視化・定量化できる高感度 Wnt レポーターフィッシュ (d2EGFP: Shimizu et al., Dev Biol 2012, Eluc-CP: Akieda et al.

Nature Commun 2019) を利用して、エネルギー代謝経路と Wnt シグナルのクロストーク機構の全貌を解明する。遺伝学的、薬理学的手法を用いて、エネルギー代謝経路の特定の代謝物の量を変化させた条件を作り出し Wnt レポーターフィッシュを用いて Wnt シグナル勾配を定量することで、モルフォジェン因子として作用代謝物・代謝経路をする同定する。

4. 研究成果

<計画 1> エネルギー代謝勾配の形成機構の解明

初めに、エネルギー代謝経路の代謝物である ATP (QUEEN2m: Yaginuma et al., *SciRep* 2014)、NAD⁺ (Peredox: Hung et al., *Cell Metab* 2011)、pH (Hluorin: Miesenböck et al., *Nature* 1998) や、エネルギー代謝経路を制御すると考えられるオートファジーの活性 (GFP-LC3-RFP-LC3ΔG: Kaizuka et al., *Mol Cell* 2016) を可視化するレポーター遺伝子をゼブラフィッシュに導入したトランスジェニック系統を樹立した。次にこれらのレポーターフィッシュを用いて初期胚におけるエネルギー代謝経路の動態を調べた結果、Wnt シグナルの勾配パターンが観察される、初期胚の前後軸で ATP や NAD⁺ の勾配パターンが観察された。興味深いことに、オートファジー活性も同様の勾配パターンを形成することも分かった。つまり、解糖系と Wnt シグナルのクロストークにオートファジーも寄与する可能性が示唆された。

次に、作製したトランスジェニックゼブラフィッシュを用いて初期胚だけでなく、後期の胚発生過程におけるエネルギー代謝経路の動態を調べた結果、初期胚だけでなく様々な組織形成過程においてもエネルギー代謝やオートファジー活性が勾配パターンを形成されることを新たに発見した。

最後に、胚発生だけではなく成体組織やその老化過程におけるエネルギー代謝の動態を調べるために、ターコイズキリフィッシュにおいても同様のトランスジェニック系統を樹立した。また、これらの作製したレポーターラインを用い、成体組織を透明化処理することで代謝パターンの詳細解析を行なった結果、成体の肝臓や腸の組織で Wnt シグナルなどと並行した代謝勾配パターンを示すことを明らかにした。つまり、エネルギー代謝勾配による組織パターン形成機構が、初期胚だけでなく他の組織、器官形成過程、さらに成体における組織成長、維持過程においても普遍的に働くことが示唆された。

<計画 2> エネルギー代謝勾配による位置情報決定機構の解明

今回新たに発見したゼブラフィッシュ初期胚における Wnt シグナルとエネルギー代謝活性の勾配パターンに並行したオートファジー活性の勾配パターンの機能を調べるために、オートファジー活性に必須な遺伝子(ATG5, Beclin1)、またはオートファジー抑制遺伝子(Rubicon)を用いた機能改変実験から、オートファジーの活性勾配も初期胚の前後軸パターン形成過程に必須な役割を持つことを発見した。

次に、高感度 Wnt レポーターフィッシュを用いてオートファジーの勾配を改変した胚における Wnt シグナルの活性を調べた結果、オートファジーの活性勾配も Wnt シグナルの活性勾配形成に重要な役割を持つことも分かった。

以上本研究を通して、エネルギー代謝勾配は初期胚だけでなく様々な組織形成過程、成体における組織成長、組織維持、組織老化にも重要な役割を持つことが分かり、この様なエネルギー代謝勾配の形成にはオートファジー経路による代謝調節が重要な役割を持つことが新たに分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masayuki Oginuma, Yukiko Harima, Oscar A Tarazona, Margarete Diaz-Cuadros, Arthur Michaut, Tohru Ishitani, Fengzhu Xiong, Olivier Pourqui	4. 巻 584
2. 論文標題 Intracellular pH controls WNT downstream of glycolysis in amniote embryos	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 98-101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-020-2428-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tomoko Uehara, Kota Abe, Masayuki Oginuma, Shizuka Ishitani, Hiroshi Yoshihashi, Nobuhiko Okamoto, Toshiki Takenouchi, Kenjiro Kosaki, Tohru Ishitani	4. 巻 10
2. 論文標題 Pathogenesis of CDK8-associated disorder: two patients with novel CDK8 variants and in vitro and in vivo functional analyses of the variants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74642-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 荻沼 政之
2. 発表標題 細胞内pH: 脊椎動物の発生現象を制御する新規因子
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masayuki Oginuma
2. 発表標題 Metabolite: A novel player controls embryonic development
3. 学会等名 JSDB Online Trial Meeting 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masayuki Oginuma
2. 発表標題 Molecular basis underlying “Diapause”, the systems suspending vital activities
3. 学会等名 第3回 ExCELLSシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荻沼 政之
2. 発表標題 生命活動休止システム「休眠」の分子基盤と意義の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荻沼 政之
2. 発表標題 生命活動休止システム「休眠」の分子基盤と意義の解明
3. 学会等名 第2回ExCELLSシンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荻沼 政之
2. 発表標題 生命活動休止システム「休眠」の分子基盤と意義の解明
3. 学会等名 第3回 冬眠休眠研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 荻沼 政之	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 4
3. 書名 実験医学(カレントトピックス)	

〔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
---------	---------