

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20700326

研究課題名（和文）

二分脊椎症の発症機序における葉酸代謝経路と Zic 遺伝子の関係

研究課題名（英文）

Relationships between Zic and folic acid metabolic pathway on spina biphida

研究代表者

藤見 峰彦 (Fujimi Takahiro)

独立行政法人理化学研究所・行動発達障害研究チーム・研究員

研究者番号：80322452

研究成果の概要（和文）：本研究は二分脊椎症に関わるとされる Zic 遺伝子と二分脊椎症のリスクを低減する葉酸に着目し両者の関係を明らかにする事を目的とした。実験には初期胚での操作、観察が容易なツメガエル胚を用いた。葉酸代謝経路で特に重要な MTHFR 遺伝子の時空間的発現パターンは XZic2 のそれと一致した。MTHFR, XZic2 遺伝子について morpholino oligo によるノックダウン実験により、神経管閉鎖に重要な遺伝子 (shroom3) への両遺伝子の影響が明らかになった。

研究成果の概要（英文）： The aim of this study is to elucidate the relationship between Zic (one of the causative gene of spina bifida) and folic acid (risk reliever of spina bifida). *Xenopus* embryos were used for this study because of the easy observation and handling of early embryo. Spatiotemporal expression patterns of MTHFR gene (significant gene of folic acid metabolism) were overlapped with those of XZic2 gene. Knockdown (KD) analysis with moropholino oligo showed that both MTHFR and XZic2 KDs induced the reduction of shroom3 expression, which is significant for neural tube closure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 ・神経解剖学・神経病理学

キーワード：Zic、二分脊椎症、MTHFR、shroom3

1. 研究開始当初の背景

二分脊椎は脊椎の癒合が完全に行われず一部開いた状態で出生する先天性の障害で、世界的

な統計では 1000 出生に 1 件程度の割合で見られる。脊髄形成不全を伴い、様々な神経障害や合併症を引き起こす事がある。適切な治療により通常の生活が可能だが、脳神経外科、小児科、

小児外科、泌尿器科、整形外科、リハビリテーション科等にわたる総合的且つ継続的な治療と支援を必要とし、患者と家族の QOL は著しく低下する。

葉酸は神経管閉鎖障害の発症リスクを低減するビタミンとして、厚生労働省が妊娠前及び初期の摂取を推進している。穀類製品への葉酸添加を義務づけたカナダでは、二分脊椎などの神経管閉鎖障害が 46%減少した。このように葉酸の有用性は明らかだが、その詳しい分子機構は明らかになっていない。上記の数値が示すように、二分脊椎症には葉酸摂取によって回避できない例も多くあり、詳細な発症機序の解明が待たれる。

Zic は発生過程での細胞分化・増殖の調節因子として働く転写因子である。脊椎動物では 5 種の関連遺伝子が存在するが、その中でも Zic2 のノックダウンマウスの表現型として二分脊椎が、Zic3 や Zic5 の遺伝子欠損マウスでは外脳症が観察される。ツメガエル初期胚では神経管閉鎖時期において神経管での Zic 遺伝子発現が観察され、Zic 優性ネガティブ変異体過剰発現により神経管閉鎖の遅延が認められた。

2. 研究の目的

本研究の目的は二分脊椎症の発症に関わる分子機構を解明することである。そのため、本研究では二分脊椎症の発症リスク軽減因子である事が知られている葉酸の代謝経路に関わる遺伝子と、二分脊椎症に関わる遺伝子であり、細胞分化・増殖の調節因子として働く転写因子 Zic の関係を注目に注目して実験を行う。

これまで活発に研究されながら発症に関して細胞内の決定的な機構にたどり着けていない葉酸代謝経路と、発症との関連が指摘されながらこれまでほとんど臨床的に注目されていない Zic 遺伝子を結ぶ糸を見つけ出し、新たな予防戦略への突破口を開く一助としたい。

3. 研究の方法

神経管閉鎖は発生の極めて早い段階で起こる。そこで本研究では、初期胚の観察及び操作が容易なツメガエルを実験動物として選択した。

主にツメガエル Zic2、および Zic3 (XZic2, XZic3) 遺伝子と葉酸代謝において特に重要な MTHFR 遺伝子に注目して実験を行った。

(1) cDNA の単離

データベースより取得したツメガエル MTHFR、

cited2、shroom3、ornithine decarboxylase (ODC) 各遺伝子の情報をもとに primer を作製した。ツメガエル胚 cDNA pool をテンプレートとしてコード領域全長または一部の配列を増幅し、TA-cloning 法により単離した。

(2) 遺伝子発現パターン解析

ツメガエル胚を用いて、発生の段階を追ってサンプルを作製し、RT-PCR や whole mount *in situ* hybridization 法により時空間的な遺伝子発現パターンの比較を行った。また原腸胚において三胚葉の切り分けを行い RT-PCR により、遺伝子発現のパターンを調べた

(3) 機能阻害実験

Morpholino oligo を設計し、ツメガエル初期胚に注入、その後の形態の異常を観察した。また、葉酸代謝拮抗剤である methotrexate (MTX) を含む培養液中で胚を維持し、形態の観察を行った。

(4) 遺伝子発現解析実験

各種 Morpholino oligo を注入したツメガエル初期胚から RNA を抽出しそこから cDNA を合成した。これをテンプレートとして SYBR Green のインターカレーションに基づく Real-time PCR 法により MTHFR、cited2、shroom3、ODC の各遺伝子発現量を測定した。測定値は ODC の値で標準化した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子発現パターンの解析

RT-PCR の結果から MTHFR 遺伝子は母性発現しており受精前から神経管閉鎖に関わる時期にも発現が確認された XZic2、XZic5 も母性発現しており、その他の XZic 遺伝子も中期胞胚変移後から発現開始し、神経管閉鎖の時期には全ての XZic 遺伝子が発現している事が知られていることから、時間的な矛盾は無いことがわかった。発現レベルの推移は原腸陥入から神経管閉鎖に関わる時期においてやや発現レベルが低下する傾向がみられた。また原腸胚において胚葉別に発現を調べたところ、すべての胚葉において MTHFR 遺伝子が検出された。

MTHFR 遺伝子の空間的発現を Whole Mount *in situ* Hybridization で解析したところ、閉鎖開始前のステージにおいて神経板境界領域と原口周辺で発現が観察された。神経板境界領域は Zic 遺伝子が強く発現する領域と重複する。

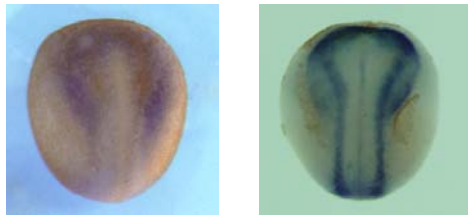


Fig.1 MTHFR 及び XZic2 遺伝子の発現パターン
左：MTHFR 右：XZic2 初期神経胚における発現パターン。ともに神経堤、神経版境界領域に発現が見られる。

(2) 機能阻害実験

MTHFR 遺伝子に対する morpholino oligo を設計・作製し、ツメガエル初期胚にインジェクションした。10 ng/embryo、20 ng/embryo の各条件でインジェクションしたが、その後の発生は未処理胚との差はなく神経管閉鎖に異常はみられなかった。また葉酸代謝拮抗剤である methotrexate (MTX) を含む培養液中で胚を維持し、形態の観察を行った。MTX 濃度 10 μ M の条件にて stage 1 から培養を行ったが、その後の発生は未処理胚との差はなく神経管閉鎖に異常は見られなかった。

XZic2、XZic3 に対する morpholino oligo をツメガエル初期胚にインジェクションし胚の観察を行った。20 ng をインジェクションしたところ、XZic2 morpholino oligo の場合は背側への若干の湾曲と hyoid crest 付近の構造に低形成が見られたが、神経管の閉鎖に異常は見られなかった。また XZic3 の場合は短 A-P 軸の表現型と眼やセメント腺などの頭部構造に異常がみられたものの神経管閉鎖への異常はみられなかった。両 morpholino oligo を混合して注入した場合はより重篤な表現型となったが、やはり神経管の閉鎖は正常であった。これらの結果はノックアウトマウスにより得られていた知見と異なった。

一方で、XZic3 の mRNA をインジェクションし過剰発現条件で胚を観察したところ高頻度で神経管の閉鎖不全が見られた。N 末欠損型 XZic3 優勢ネガティブ変異体の mRNA をインジェクションした場合も神経管閉鎖の遅延が観察されている。以上の実験から、この変異体は XZic3 神経堤マーカー遺伝子の発現誘導能については優勢ネガティブ変異体として働くが、神経管閉鎖に関わる機能については優勢ネガティブ変異体としては機能しないという事が判った。この事は Zic の持つ機能・役割の多様性を示唆する結果であると考えられる。



Fig.2 XZic3 過剰発現胚の形態
左：インジェクション無し 右：XZic3 mRNA 過剰発現胚。
XZic3 mRNA 過剰発現胚において短 A-P 軸、頭部構造の矮小化に加え神経管の閉鎖不全(黒矢印)が高頻度で観察された。

また、この結果は神経管閉鎖に関わる XZic の機能は Zic タンパク質の N 末端側領域に依存しない事を示している。C 末端側の保存性は比較的低い事から Zinc Finger domain に由来する分子機構により引き起こされる現象ではないかと示唆される。

(3) 遺伝子発現解析

Morpholino oligo 注入胚について、(2) では神経管閉鎖の異常を誘導する事はできなかった。そこで morpholino oligo 注入胚での遺伝子発現について realtime-PCR を用いて定量的に解析を行った。最新の知見で、Wnt/canonical 経路と Zic の間に相互作用がある可能性が指摘された。この経路に関わる遺伝子には、二分脊椎症との関連が指摘されているものが多数存在する。そこで対象として、MTHFR、XZic2 の他、T-cell specific factor 3 の morpholino oligo を注入した胚について MTHFR 遺伝子と shroom3 遺伝子の発現量を比較した。shroom3 は T-cell specific factor 3 の下流であり神経管閉鎖に重要な役割を持つ遺伝子である。MTHFR 遺伝子の発現は XZic2 morpholino oligo 注入胚において未処理胚の約 60% (MTHFR_morpholino oligo 注入胚と同程度)にまで減少していた。驚くべき事に T-cell specific factor 3 morpholino oligo 注入胚では未処理胚の約 40%にまで減少していた。さらに全ての morpholino oligo 注入胚で、shroom3 の発現が未処理胚の約 20-30%に低下していた。この時、別の二分脊椎症の原因遺伝子として知られる cited2 遺伝子の発現量は減少しておらず、むしろ 1.2-1.4 倍程度の増加を見せた。この事は shroom3 遺伝子発現の変化が各 morpholino oligo の注入により特異的に起きている事を示唆している。

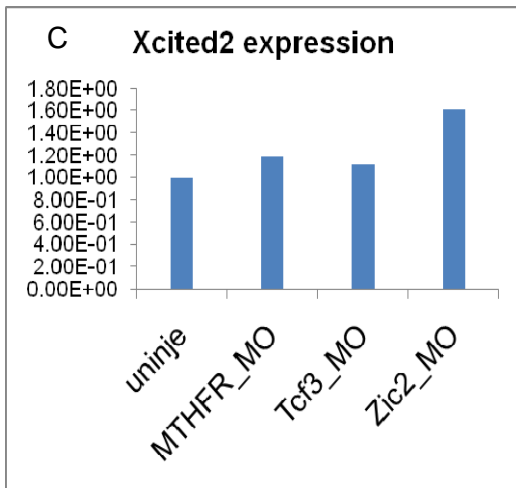
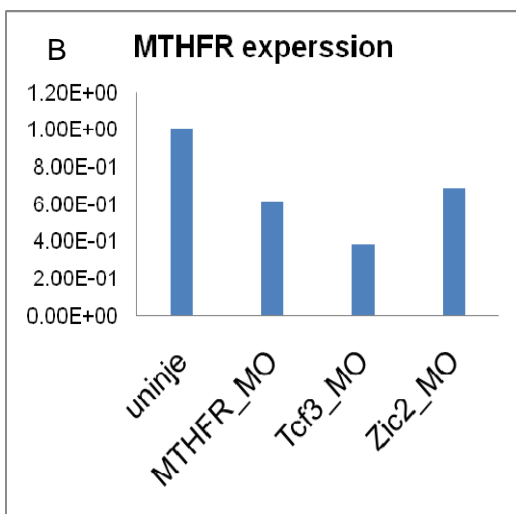
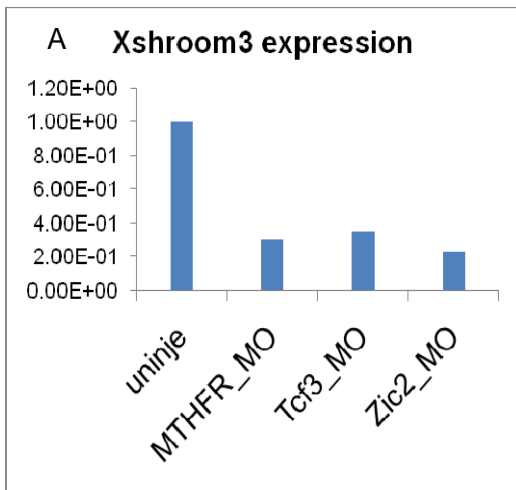


Fig.3 morpholino oligo 注入胚における遺伝子発現の変化。A: MTHFR、B: shroom3、C: cited2 の各遺伝子の発現変化。X 軸は注入した morpholino oligo (MO)の種類。Y 軸は uninje における値を 1 とした時の発現量の比。

(4) まとめ

本研究の結果は、葉酸代謝経路の遺伝子が、XZic2 や T-cell specific factor 3 の制御を受けている可能性を示している。さらにこれらの遺伝子の下流に shroom3 が位置している可能性を示した。shroom3 は神経管閉鎖に関わる細胞において、細胞形態の変化を担う apical constriction に非常に重要な役割を持つ。このことから、本研究はこれまで不明であった Zic と葉酸代謝経路遺伝子間の関係性を示唆するとともにこれら遺伝子の関わる発症機序解明の切り口として、これまで関連が指摘されていなかった shroom3 遺伝子と apical constriction という現象を提示したという意味で意義深いと考える。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤見 峰彦 (Fujimi Takahiko)

独立行政法人理化学研究所・行動発達障害研究チーム・研究員

研究者番号：80322452