

# 論文の内容の要旨

論文題目：食餌環境に応答した神経前駆細胞の活性化機構の解析

氏名： 壹岐 和哉

## 【序論】

幹細胞や前駆細胞は、通常静止期を維持しているが、必要に応じて活性化し、分裂や分化をすることで新たな細胞の供給を行うことが知られている。静止期の維持の破綻は幹細胞プールの枯渇や腫瘍形成などに関連することが示唆されており、幹・前駆細胞の活性化制御は様々な病態との関係が深いと考えられる。近年マウスやキイロショウジョウバエを用いた研究において、摂食に応答して活性化する幹・前駆細胞の存在が報告され、栄養感知に関与する mTORC1 (mechanistic target of rapamycin) と呼ばれるタンパク質複合体キナーゼなどが、この活性化制御に関与していることが示唆されている。しかしながら、生体内における幹・前駆細胞の動態の観察が一般的に非常に困難であることから、食餌環境がどのように幹・前駆細胞の活動に影響を与えるか、また、具体的に食餌中のどのような栄養分子が、いかなる機序によって幹・前駆細胞の機能や動態に作用するか理解が進んでいない。そこで、体が透明で細胞系譜が同定されていることから神経前駆細胞の活性化を生体内で容易に観察することが可能であり、液体培養によって個別の栄養の投与が可能な線虫 *C. elegans* (以下線虫) をモデル生物として利用した。これにより、神経前駆細胞の静止期からの活性化に関与する栄養分子とその感知に介在するメカニズムの解明を試みた。

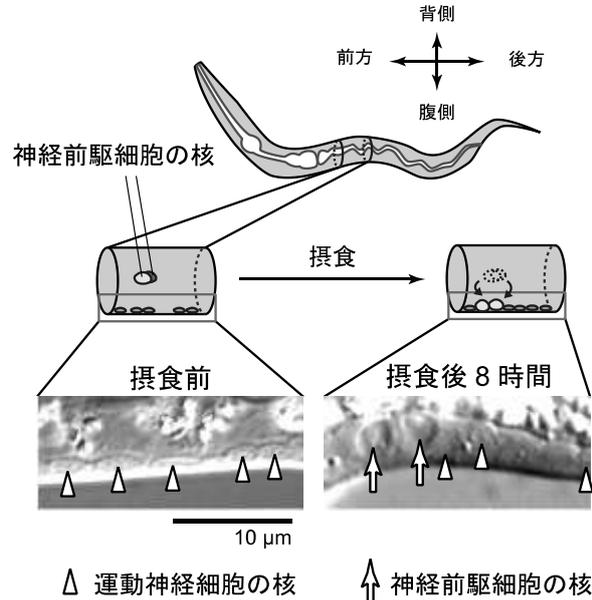


図 1 線虫の神経前駆細胞は摂食に応答して活性化する

孵化直後に飢餓条件におかれた幼虫の腹側正中線上には、分化した神経細胞の核しか見えないが(矢頭)、大腸菌を摂食させると腹側正中線上に移動した神経前駆細胞の核も観察される(矢印)。

## 【方法と結果】

### 1. アミノ酸とエタノールは協調的に線虫の神経前駆細胞を活性化する

線虫の孵化直後の幼虫に存在する神経前駆細胞 (P 細胞とよばれる) は、キロショウジョウバエの proneural 遺伝子 *achaete-scute* のオルソログである *hlh-3* 遺伝子を発現し、摂食を開始するまで体側面で静止期を維持する。しかし摂食を開始すると、活性化した神経前駆細胞は腹側正中線上に移動し (図 1)、分裂して神経へと分化することが知られている。当研究室では、アミノ酸とエタノールをともに投与することでも大腸菌と同様に神経前駆細胞を活性化できることを見出していた (図 2)。この知見を足がかりに、アミノ酸とエタノールが、どのように神経前駆細胞の活性化に関与するのか、解析を進めた。

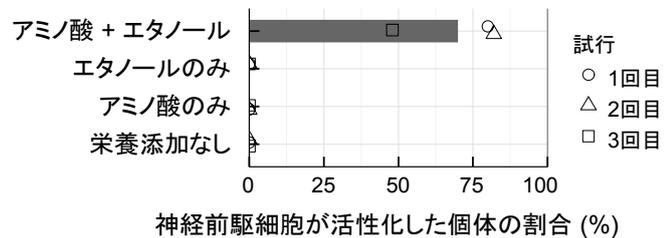


図 2 アミノ酸とエタノールは協調的に神経前駆細胞を活性化する

培養 3 日目において、アミノ酸のみまたはエタノールのみを投与した群では神経前駆細胞が活性化した個体は見られなかったが、両者をともに投与した群では約 70 % の個体で神経前駆細胞の活性化が観察された。

### 2. 神経前駆細胞の活性化におけるアミノ酸の作用は G タンパク質 Rag の機能で説明できる

アミノ酸はタンパク質の構成成分としてだけでなく、積極的にシグナル分子として機能することが知られている。哺乳類では、このアミノ酸によるシグナル伝達に介在する分子として、RagA または RagB と、RagC または RagD という 2 つのサブタイプの間でヘテロ二量体を形成する G タンパク質 Rag が知られている。そこで線虫の生体内の神経前駆細胞が Rag を介してアミノ酸に応答している可能性を検討した。RagA/B および RagC/D それぞれの線虫オルソログをコードする遺伝子 *raga-1* および *ragc-1* の欠失変異体にアミノ酸とエタノールを投与し、神経前駆細胞が活性化した個体の割合を野生型と比較したところ、いずれの変異体においても著しく活性化が抑制されていた (図 3)。本研究に先立って、RAGC-1 に結合するタンパク質として p14 とよばれるタンパク質を同定していたが、これは哺乳類において Rag をリソソーム膜上に係留する分子であった。そこで p14 の欠失変異体についても同様の検討を行ったところ、神経前駆細胞の活性化が著しく抑制されていた (図 3)。さらに当研究室では、恒常活性化型の Rag を表皮および神経前駆細胞特異的に発現すると、エタノール存在下で神経前駆細胞が活性化することを見出していた (図 4)。これらのことからアミノ酸の作用は G タンパク質 Rag の機能によることが示唆された。

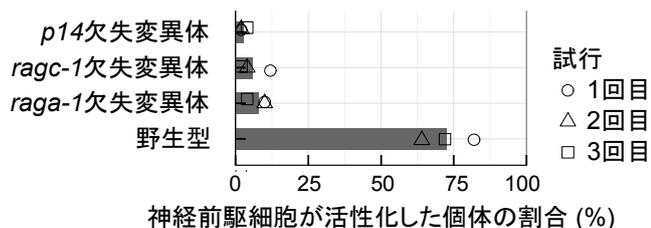


図 3 アミノ酸のシグナル伝達に介在する分子である Rag および p14 はアミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の十分な活性化に必要である

Rag および p14 の欠失変異体では、アミノ酸とエタノールを与えた時の神経前駆細胞の活性化した個体の割合が、培養 3 日目において野生型と比べて著しく減少していた。

しかし依然として、エタノール非存在下では恒常活性化型の Rag を発現しても神経前駆細胞が活性化することはなかった (図 4)。そこで次に、神経前駆細胞の活性化においてエタノールの作用がどのような過程を通じているのか調べることにした。

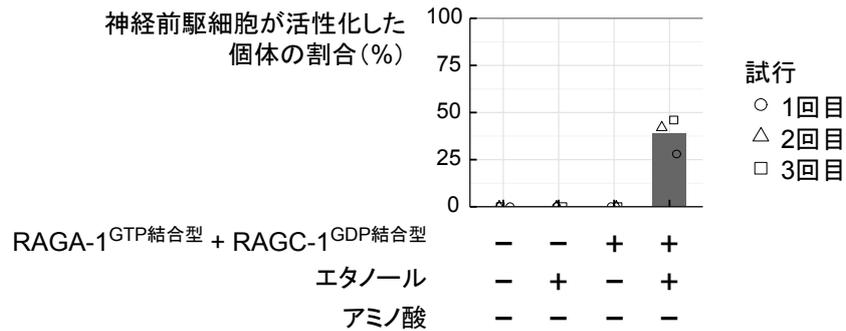


図 4 恒常活性化型の Rag の発現はアミノ酸の作用を代替する

表皮および神経前駆細胞特異的に恒常活性化型の Rag を発現させると、培養 3 日目において、アミノ酸を与えずエタノールのみを投与した群でも神経前駆細胞の活性化が見られる。ただしエタノールすら存在しない群では活性化は見られなかった。

### 3. グルコースは神経前駆細胞の活性化におけるエタノールの作用を代替しない

エタノールは単に炭素源を供給しているだけの可能性があったため、他の代表的な炭素源であるグルコースがエタノールの作用を代替するか調べた。すると、アミノ酸とエタノールを加えた群のすべての個体で神経前駆細胞の活性化がおきる培養 5 日目までに、グルコースはアミノ酸の存在下で神経前駆細胞を活性化することができなかった (図 5)。このことから、エタノールは単なる炭素源ではなく、何らかの特異な機能を有する可能性が考えられる。

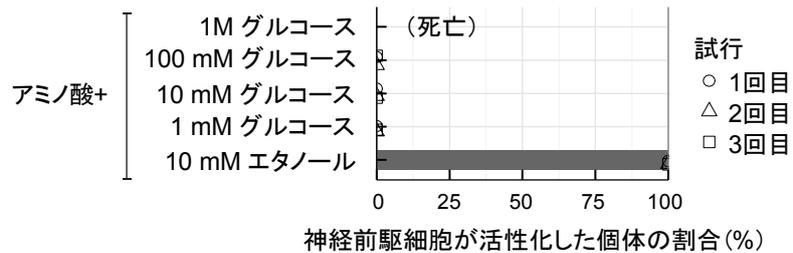


図 5 グルコースの投与はエタノールの作用を代替しない

アミノ酸の存在下でグルコースを投与したが、培養 5 日目までに神経前駆細胞が活性化することはなかった。

### 4. エタノールの代謝産物である酢酸およびパルミチン酸もアミノ酸とともに投与することで神経前駆細胞を活性化する

アミノ酸存在下での神経前駆細胞の活性化において、エタノールそのものが作用するのか、代謝を受けた後もその作用を保持しているのか不明であった。そこで、エタノールから合成される代謝産物をアミノ酸とともに野生型の幼虫に与え、神経前駆細胞を活性化できるか検討を行った。エタノールは生体内で酸化され、酢酸へと変換される。そこで酢酸とアミノ酸をともに投与したところ、アミノ酸とエタノールを投与した場合と同様、神経前駆細胞を活性化するという結果を得た。酢酸はアセチル CoA (coenzyme A) に変換され、TCA (tricarboxylic acids) 回路で酸化されたり、様々な代謝産物の合成単位として利用されたりする。その代謝産物の一つに脂肪酸がある。孵化直後の幼虫に与えたエタノールが脂肪酸合成に利用されることは報告されており、実際脂肪滴が形成されていた。そこで最初に合成される脂肪酸であるパルミチン酸をエタノールの代わりにアミノ酸存在下で与え、神経前駆細胞が活性化するか調べた。パルミチン酸そのものは毒性が高かったため、メチルエステル体をアミノ酸とともに投与したところ、神経前駆細胞を活性

化できることを見出した(図 6)。

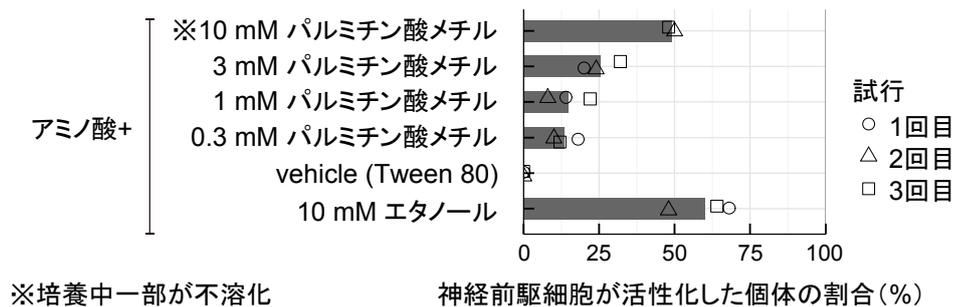


図 6 パルミチン酸メチルとアミノ酸をともに投与しても神経前駆細胞が活性化する。パルミチン酸メチルを Tween 80 を用いて乳化させることでアミノ酸との同時投与を行ったところ、培養 3 日目において神経前駆細胞の活性化が認められた。

### 5. グリセロリン脂質の合成は神経前駆細胞の活性化に関与しうる

エタノールの投与により脂肪滴が多く形成されるが、この主成分はトリアシルグリセロールである。そこでグリセロール骨格に脂肪酸由来のアシル CoA が転移されてできるグリセロリン脂質の関与を調べた。その結果、グリセロール-3-リン酸からのリゾホスファチジン酸の合成を阻害するとアミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化が抑制されることを見出し、グリセロリン脂質が関与する可能性が示唆された(図 7)。

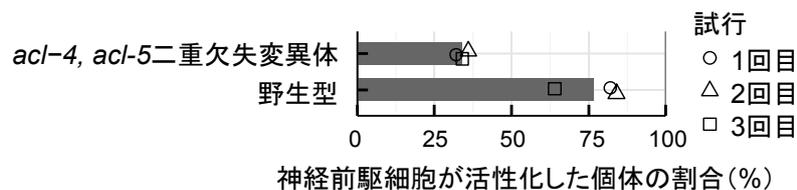


図 7 グリセロリン脂質の合成は神経前駆細胞の活性化に関与しうる。グリセロール-3-リン酸からリゾホスファチジン酸を合成する酵素をコードする *acl-4* および *acl-5* の二重欠失変異体では、アミノ酸とエタノールを与えた時の神経前駆細胞の活性化した個体の割合が、培養 3 日目で野生型と比べて抑制されていた。

### 【まとめと考察】

本研究を通じて、アミノ酸とエタノールが協調的に線虫の神経前駆細胞を活性化するという現象から、アミノ酸の作用は Rag の機能で説明できること、そしてエタノールの作用はその代謝産物である酢酸やパルミチン酸によっても代替できることを示した。また、グルコースがエタノールの作用を代替できないことから、同じアセチル CoA を産生しうる炭素源であっても、その代謝運命が大きく異なり、神経前駆細胞の活性化への作用も異なっている可能性が考えられる。

今後、神経前駆細胞に対するエタノールや脂肪酸の作用の解析により、幹・前駆細胞におけるこれらの栄養分子の役割や、アミノ酸のシグナルとの相互作用に関する重要な知見が得られると期待される。