

博士論文

論文題目 哺乳類器官形成初期の胚で生じるエネルギー代謝状態再編成の解明

氏名 宮沢 英延

目次

背景と目的

1. 生命を規定する因子としての代謝	3
2. 胚発生過程におけるエネルギー代謝制御	4
3. 哺乳類器官形成初期胚の子宮内環境の攪乱に対する脆弱性	5
4. 発生の時間軸を制御する <i>Lin28/let-7</i> 経路	5
5. 本研究の概要	6

材料と方法

マウス	8
胚の回収と固定	8
凍結切片の作成	8
免疫組織学	9
Whole-mount <i>in situ</i> hybridization (WISH)	10
リアルタイム PCR	10
TaqMan Assay による <i>let-7</i> microRNA 定量	11
DNA マイクロアレイ解析	11
GeneSpring を用いた遺伝子発現データ解析	12
JC-1 染色、CellROX 染色、および ATP アッセイ	12
JC-1 色素の子宮内への注入	13
GO-ATeam2 および SCAT3 を用いたライブイメージング解析	13
ウエスタンブロッティング	13
酵素活性測定	14
¹³ C ₆ -glucose を用いた pathway tracing	15
ペントースリン酸経路の代謝産物測定	15
<i>Lin28a</i> の時期特異的な過剰発現	16
EpiSC の培養	16

研究結果

1. 器官形成初期胚で環境攪乱が脆弱性につながる機構の解明に向けて	
1-1. 神経管閉鎖期のミトコンドリア代謝状態の環境変化に対する脆弱性	17

1-2. エネルギー代謝亢進に伴う酸化ストレスが $\Delta\Psi_m$ 上昇を誘導する可能性	17
2. 器官形成初期胚で生じるエネルギー代謝状態変化の解明	
2-1. 哺乳類器官形成初期における解糖系および TCA 回路の活性亢進	19
2-2. 解糖系の流れが PFK-1/Aldolase の反応のところで減速する	20
2-3. グルコース代謝亢進に伴うグルコース流路の再編成	20
2-4. 神経管閉鎖運動に対する解糖系の必要性	21
3. 器官形成初期に生じるエネルギー代謝状態変化の制御因子の探索	
3-1. エネルギー代謝状態変化の候補制御因子 <i>Lin28</i>	22
3-2. <i>Lin28a</i> 過剰発現が哺乳類器官形成初期過程に与える影響の検討	23
考察	
1. 神経管閉鎖期胚において環境攪乱が発生異常に結びつく機構	25
2. シグナリングセンターの細胞のエネルギー代謝状態	26
3. 器官形成初期胚におけるエネルギー代謝状態変化と脆弱性との関連	27
4. エネルギー代謝状態再編成が器官形成初期過程に果たす役割	28
5. 器官形成初期胚における PFK-1/Aldolase 活性の制御	29
6. 器官形成初期に生じるエネルギー代謝状態変化の制御因子	30
7. エネルギー代謝による神経管閉鎖運動の制御機構	31
8. 器官形成初期における <i>Lin28a</i> の発現制御機構	32
9. 発生と代謝との関係解明に向けての今後の課題および展望	33
図表	35
参考文献	69
謝辞	81

背景と目的

1. 生命現象を規定する因子としての代謝

代謝は生命機能の維持に関わる一連の化学反応を指し、あらゆる生命現象の遂行に必須である。これまで細胞の代謝状態は、シグナル伝達や遺伝子発現変化の結果を単に反映しており、ハウスキーピング的役割を担うものと捉えられてきた。しかし近年、がん細胞／幹細胞を用いた代謝研究を中心に、細胞の代謝状態が逆にシグナル伝達や遺伝子発現等を制御しうることで報告されてきており、細胞の代謝状態による細胞機能の制御が着目されている (Lu and Thompson, 2012; Shyh-Chang et al., 2013a; Vander Heiden et al., 2009)。例えば、がん細胞は正常な分化細胞と異なり、酸素の有無にかかわらず嫌氣的呼吸（解糖系）に依存したエネルギー代謝状態をとる。この現象は古くからワーブルグ効果 (Warburg effect)、あるいは好氣的解糖系 (aerobic glycolysis) として知られていたものの (Warburg, 1956)、増殖の盛んながん細胞が酸化リン酸化 (OXPHOS: oxidative phosphorylation) よりも ATP 産生効率の劣る解糖系を積極的に用いる理由は長らく不明であった (解糖: 2ATP/glucose、酸化リン酸化: 36ATP/glucose)。しかし近年の代謝研究により、解糖系が核酸やアミノ酸などのバイオマス産生を効率良く進める上で OXPHOS よりも有利な代謝であることが示され、増殖の盛んながん細胞は自身の“代謝要求” (増殖のためのバイオマス産生) を満たすために解糖系依存的なエネルギー代謝状態をとると理解されるようになった (Anastasiou et al., 2011; Christofk et al., 2008; Lunt and Vander Heiden, 2011; Ward and Thompson, 2012)。また近年、エネルギー代謝に関わる代謝酵素や代謝産物が自らシグナル分子として機能する例も多く報告されており (Chang et al., 2015; Chang et al., 2013; Ho et al., 2015; Lee et al., 2015; Liu et al., 1996; Luo et al., 2011; Yang et al., 2011)、代謝酵素・代謝産物が代謝以外の側面で果たす新規機能 (moonlighting functions) も注目されている。例えば、解糖系酵素 GAPDH は T 細胞においてインターフェロン γ (IFN- γ) の翻訳制御に寄与しており、その機構として以下のことが報告されている。GAPDH は酵素活性に関わる触媒部位を介して IFN- γ mRNA に結合し翻訳抑制に働くが、活性化 T 細胞において解糖系亢進が生じると、GAPDH は基質とより相互作用するため IFN- γ mRNA の翻訳が亢進する (Chang et al., 2013)。以上の事実は、細胞の代謝

状態と細胞機能との間に密接な関係があることに加え、代謝関連分子が代謝とその他の生命現象とを結ぶ鍵分子として機能する可能性を示唆する。代謝は生命活動の根幹を担うことから、生命現象を代謝の側面から見直すことは生命現象の根幹の理解につながると考えられる (McKnight, 2010)。

2. 胚発生過程におけるエネルギー代謝制御

多細胞生物は細胞増殖・分化・移動等を介して1つの受精卵から生み出される。この複雑な胚発生過程において細胞の代謝状態が発生段階に応じて変化することは正常発生に必須であると考えられる (Agathocleous and Harris, 2013; Agathocleous et al., 2012; Johnson et al., 2003; Tennessen et al., 2011)。特に、哺乳類器官形成初期過程における胚のエネルギー代謝状態の制御は胚発生を支える上で重要と考えられる。第一に、原腸陥入完了に伴い始まる器官形成初期過程には神経管閉鎖 (neural tube closure: NTC) 等のダイナミックな形態形成運動が進行するとともに (Yamaguchi et al., 2011)、細胞数・細胞種の劇的な増加が生じる。第二に、この時期には卵黄囊膜-胎児循環が発達するとともに (マウス: 胎生 8.5-9.5 日)、絨毛尿膜循環 (CC: chorioallantoic circulation) の確立 (マウス: 胎生 8.5-10.5 日) が生じ、母体-胎児間での胎盤を介した栄養・ガス交換が始まるため、胎児の生育環境 (子宮内環境) が劇的に変化する (補遺 1) (Arora and Papaioannou, 2012; Lucitti et al., 2007; McGrath et al., 2003; Zohn and Sarkar, 2010)。以上のような内因性・外因性の変化と協調して細胞の代謝状態が変化することは正常発生に必須と考えられ、実際 OXPHOS に関わる遺伝子および代謝制御に関わる転写因子の変異体の多くは神経管閉鎖障害 (neural tube closure defects: NTDs) などの先天奇形を示し、この時期に胎生致死となることが知られている (Bamforth et al., 2001; Davis et al., 1993; Iyer et al., 1998; Larsson et al., 1998; Lindhurst et al., 2006; Zhou and Anderson, 2010)。原腸陥入完了から器官形成初期にかけて (マウス: 胎生 6-8 日、ラット: 胎生 10-14 日) 生じるエネルギー代謝状態変化は 20 世紀後半の古典的研究において盛んに調べられており、この時期に胚のエネルギー代謝状態の中心が解糖系から OXPHOS に変化することが報告されていた (Akazawa et al., 1994; Clough, 1985; Clough and Whittingham, 1983; Johnson et al., 2003; Tanimura and Shepard, 1970; Wales et al., 1995)。しかしながらこれらの先行研究は、*ex vivo* 培養系を用いた実験が中心であり、また解析技術の限界から細胞外へと排出される限られた代謝産物 (乳酸および二酸化炭素)

の量しか測定できていなかった。そのため古典的研究では *in vivo* における胚のエネルギー代謝状態を正確に評価出来ていない可能性があり、器官形成初期の胚で生じるエネルギー代謝状態変化の全貌解明にはより詳細な解析が必要であった。

3. 哺乳類器官形成初期胚の子宮内環境の攪乱に対する脆弱性

興味深いことに、哺乳類器官形成初期の胚は酸素・栄養条件といった周辺環境の攪乱に対して高い脆弱性を示す (Blom et al., 2006; Li et al., 2012; Yang et al., 2013; Zhao and Reece, 2013)。葉酸欠乏が NTDs の原因となることは有名であり (Blom et al., 2006)、他にも、母体糖尿病に起因する高グルコース条件に胚が暴露されると NTDs を含む先天奇形を高頻度で示すことが知られている (Li et al., 2012; Yang et al., 2013; Zhao and Reece, 2013)。また、全胚培養系と呼ばれる *ex vivo* 培養系において器官形成初期の胚は一定期間 (~4 日間) 正常発生を模倣するが (New, 1978)、それには酸素濃度の厳密な制御が必須である；本来低酸素環境下で発生する神経管閉鎖期の胚を高酸素条件下で培養すると NTDs を示す (Dunwoodie, 2009; Morriss and New, 1979)。

器官形成初期胚の環境攪乱に対する脆弱性にミトコンドリアのエネルギー代謝状態の変化が関わる可能性が先行研究で示唆されていた (Eriksson, 2009; Morriss and New, 1979; Yang et al., 1995)。例えば、高酸素条件下で培養した神経管閉鎖期胚のミトコンドリアは低酸素条件下で培養されたものに比して発達したクリステ構造を示す (Morriss and New, 1979)。また、高グルコース条件に曝された神経管閉鎖期胚のミトコンドリアも形態学的な異常を示すことが知られ、その原因としてミトコンドリアへの過剰な基質流入による酸化ストレスが考えられている (Eriksson, 2009; Yang et al., 1995)。器官形成初期胚において環境攪乱が発生異常につながるメカニズムの解明は生物学的・医学的に重要な課題であるものの、その詳細は未だ不明であり解明が待たれる。

4. 発生の時間軸を制御する *Lin28a/let-7* 経路

多細胞生物の胚発生過程において、細胞増殖・分化・移動が 3 次元の空間軸 (前後軸・左右軸・背腹軸) に沿って適切に起こることが重要である。一方、そういった空間軸に沿った発生イベントが時間軸 (発生タイミング) に沿って適切に制御されることも正常発生に必須である (Banerjee and Slack, 2002)。*lin-28*

は発生タイミングを制御するヘテロクロニック遺伝子として線虫 *C. elegans* において初めて同定された (Ambros and Horvitz, 1984)。線虫の幼齢期は L1–L4 の四つに別れ、それぞれの時期には特異的な細胞分裂・細胞分化のパターンが観察される。しかし、*lin-28* 変異体では L2 特異的な発生イベントを経ずに発生が進行してしまう (Ambros and Horvitz, 1984)。哺乳類には *lin-28* のホモログとして *Lin28a*、*Lin28b* の二つが存在し、分化多能性の制御に重要な役割を果たすことが知られている (Shyh-Chang and Daley, 2013; Tsalikas and Romer-Seibert, 2015; Yu et al., 2007)。Lin28 は RNA 結合タンパク質として様々な RNA に結合し、特に *let-7* microRNAs (miRNAs) との相互作用が有名である (Cho et al., 2012; Peng et al., 2011; Shyh-Chang and Daley, 2013)。Lin28 は *let-7* miRNAs と負のフィードバックループを形成し、線虫において発生タイミングの制御に寄与する。一方哺乳類においては、Lin28/*let-7* 経路は性成熟のタイミング制御に寄与するのみならず (Zhu et al., 2010)、がん原遺伝子や insulin–PI3K–mTOR 経路に関わる因子の発現を制御することで細胞のグルコース代謝を制御しうることが報告されている (Shyh-Chang and Daley, 2013; Shyh-Chang et al., 2013b; Zhu et al., 2011)。

それでは Lin28/*let-7* 経路は哺乳類発生過程においてどのような役割を果たしているのだろうか？*Lin28a* の胚での発現が大きく変化する時期に哺乳類器官形成初期がある；*Lin28a* が最初は胚全体で強く発現しているが（マウス胎生 8.5 日）、その後発生が進むにつれその発現が後部神経管へと限局していく（マウス胎生 10.5 日） (Balzer et al., 2010; Gurtan et al., 2013)。*Lin28a* 欠損マウス胚は形態学的な異常は示さないが、胎生 10.5 日の時点でグルコース代謝に異常を示し、その後は成長遅延を示し、生後 20 日ほどで致死にいたる (Shinoda et al., 2013)。一方、*Lin28a* および *Lin28b* を同時に欠損した個体は低頻度（約 30%）ながら NTDs を示し、胎生 12.5 日までに致死となることが報告されている (Shinoda et al., 2013)。しかしながら、Lin28 が器官形成初期過程において何を制御しているかは未だ不明であり、この点の解明は非常に興味深い。

5. 本研究の概要

本研究では、1) 神経管閉鎖期（マウス胎生 8.5–9.5 日）の胚において環境攪乱が発生異常につながるメカニズムの解明、および 2) 器官形成初期（マウス胎生 8.5–10.5 日）の胚で生じるエネルギー代謝状態変化の解明を目指した。課題 1 に関して私は、環境変化に応じたミトコンドリアエネルギー代謝状態の変

化が発生異常につながる可能性を見出した；生体内よりも高い酸素濃度に曝されると、神経管閉鎖期胚はグルコース代謝および ATP の産生を亢進させ、そういったエネルギー代謝の亢進に伴う酸化ストレスが神経板でのミトコンドリア膜電位上昇を引き起こす。また課題 2 に関して、私は CE-MS (capillary electrophoresis-mass spectrometry) を用いたメタボローム解析および安定同位体 (^{13}C) 標識グルコースを用いた pathway tracing を組み合わせることでエネルギー代謝状態変化の再評価を行った。その結果、器官形成初期には TCA 回路のみならず解糖系の活性も亢進することを明らかにした。さらに重要なことに、グルコース代謝亢進に伴い器官形成初期の胚が解糖系酵素 PFK-1/Aldolase の活性抑制を介して解糖系流路を再編成し、ペントースリン酸経路 (PPP) へのグルコース流量を増加させることも明らかにした。また器官形成初期に生じるエネルギー代謝状態再編成の生理的意義に関して、神経管閉鎖のライブイメージング解析を行うことで、解糖系の亢進が神経管閉鎖運動の進行に必須である可能性を見出した。さらに、この時期に生じるエネルギー代謝状態変化の制御因子候補として Lin28a に着目し、時期特異的な Lin28a の過剰発現が器官形成初期過程に与える影響を検討した。以上の成果は、遺伝学的要因によらない先天奇形の発症メカニズム解明につながる可能性があるのみならず、哺乳類器官形成初期における発生と代謝との関係解明を進める上での基盤となる重要な成果であると考えている。

材料と方法

マウス

実験に用いたマウスは、イメージング実験および *Lin28a* 過剰発現実験を除き全て ICR マウスである。ICR マウスは日本クレアから購入した。妊娠マウスは購入、または自家交配により得た。自家交配は東京大学薬学部南館 SPF 動物施設で行った。*GOATeam2* トランスジェニックマウス (遺伝学的背景: 129S1、C57BL/6j、および ICR の混合) は山本正道博士 (京都大学) からの供与である (論文投稿準備中)。*tetO-Lin28a* トランスジェニックマウス (Stock No.023910; 遺伝学的背景: C57BL/6) および *rtTA*M2* トランスジェニックマウス (Stock No.006965; 遺伝学的背景: C57BL/6 と 129S4 の混合) は Jackson 研究所から購入した。*rtTA*M2* トランスジェニックマウスに関しては ICR マウスと交配したものを実験に用いた。全ての動物実験は、東京大学の実験動物取り扱いガイドラインに従い実験動物の苦痛を最小限に抑える努力のもと行った。

胚の回収と固定

目的の発生ステージの胚を得るため、膣栓を確認した日を胎生 0.5 日とし、適切な日時に妊娠マウスの解剖を行った。胚の回収は氷冷 PBS 中で行った。回収した胚は、4°C、4% PFA/PBS 中で固定した。固定後、4°C、PBS により 5 分間の振とう洗浄を 3 回行った。免疫染色用の胚の固定時間は以下の通り: 胎生 8.5 日胚、1 時間; 胎生 9.5 日胚、1.5 時間; 胎生 10.5 日胚、3 時間。Whole mount *in situ* hybridization (WISH) 用の胚の固定時間は以下の通り: 胎生 8.5 日胚、2 時間; 胎生 9.5 日胚、3 時間; 胎生 10.5 日胚、一晚。その後、胚を PBS で洗浄しエタノールで置換し (25% EtOH/PBST、50% EtOH/PBST、75% EtOH/PBST の順で洗浄後 100% EtOH で 2 回置換)、WISH に用いるまで -20°C で保存した。WISH を行う際は 75% EtOH/PBST、50% EtOH/PBST、25% EtOH/PBST、PBST の順で液を置換し再水和した。

凍結切片の作成

固定した胚を 4°C、5% スクロース/PBS 中で内部がスクロースに置換されるまで浸透した。続いて 10% スクロース/PBS、15% スクロース/PBS、20% スクロース/PBS の順で同様に内部がスクロースに置換されるまで浸透した。最後に包埋皿

(Tissue-Tek クロオモルド1号) に O.C.T. Compound (SAKURA) を注ぎ、胚を入れたのち、ドライアイスで冷やしたヘキサンを用いて O.C.T. Compound を凍結させた。凍結したサンプルは、薄切するまで -80°C に保存した。サンプルはクリオスタット (CM3050 S、Leica) により薄切し、MAS コートスライド (松浪ガラス) に貼付けたのち、乾燥させた。すぐに免疫染色を行わない場合は、凍結切片をスライドボックスに入れ -80°C で保存した。使用時にはスライドボックスを室温まで戻し、乾燥させたのち開封した。

免疫組織学

凍結切片の免疫染色は、PBS により水和したのち、ブロッキング溶液 (20% イムノブロック、10% 血清 (二次抗体の宿主に応じた動物種) / TBST (20x TBST ; 5 M Tris-HCl (pH7.5)、3 M NaCl、4% Tween20)) で室温 1 時間ブロッキングした。続いてブロッキング溶液で希釈した一次抗体と 4°C 、一晚以上反応させた。PBS により室温 10 分間、4 回洗浄後、ブロッキング溶液で希釈した蛍光色素付き二次抗体と 4°C 、一晚以上反応させた。PBS で室温 10 分間、2 回洗浄したのち、ブロッキング溶液で希釈した $4\ \mu\text{M}$ Hoechst33342 (同仁化学) と室温で 15 分間反応させた後、再び PBS で室温 10 分間、3 回洗浄した。最後にゲルバトール (33% グリセロール、15% ポリビニルアルコール (ACROS ORGANICS) / PBS) を用いてサンプルを封入した。胚全体を用いた免疫染色は、PBS により水和した後、ブロッキング溶液で 4°C 、1 時間ブロッキングした。続いてブロッキング溶液で希釈した一次抗体と 4°C 、一晚以上反応させた。TBST により 4°C 、30 分間の振とう洗浄を 6 回行った後、ブロッキング溶液で希釈した蛍光色素付き二次抗体により 4°C 、一晚以上反応させた。最後に、TBST をもちいて 4°C 、30 分間の振とう洗浄を 6 回行った。用いた一次抗体・二次抗体およびその希釈率は以下の通り：抗 Aldolase a 抗体 (Rabbit ; Proteintech、11217-1-AP ; 1:1000、Can Get Signal Solution A (東洋紡) を使用)、抗 Cleaved Caspase-3 抗体 (Rabbit ; Cell Signaling、9661 ; 1:500)、抗 Lin28a 抗体 (Rabbit ; Cell Signaling : 3978 ; 1:500)、抗 PDH-E1 α -pSer293 (Rabbit ; Merck、AP1063 ; 1:500)、抗ウサギ Alexa488 標識抗体 (Goat ; Molecular Probes、A-11070 ; 1:500)、抗ウサギ Cy5 標識抗体 (Donkey ; Jackson Immuno Research、711-176-152 ; 1:500)。TUNEL 染色は *in situ* Cell Death Detection Kit (Roche) を用いて行った。画像取得は共焦点倒立顕微鏡 SP5 (Leica) あるいは共焦点倒立顕微鏡 SP8 (Leica) を用いて行った。

Whole-mount *in situ* hybridization (WISH)

Aldolase a cDNA を含むプラスミド (FANTOM クローン、8530401H18) を制限酵素 *Eco*47III (Takara) で線状化したのち、1 μ g を鋳型として *In situ* hybridization 用 RNA プローブを合成した。アンチセンス鎖およびセンス鎖の合成にはそれぞれ T3 RNA polymerase (Roche) および T7 RNA polymerase (Roche) を用いた。胚を 6% H_2O_2 /PBST でブリーチしたのち、タングステン針を用いて胚に穴を開け、その後 Proteinase K (10 μ g/mL; Roche) を用いて室温で透過処理 (胎生 8.5 日胚、5 分; 胎生 9.5 日胚、7 分; 胎生 10.5 日胚、10 分) をした。0.2% グルタルアルデヒド/4% PFA/PBS で再固定したのち、ハイブリダイゼーションバッファー (0.5% CHAPS、5mM EDTA、50% ホルムアミド、5% ヘパリン (Wako)、5 \times SSC (0.75M NaCl、75mM クエン酸ナトリウム、pH5.0)、1% SDS、0.2% Tween-20、50 μ g/mL yeast tRNA (Roche)) で置換後、RNA プローブ (0.5 μ g/mL) を含むハイブリダイゼーションバッファー中で 65°C、一晩振盪した。ハイブリダイゼーションバッファーで洗浄後、Wash A (50% ホルムアミド、5 \times SSC、0.5% CHAPS)、WashAB-1 (Wash A:Wash B = 2:1)、WashAB-2 (Wash A:Wash B = 1:2)、Wash B (50% ホルムアミド、5 \times SSC、0.1% CHAPS)、Wash C (0.2 \times SSC、0.1% CHAPS) の順で 65°C で洗浄した。ブロッキング溶液 (2% Blocking reagent (Roche)、10% ウマ血清、2mM レバミゾール/TBST) で置換したのち、抗 Dig 抗体 (Sheep; Roche、11093274910) 溶液で 4°C、一晩振盪した。2mM レバミゾール/TBST で洗浄後、基質液 (BM Purple AP Substrate; Roche) を用いて発色反応を行った。発色反応後、PBST (pH 5.5) で洗浄し、0.2% グルタルアルデヒド/4% PFA/PBS で再固定した。画像取得は実体顕微鏡 (Leica, MZ16F) およびデジタルカラーカメラ (Leica, DC480) を用いて行った。

リアルタイム PCR

目的の発生ステージの胚を得るため、臍栓を確認した日を胎生 0.5 日とし、適切な日時に妊娠マウスの解剖を行った。胚の回収は氷冷 PBS 中で行い、卵黄膜および羊膜を丁寧に取り除いた。得られた胚はエッペンチューブに移し、直ちに液体窒素をもちいて瞬間凍結した。サンプルは RNA の抽出を行うまで -80°C で保存した。Total RNAs の抽出は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて行い、RNA の濃度は Nano Drop (Thermo Scientific) を用いて測定した。PrimeScript RT reagent

Kit with gDNA Eraser (Takara)を用いて 100–200 ng の total RNA を鋳型に cDNAs を合成したのち、SYBR Premix Ex Taq™ II (Takara) を用いてリアルタイム PCR を行った。PCR 反応には LightCycler 480 (Roche) を用いた。用いたプライマーに関しては表 1 に記した。

TaqMan Assay による *let-7* microRNA 定量

Trizol (Invitrogen) および mirVana microRNA Isolation Kit (Ambion) を用いて Total RNAs を抽出したのち、TaqMan MicroRNA RT Kit (Applied Biosystems) を用いて 10 ng の total RNA を鋳型に cDNA を合成した。定量 PCR は TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) および LightCycler 480 を用いて行った。それぞれの *let-7* microRNAs の cDNA 合成/定量 PCR に用いた TaqMan プローブ (Applied Biosystems) は以下の通り : has-let-7a (Assay ID 000377)、has-let-7b (Assay ID 002619)、has-let-7c (Assay ID 000379)、has-let-7d (Assay ID 002283)、has-let-7e (Assay ID 002406)、has-let-7f (Assay ID 000382)、has-let-7g (Assay ID 002282)、has-let-7i (Assay ID 002221)。

DNA マイクロアレイ解析

RNA の品質確認は Agilent 2100 Bioanalyzer および RNA Nano Chips (Agilent) を用いて行い、RNA integrity number (RIN) の値が 7 以上のものをその後のマイクロアレイ解析に用いた。Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color (Agilent) を用いて 100 ng の total RNA を鋳型にラベル化 cRNA を合成した。ラベル化手順はメーカーの標準プロトコルに従った。ラベル化 cRNA を RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて精製したのち、ラベル化 cRNA の合成・収量・ラベル化効率 that 適切かどうかを Nano Drop (Thermo Scientific)、Agilent 2100 Bioanalyzer、および RNA Nano Chips を用いて評価した。次に、Gene Expression Hybridization Kit (Agilent) を用いてハイブリダイゼーションサンプルを調整し、Mouse GE 4x44K v2 Microarray (Agilent) 上で 17 時間ハイブリダイゼーションした。なお、ハイブリダイゼーションはハイブリダイゼーションチャンバ (Agilent)、ハイブリダイゼーションオープン (Agilent)、ハイブリダイゼーションオープンローター (Agilent) をもちいて行い、ハイブリダイゼーションオープンの温度およびハイブリダイゼーションオープンローターの回転数はそれぞれ 65°C、10rpm であった。ハイブリダイゼーション後、Gene Expression Wash Pack (Agilent) をもち

いてアレイスライドを洗浄したのち、Sure Scan Microarray Scanner (Agilent) をもちいてアレイスライドをスキャンした。アレイデータの数値化は Feature Extraction (Agilent) を用いて行い、解析は GeneSpring (Tomy Digital Biology) を用いて行った。

GeneSpring を用いた遺伝子発現データ解析

GeneSpring にマイクロアレイデータを取り込んだ後、以下の手順により遺伝子発現解析を行った。1) Flag の設定は Tomy Digital Biology の推奨に従った。2) 75 Percentile value を用いてサンプル間の補正を行った。3) Baseline 補正には全サンプルの平均値を用いた。4) 20 Percentile value 以下の遺伝子を解析から除外し、残った遺伝子の中で”Detected”あるいは”Not Detected”の Flag を持つ遺伝子を以降の解析に用いた。

JC-1 染色、CellROX 染色、および ATP アッセイ

膈栓を確認した日を胎生 0.5 日として適切な日時に解剖を行った。取り出した子宮は 37°C に温めた解剖用メディウム (10% FBS, 1% ペニシリン-ストレプトマイシン/OPTI-MEM) 中で解剖し、解剖中は温度の低下を避けるため、37°C のホットプレート (OMRON, FHP-450S) 上で解剖を行った。膜は羊膜を含め全ての膜を取り除き、胚全体が露出するようにした。取り出した胚を JC-1 (Molecular Probes; 最終濃度 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) あるいは CellROX (Molecular Probes, C10422; 最終濃度 2.5 μM) を含む培養液 (50% ラット IC 血清 (immediately centrifuged serum; Charles River) /OPTI-MEM) に移し、37°C の CO₂ インキュベーター中 (21% O₂) で染色を行った (JC-1 染色、30 分間; CellROX 染色、60 分間)。N-acetyl cysteine (NAC; Wako) の影響を評価する際は、上記の解剖・染色を 10 mM NAC 存在下で行った。その後、培養用メディウムを満たしたガラスボトムディッシュ (MatTek, P35G-0-14-C) に移し、共焦点倒立顕微鏡 SP5 (Leica) を用いて画像取得を行った。なお、画像の取得中も培養メディウムの温度が低下するのを防ぐため、顕微鏡上に設置したインキュベーター (TOKAI HIT, INUB-G2-GSI) で培養しながら画像取得を行った。インキュベーターの各種設定温度は以下の通りである。Top heater: 42.0°C、Stage heater: 39.0°C、Lens heater: 37.0°C、CO₂: 5%。ATP アッセイの際は、胚を上記の培養液に移し、37°C の CO₂ インキュベーター中 (21% O₂) で 90 分間培養した。培養直後に胚をペレットミキサー (Eppendorf)

で破碎し（胎生 7.5 日胚、2-3 匹/165 μ l；胎生 8.5 日胚、1 匹/180 μ l；胎生 9.5 日胚、1 匹/360 μ l）、ATP lite（PerkinElmer）を用いて胚あたりの ATP 含有量を定量した（それぞれのサンプルに関して duplicate をとった）。ATP 定量に用いた組織溶解液の量は以下の通り。胎生 7.5 日胚、胎生 8.5 日胚、75 μ l；胎生 9.5 日胚、30 μ l。

JC-1 色素の子宮内への注入

ペントバルビタールを用いて妊娠マウスを麻酔したのち、Femtojet（Eppendorf）およびガラスキャピラリー（GD-1；Narishige；先端径 4-5 μ m）を用いて JC-1 色素（25 μ g/mL PBS；0.1% Fast Green FCF 色素を含む）を子宮内に注入した（80-100 hPa）。注入用ガラスキャピラリーはマイクロピペット・プラー（サッター社；設定 Heat: 350、Fil: 4、Vel: 50、Del: 225、Pull: 150）、マイクロフォージ（Narishige）およびマイクロピペット・ベベラー（サッター社）を用いて作成した。手術終了 1 時間後に頸椎脱臼し、胚を子宮から取り出した後、共焦点倒立顕微鏡 SP5（Leica）を用いて観察した。

GO-ATeam2 および SCAT3 を用いたライブイメージング解析

ライブイメージングは当研究室で確立された方法に従って行った（Yamaguchi et al., 2011）。GO-ATeam2 は 488 nm アルゴンレーザーで励起し、EGFP（500-550 nm）および OFP (FRET)（560-650 nm）の蛍光波長を高速レゾナントスキャナー、HyD ディテクター、および HCX PL FLUOTAR 10 \times 対物レンズ（NA 0.3）を用いて同時に取得した。SCAT3 は 442 nm ダイオードレーザーで励起し、ECFP（452-505 nm）および Venus (FRET)（525-600 nm）の蛍光波長を高速レゾナントスキャナー、Photomultiplier (PMT) ディテクター、および 10 \times 対物レンズ（NA 0.3）を用いて同時に取得した。低酸素条件でイメージングを行う際は低酸素混合装置（Leica、MIGM01）を用いた。神経孔の長さの測定は Volocity（PerkinElmer）を用いて行った（Yamaguchi et al., 2011）。

ウェスタンブロッティング

プロテアーゼ阻害剤（cOmplete Protease Inhibitor Cocktail; Roche）入りの RIPA バッファー（Radioimmunoprecipitation buffer; 25 mM Tris-HCL (pH 7.6)、150 mM NaCl、1% NP40、1% デオキシコレート酸塩、0.1% SDS）を用いて胚からタン

パク抽出を行ったのち、BCA 法 (Thermo) を用いてタンパク定量を行った。細胞質分画と核分画との分離には NE-PER Nuclear Cytoplasmic Extraction Reagents (ThermoFisher) を用いた。胚抽出物 (総タンパク量: 2–4 μ g) を各ウェルに投入し、SDS-PAGE で分離後、Immobilon-P membrane (Millipore) に転写した。TBST (20 \times TBST: 0.5 M Tris-Hcl pH 7.5、3 M NaCl、4% Tween20) にスキムミルク (日本 BD; 最終濃度 4%) を加えた液中でメンブレンを室温で 1 時間ブロッキングした後、一次抗体・二次抗体に反応させた。一次抗体は 4°C で一晩反応させ、二次抗体は室温で 60 分間反応させた。化学発色には Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) を用いた。シグナルの検出には LAS 4000mini (GE ヘルスケア) を用い、画像の定量は ImageJ (NIH) を用いて行った。用いた抗体、およびその希釈率は以下の通り: 抗 Aldolase a 抗体 (Rabbit; Abcam: ab169744; 1:1000)、抗 Aldolase b 抗体 (Goat; Santa Cruz: sc-12063; 1:1000)、抗 Aldolase c 抗体 (Rabbit; Abcam: ab87122; 1:1000)、抗 β -Tubulin 抗体 (Mouse; Millipore: MAB3408; 1:1000)、抗 Histone H3 抗体 (Rabbit; Cell Signaling: 9715; 1:1000)、抗 Lin28a 抗体 (Rabbit; Cell Signaling: 3978; 1:1000)、抗 NDRG3 抗体 (Rabbit; Cell Signaling: 5846; 1:1000)、抗 Total OXPHOS 抗体 (Mouse; Abcam: ab110413; 1:1000)、抗ウサギ HRP 標識抗体 (Goat; Cell Signaling, 7074S; 1:2000)、抗マウス HRP 標識抗体 (Goat; Promega, W4028; 1:2000)、抗ヤギ HRP 標識抗体 (Donkey; Promega, V805A; 1:2000)。

酵素活性測定

PFK-1 および Aldolase の活性測定は先行研究のプロトコルを参考にして行った (Tian et al., 1998)。マウス胚 (胎生 8.5 日胚、18–22 匹/サンプル; 胎生 9.5 日胚、4 匹/サンプル; 胎生 10.5 日胚、1 匹/サンプル) をプロテアーゼ阻害剤 (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail; Roche) 入りの組織溶解液 (50 mM Tris-Acetate (pH 8.0)、10 mM dithiothreitol (DTT)、1mM EDTA、1mM EGTA) 100 μ l を用いて氷上で破碎したのち、4°C、20,000 \times g で 30 分間遠心し、上清を酵素活性測定に回収した。PFK-1/Aldolase 活性は共役酵素反応を用いたアッセイ系により測定した: フルクトース-6-リン酸 (フルクトース-1,6-二リン酸) は PFK-1 (Aldolase) によりフルクトース-1,6-二リン酸 (ジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) およびグリセルアルデヒド-3-リン酸) に変換されたのち、酵素混合液により DHAP へと変換される。生じた DHAP は GPDH によりグリセロール-3-

リン酸へと変換され、その際 NADH が NAD⁺に変換される。上記の反応は PFK-1 (Aldolase) により触媒される反応が律速段階となるため、NADH が NAD⁺に変換される効率を測定することで PFK-1 (Aldolase) の酵素活性を間接的に測定できる。NADH の NAD⁺への変換は NanoDrop を用いて 340 nm の波長の吸光度変化を測定することで評価した。組織破砕液を基質 (PFK-1 アッセイ : 1 mM ATP、1 mM D-フルクトース-6-リン酸、0.15 mM NADH ; Aldolase アッセイ : 2.5 mM D-フルクトース-1,6-リン酸、0.15 mM NADH) および酵素 (PFK-1 アッセイ : Aldolase、GPDH、TPI ; Aldolase アッセイ : GPDH、TPI) を含むバッファー (50 mM Tris-Acetate (pH 8.0)、2 mM Mg-Acetate (pH 8.0)) に加えたのち、340 nm の波長の吸光度の変化を測定した。全ての基質は Sigma から購入した。

¹³C₆-glucose を用いた pathway tracing

安定同位体 (¹³C) 標識したグルコース (¹³C₆-glucose ; ISOTEC) を胚に取り込ませる際には全胚培養系 (WEC) および妊娠マウスへの尾静脈注射を用いた。WEC を行う際は、37°C に温めた解剖用メディアウム中で卵黄膜が無傷の状態の胚を子宮から取り出した (大隅 et al., 1997)。取り出した胚を回転式胎児培養装置 (池本理科) を用いて 60–90 分間、50% ラット IC 血清を含む DMEM 中で前培養し、その後 ¹³C₆-glucose を最終濃度が 2 mg/mL となるように培養液に加え、さらに 60 分間培養した。培養後、氷上で冷やした PBS 中で卵黄膜および羊膜を取り除いた後、胚を液体窒素で瞬時に凍結した。¹³C₆-glucose を妊娠マウスに投与する際は個体あたり 24 mg 尾静脈注射し、60 分後に胚を回収し、液体窒素で瞬時に凍結した。凍結した胚は解析に用いるまで -80°C で保存した。細胞内代謝産物の抽出、および ¹³C 標識された細胞内代謝産物の CE-MS (capillary electrophoresis-mass spectrometry) による検出は先行研究にならって行った (Sugiura et al., 2014)。測定に用いた胚の匹数は以下の通り : 全胚培養系、胎生 8.5 日胚 : 4–6 匹 / サンプル、胎生 9.5 日胚 : 2–4 匹 / サンプル、胎生 10.5 日胚 : 1 匹 / サンプル ; 尾静脈注射系、胎生 8.5 日胚 : 7–16 匹 / サンプル、胎生 9.5 日胚 : 4–5 匹 / サンプル、胎生 10.5 日胚 : 2 匹 / サンプル。

ペントースリン酸経路の代謝産物測定

ペントースリン酸経路代謝産物の測定は ion-chromatography system (ICS-2000, ThermoFisher Scientific)と接続した orbitrap-type MS (Q-Exactive focus, ThermoFisher Scientific)を用いて行った。

Lin28a の時期特異的な過剰発現

tetO-Lin28a トランスジェニックマウス (♂) と rtTA*M2 トランスジェニックマウス (♀) を交配し、陰栓を確認した日を胎生 0.5 日として適切な日に 9-tert-Butyl Doxycycline (9-TB Dox ; Echelon) を個体あたり 0.25 mg 腹腔注射した。遺伝子型判定に用いたプライマーは以下の通り ; tetO-Lin28a、5'-GCA CAG CAT TGC GGA CAT-3'、5'-CCC TCC ATG TGT GAC CAA G-3'、および 5'-GCA GAA GCG CGG CCG TCT GG-3' (野生型、295 bp ; tetO-Lin28a、551 bp) : 5'-GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC-3'、5'-AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT-3'、および 5'-GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG-3' (野生型、650 bp ; rtTA*M2、340 bp)。

EpiSC の培養

EpiSCs は Oxford University (現 Case Western Reserve University) の Paul Tesar 博士からの分与 (Tesar et al., 2007)。EpiSC の培養に用いた EpiSC 培地の組成は以下の通り。50% DMEM/F12 GlutaMax (Gibco (Life Technologies))/50% NEUROBASAL Medium (Gibco (Life Technologies))/1×MEM NEAA(Gibco (Life Technologies))/1mM Sodium Pyruvate (Gibco (Life Technologies))/1% B-27 Supplement (Gibco (Life Technologies))/1% N2 Supplement (Gibco (Life Technologies))/0.1 mM 2-Mercaptoethanol (SIGMA)。未分化状態を維持する場合は、培養プレートを 5 μg/ml Fibronectin (R&D Systems)/PBS で 37°Cにおいて 20 分以上コートし、EpiSC 培地に 20 ng/ml Activin A (R&D Systems)および 10 ng/ml FGF2 (Wako)を加えたものを用い培養した。神経板様細胞へと分化誘導する際は、培養プレートを 0.1% gelatin (nacalai tesque)で 37°Cにおいて 2 時間以上コートし、EpiSC 培地を用いて培養した。培養はすべて 37°C、5% CO₂ 条件下で行った。

研究結果

1. 器官形成初期胚で環境攪乱が脆弱性につながる機構の解明に向けて

1-1. 神経管閉鎖期のミトコンドリア代謝状態の環境変化に対する脆弱性

神経管閉鎖期（胎生 8.5–9.5 日）胚が子宮内環境攪乱に対して脆弱性を示すことがこれまで知られていたものの、環境攪乱が脆弱性に結びつくメカニズムの詳細は不明であった。脆弱性にミトコンドリアのエネルギー代謝状態の変化が関与する可能性が先行研究で示唆されていたことから、私は神経管閉鎖期胚のミトコンドリアエネルギー代謝状態をミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) センサー JC-1 を用いた胚の染色により調べた。JC-1 は $\Delta\Psi_m$ 依存的にミトコンドリアに取り込まれ、低濃度時は単量体を形成し最大蛍光波長 527 nm の蛍光を発するが、ある一定濃度を超えると凝集体を形成し最大蛍光波長 590 nm の蛍光を発することから、両者の蛍光強度比 (JC-1 ratio) を調べることで $\Delta\Psi_m$ の高い細胞と低い細胞とを区別できる (Reers et al., 1995)。私は本学修士課程において、生理的条件よりも高い酸素条件下 (21% O_2 ; *ex vivo*) において胎生 8.5 日胚の神経板が非神経外胚葉領域よりも高い $\Delta\Psi_m$ を示すことを見出していた (宮沢、2013)。そこで私は本学博士課程において、胎生 8.5 日胚の神経板が *in vivo* においても高い $\Delta\Psi_m$ を示すかを調べる目的で胚の JC-1 染色を妊娠マウスの子宮内 (*in utero*) で行った。その結果、胎生 8.5 日胚の神経板領域は *ex utero* で JC-1 染色を行った場合と異なり低い $\Delta\Psi_m$ を示すことが明らかとなり (図 1、補遺 2)、胎生 8.5 日胚の神経板が *in vivo* においては低い $\Delta\Psi_m$ を示すことが示唆された。一方、胎生 8.0 日胚の神経板は *ex utero* (21% O_2) で JC-1 染色を行った場合も低い $\Delta\Psi_m$ を示すことを私は本学修士課程において見出していた (補遺 2) (宮沢、2013)。以上の結果をまとめると、神経板領域のミトコンドリアエネルギー代謝状態の環境変化に対する応答性が胎生 8.0–8.5 日にかけて上昇することが示唆される。

1-2. 代謝亢進に伴う酸化ストレスが $\Delta\Psi_m$ 上昇を誘導する可能性

次に、高酸素下での *ex vivo* 培養により神経板の $\Delta\Psi_m$ が上昇するメカニズムの解明を目指した。低酸素から高酸素への移行は虚血再灌流で見られるよう酸化ストレスにつながる可能性があることから (Chouchani et al., 2014)、私は酸化

ストレスと $\Delta\Psi_m$ との関係調べた。胚を抗酸化剤 N-acetylcysteine (NAC) で処理したところ、驚くべきことに胎生 8.5 日胚の神経板は低い $\Delta\Psi_m$ を示した(図 2)。この結果は、神経板での $\Delta\Psi_m$ 上昇が酸化ストレスにより誘導されることを示唆する。

それではなぜ高酸素下での *ex vivo* 培養は胎生 8.5 日胚において酸化ストレスにつながるのでしょうか？興味深いことに、胚を *ex vivo* (21% O₂) で短時間 (90 min) 培養したところ、胎生 8.5 日胚では胚の ATP 含有量が有意に増加した一方、胎生 7.5 日胚および胎生 9.5 日胚では ATP 含有量の有意な変化は起こらなかった(図 3A)。ATP 含有量の増加が組織特異的に起こるかを検討する目的で、FRET を利用した ATP センサー GOATeam を発現するトランスジェニックマウスを用いたライブイメージング解析を行った (Nakano et al., 2011) (Yamamoto et al., manuscript in preparation)。GOATeam はリンカー配列に ATP 合成酵素の ϵ -subunit を含み、ATP が結合すると立体構造の変化に伴い EGFP から OFP への FRET 効率 (GOAT ratio ; OFP/EGFP) 増加が生じる(図 3B)。イメージング開始直後 (t = 0 min)、胎生 8.5 日胚は全体的に低い ATP レベルを示したが、イメージング開始とともに (t = 28 min) ATP レベルが胚全体のレベルで上昇する様子が観察された(図 3B)。ATP 量の増加に組織間の差は観察されなかったものの、以上の結果は環境変化に応答したエネルギー代謝の亢進が酸化ストレスを誘導する可能性を示唆する。

そこで次に酸素濃度がグルコース代謝に与える影響を次の方法で評価した。全胚培養系を用いて胚を培養し、安定同位体 (¹³C) 標識グルコース (¹³C₆-glucose) の代謝過程を追跡 (pathway tracing) した。胎生 7.5 日胚は胚体サイズの小ささから解析には使用できなかった。高酸素条件下で、¹³C₆-glucose 由来の乳酸 (¹³C-labeled lactate) の産生が胎生 8.5 日胚で抑制傾向にあった一方、胎生 9.5 日胚および胎生 10.5 日胚では酸素条件の影響を大きく受けなかった(図 4A)。一方、¹³C₆-glucose 由来のクエン酸 (¹³C-labeled citrate) の産生は調べた全ての発生ステージの胚において高酸素条件下で促進された(図 4B)。胎生 8.5 日胚のミトコンドリア電子伝達系 (electron transport chain ; ETC) が機能的に未成熟であることが、私の本学修士課程の DNA マイクロアレイ解析から示唆されている(宮沢, 2013)。以上の結果をまとめると、高酸素条件下における $\Delta\Psi_m$ 上昇のメカニズムとして以下のモデルが考えられる(図 5)。酸素濃度の変化に応答して TCA 回路の亢進が生じると、NADH/FADH₂ の産生亢進が未熟な ETC の過負

荷を生む。この TCA 回路活性と ETC 活性の不均衡が酸化ストレスの産生につながり (Chandel et al., 1998; Formentini et al., 2012; Kaminski et al., 2012)、神経板での $\Delta\Psi_m$ 上昇を誘導する。

2. 器官形成初期胚で生じるエネルギー代謝状態変化の解明

2-1. 器官形成初期には解糖系および TCA 回路の活性亢進が生じる

上記の解析から、胎生 8.5 日胚は酸素条件などの生育環境の変化に敏感に反応して自身のエネルギー代謝状態を変化させることが明らかとなった。マウス器官形成初期には卵黄囊膜-胎児循環の発達および絨毛尿膜循環 (CC: chorioallantoic circulation) 確立が生じることから (補遺 1)、この時期には胎児の子宮内環境が大きく変化し、胚において内因性酸化ストレスおよびエネルギー代謝状態変化が誘導される可能性がある。実際、*in utero* で JC-1 染色を行った際、神経管閉鎖 (神経板の湾曲) が進行している胎生 8.5 日胚の中には高い $\Delta\Psi_m$ を神経板で示す個体も観察されている (図 6)。また、ATP センサー GOATeam 発現胚を解剖直後に観察したところ、胎生 9.0 日胚は胎生 8.5 日胚よりも高い ATP レベルを示すことが明らかとなった (図 7)。これらの結果は、絨毛尿膜融合に伴い胚のエネルギー代謝が亢進する可能性を示唆する。

そこで私は哺乳類器官形成初期の胚で生じるエネルギー代謝状態変化の解明を目指した。私は本学修士課程において、CE-MS (capillary electrophoresis-mass spectrometry) によるメタボローム解析を用いて細胞内代謝産物量の変化を網羅的に解析することで、マウス器官形成初期 (胎生 8.5-10.5 日) の胚において TCA 回路および解糖系の活性が亢進する可能性を見出していた (補遺 3) (宮沢、2013)。しかしメタボローム解析は定常状態にある代謝産物量を測定したものであるため、代謝経路活性を反映しない可能性があった。そこで私は本学博士課程において、 $^{13}\text{C}_6$ -glucose を用いた pathway tracing を *in vivo* で行うことにより、代謝経路活性の変化を直接評価した。 $^{13}\text{C}_6$ -glucose を尾静脈注射により妊娠マウスに投与し、それが胚において乳酸 (^{13}C -labeled lactate) およびクエン酸 (^{13}C -labeled citrate) へと変換される量を測定したところ、どちらの産生も胎生 8.5-10.5 日にかけて増加することが明らかとなった (図 8)。以上の結果から、

器官形成初期の胚では TCA 回路のみならず解糖系の活性も亢進することが明らかとなった。

2-2. 解糖系の流れが PFK-1/Aldolase の反応のところで減速する

器官形成初期に解糖系が亢進することと矛盾して、グルコースの流れが解糖系酵素 PFK-1 が触媒する反応のところで減速する可能性が本学修士課程のメタボローム解析の結果から示唆されていた（補遺 3）（宮沢、2013）。この可能性を検討する目的で解糖系酵素の PFK-1 および Aldolase の酵素活性変化を調べたところ、どちらの酵素活性も胎生 8.5-10.5 日にかけて半減することが明らかとなった（図 9A）。次に、定量 PCR により PFK-1 (*Pfkl*, *Pfkm*, *Pfkp*) および Aldolase (*Aldoa*, *Aldob*, *Aldoc*) の発現変化を確認した。PFK-1 に関しては 3 つのアイソザイムのうち *Pfkl* および *Pfkp* の発現のみが胎生 8.5-10.5 日にかけて有意に低下し一方、Aldolase に関しては全てのアイソザイムで有意な発現低下が見られた（図 9B）。器官形成初期胚では PFK-1 および Aldolase に関して *Pfkl* および *Aldoa* がそれぞれ主要なアイソザイムとして発現していることから、この結果は、この時期の胚における Aldolase および PFK-1 の活性制御に mRNA の発現制御が寄与することを示唆する。以上の結果から、器官形成初期胚では解糖系の流れが PFK-1/Aldolase が触媒する反応のところで減速することが明らかとなった。

Aldolase 活性が PFK-1 活性よりも早い発生ステージで抑制され、また、その活性抑制の程度も PFK-1 の活性抑制の程度よりも大きかったことから（図 9A）、Aldolase は解糖系の流れの制御に PFK-1 よりも大きく寄与することが予想される。そこで器官形成初期胚で主に発現する Aldolase のアイソザイムである *Aldoa* の発現変化を whole mount *in situ* hybridization により検討した。*Aldoa* は胎生 8.5 日胚においては全身で強く発現していたが、発生が進むにつれて胚の後方へと限局していき、胎生 10.5 日胚においては尾部、肢芽、および将来筋肉などの組織に分化する体節に限局して発現が見られた（図 10）。この結果は、器官形成初期胚において解糖系の流れが胚の前後軸にそって減速する可能性を示唆する。

2-3. グルコース代謝亢進に伴うグルコース流路の再編成

器官形成初期には解糖系の流れ（乳酸産生）が亢進することを考慮すると、上記の結果は、解糖系の流れが PFK-1 および Aldolase が触媒する反応を迂回し

ながら維持されること示唆する。解糖系代謝産物であるグルコース-6-リン酸を起点に始まる代謝経路であるペントースリン酸経路 (PPP) に着目したところ、PPP 代謝産物であるグルコース-6-リン酸およびセドヘプツロース-7-リン酸の量が胎生 8.5-9.5 日かけて有意に増加することが明らかとなった (図 11A)。解糖系代謝産物であるグリセルアルデヒド-3-リン酸 (GA-3-P) は PPP でも産生されることから、この結果は解糖系の流れが PPP を迂回しながら維持されることを示唆する。GA-3-P は CE-MS を用いたメタボローム解析で検出できていないものの (補遺 3)、以上の結果は、グルコース代謝の亢進が生じる器官形成初期には PFK-1/Aldolase の活性抑制を介して解糖系流路が再編成されることを示す (図 11B)。

解糖系の流れが維持されるにも関わらず GA-3-P 以降の解糖系代謝産物量が胎生 8.5-9.5 日にかけて減少する理由として、現在次の二つの可能性を想定している。一つ目は GA-3-P 以降の解糖系反応が亢進する可能性、そして二つ目は GA-3-P よりも下流の解糖系代謝産物を用いたバイオマス産生が亢進する可能性である。Pyruvate kinase (PK) は解糖系律速段階であるホスホエノールピルビン酸のピルビン酸への変換を触媒する酵素であり、M1 アイソフォーム (PKM1) は M2 アイソフォーム (PKM2) よりも高い酵素活性を持つことが知られている (Christofk et al., 2008)。PKM1 および PKM2 の遺伝子発現変化を特異的プライマーを用いた定量 PCR により確認したところ、PKM1 の発現が胎生 8.5-10.5 日にかけて有意に増加した一方で、PKM2 の発現は有意に低下した (図 12A ; 補遺 4)。この結果は器官形成初期に PK が触媒する反応が亢進することを示唆する。また CE-MS を用いたメタボローム解析の結果、グリセロリン脂質の原材料となるグリセロール-3-リン酸 (G-3-P)、およびグリシンの量が胎生 8.5-10.5 日にかけて有意に増加することが明らかとなった (図 12B)。G-3-P およびグリシンはそれぞれ解糖系中間代謝産物であるジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) および 3-ホスホグリセリン酸から合成されることが知られており (図 11B)、この結果は GA-3-P より下流の解糖系中間代謝産物を用いたバイオマス産生が器官形成初期に亢進する可能性を示唆する。

2-4. 神経管閉鎖運動に対する解糖系の必要性

グルコース代謝亢進が器官形成初期過程に果たす役割の解明を目指し、次に神経管閉鎖 (胎生 8.5-9.5 日) とエネルギー代謝との関連を神経管閉鎖のライブ

イメージング解析を用いて調べた。グルコース代謝の亢進が絨毛尿膜融合に引き続き起こることが示唆されていたので(図 7)、胎生 8.75 日胚(体節数 13-15)における神経管閉鎖運動に着目した。低酸素条件(5% O₂)と高酸素条件(21% O₂)とで神経管閉鎖の進行に大きな差はなかったことから(図 13)、以下の解析は 21% O₂ 条件下で行った。対象群では時間経過とともに神経孔の大きさが減少していく様子が観察された一方、解糖系阻害条件下では近接した神経孔の左右の縁が融合せずに解離してしまう様子が観察された(図 14A)。OXPHOS 阻害条件下では神経管閉鎖の進行に対象群と大きな違いは観察されなかった(図 14A)。神経管閉鎖の進行度合を定量する目的で神経孔の長さの経時変化を測定したところ、解糖系阻害条件下で神経管閉鎖の進行が有意に阻害されることがわかった(t = 294 min)(図 14B)。以上の結果から、解糖系亢進が神経管閉鎖の融合過程促進に寄与する可能性が示唆された。

3. 器官形成初期に生じるエネルギー代謝状態変化の制御因子の探索

3-1. エネルギー代謝状態変化の候補制御因子 *Lin28*

ヘテロクロニック遺伝子 *Lin28* は *let-7* microRNAs (miRNAs) と負のフィードバックループを形成し、この *Lin28/let-7* 経路は哺乳類成体においてグルコース代謝を制御する(Tsialikas and Romer-Seibert, 2015)。*Lin28a* 欠損変異体は胎生 10.5 日の時点でグルコース代謝に異常を示し、PFK-1 が触媒する反応よりも下流の解糖系代謝産物量が野生型に比べて有意に減少していることが先行研究で報告されており(Shinoda et al., 2013)、*Lin28a* が胚発生期のエネルギー代謝状態制御にも関与する可能性が示唆されていた。そこで私は、本研究で見出した器官形成初期に生じるエネルギー代謝状態変化に *Lin28* が関与する可能性を検討するため、まず初めに器官形成初期における *Lin28* の発現変化を詳細に調べた。定量 PCR によって *Lin28a* および *Lin28b* の発現変化を確認したところ、*Lin28b* の発現に関して胎生 8.5 日胚と胎生 9.5 日胚とで有意な差は観察されなかった一方、*Lin28a* の発現は胎生 8.5-9.5 日にかけて有意に低下した(図 15A)。*Lin28a* の発現低下はタンパク量レベルでも同様に確認された(図 15B、15C)。定量 PCR により成熟型 *let-7* miRNAs の発現量をあわせて確認したところ、*Lin28a* の発現低下に伴い成熟型 *let-7* miRNAs の発現が劇的に上昇することが明らかとなった

(図 15D)。以上の結果から、胎生 8.5-10.5 日において *Lin28a/let-7* 経路が大きく変動することが明らかとなり、*Lin28a/let-7* 経路が器官形成初期過程に生じるなんらかの発生イベントを制御している可能性が示唆された。

3-2. *Lin28a* 過剰発現が哺乳類器官形成初期過程に与える影響の検討

そこで次に、本研究で見出した哺乳類器官形成初期に生じるエネルギー代謝状態変化と *Lin28a/let-7* 経路との関連解明を目指した；ドキシサイクリン (Dox) 依存的に全身で *Lin28a* を過剰発現させることが出来る *tetO-Lin28a* トランスジェニックマウスを用いて (Zhu et al., 2010)、胎生 8.5-10.5 にかけて生じる *Lin28a* の発現低下を抑制したときの表現系解析を計画した (図 16A)。まず、*tetO-Lin28a:rtTA* 胚において Dox 依存的に *Lin28a* の発現が誘導できるかを定量 PCR およびウエスタンブロット解析により確認した。9-TB Dox (9-tert-butyl doxycycline) 投与から一日後の時点で *Lin28a* が mRNA レベルおよびタンパク質レベルできちんと過剰発現されていることが確認された (図 16B、16C)。この時、成熟型 *let-7* miRNAs の発現も胎生 10.5 日胚において *Lin28a* 過剰発現により抑制されていた (図 16D)。*tetO-Lin28a* のトランスジーンは *Colla1* locus に挿入されており、*Colla1* locus がクロマチン構造等により活性化されていない細胞では *Lin28a* の過剰発現が誘導されていない可能性があることから、*Lin28a* の免疫染色によってその発現パターンを確認した。胎生 10.5 日胚において、野生型では神経管の基底膜側の細胞で *Lin28a* の発現が観察された一方、*tetO-Lin28a:rtTA* 胚では表皮、間充織、および神経管全体で *Lin28a* の発現が観察された (図 17)。以上の結果から、*tetO-Lin28a:rtTA* マウスを用いることで器官形成初期の胚において時期特異的に *Lin28a/let-7* 経路を全身性に操作できることが確認された。

それでは時期特異的な *Lin28a* 過剰発現は器官形成初期胚の発生にどのような影響を与えるのであろうか？胎生 8.5 日および胎生 9.5 日に 9-TB Dox を投与し *Lin28a* を過剰発現した際の胎生 10.5 日胚での表現系を調べたところ、期待に反して、*tetO-Lin28a:rtTA* 胚と野生型胚とで顕著な形態学的差は観察されなかった (図 18A)。ただし胎生 10.5 日において、*tetO-Lin28a:rtTA* 胚は同腹子に比べ発生遅延 (少ない体節数) を示す割合が対象群 (野生型胚または *rtTA* 胚) に比べ高かった (野生型胚または *rtTA* 胚, 7.5% (4/53) ; *tetO-Lin28a:rtTA* 胚, 27% (7/26) ; 図 18B)。ただし発生遅延を示す割合は *tetO-Lin28a* のみを持つ個体でも対象群に比べ多く (*tetO-Lin28a* 胚, 19% (4/21) ; 図 18B)、発生遅延の原因が *Lin28a* の過

剰発現以外にある可能性は否定できない。そこで最後に、胎生 8.5 日および胎生 9.5 日に 9-TB Dox を投与し Lin28a を過剰発現した際の影響が胎生 10.5 日以降に現れる可能性を検討した。*tetO-Lin28a:rtTA* 胚が正常に産まれるかを確認したところ、*tetO-Lin28a:rtTA* 胚は顕著な形態学的異常を示すことなく産まれるものの、生後すぐに (Postnatal (P) 0) 致死となることが明らかとなった (図 18C)。興味深いことに、P0 において *tetO-Lin28a:rtTA* マウスの体重は対象群 (*rtTA* マウス) よりも有意に増加していた (図 18D)。

考察

本研究では、器官形成初期胚において環境攪乱が脆弱性に結びつく機構として、環境変化に応じたミトコンドリアエネルギー代謝状態の変化が関与する可能性を見出した（図 5）。また、器官形成初期に生じる胚のエネルギー代謝状態変化に関して、古典的研究では解糖系の抑制および TCA 回路活性の亢進が生じると報告されていたが、メタボローム解析を用いた本研究により、この時期には TCA 回路のみならず解糖系の活性も亢進することを明らかにした。さらに重要なことに、グルコース代謝亢進に伴い器官形成初期の胚が PFK-1 および Aldolase の活性抑制を介して解糖系流路を再編成することも明らかにし、古典的モデルを刷新する新規モデルを打ち出した（図 19）。以上の成果は、器官形成初期における代謝と発生の関係解明を進める上での基盤となるとともに、遺伝学的要因によらない先天奇形の発症機構解明につながる可能性のある重要な成果であると考えている。

1. 神経管閉鎖期胚において環境攪乱が発生異常に結びつく機構

本研究では、器官形成初期胚において環境攪乱が神経管閉鎖不全（NTDs: neural tube closure defects）などの発生異常につながる機構として、環境変化に応じたミトコンドリアエネルギー代謝状態変化が関与する可能性を見出した（図 5）。高グルコース条件および高酸素条件はどちらもミトコンドリアへの過剰なグルコース流入を引き起こし、神経管閉鎖期胚において酸化ストレスおよびミトコンドリア膜電位（ $\Delta\Psi_m$ ）の上昇を惹起すると予想される（Eriksson, 2009）。 $\Delta\Psi_m$ が高い状態は一般に酸化ストレスのリスクが高いと言われているから（Eriksson, 2009; Korshunov et al., 1997; Turrens, 2003）、環境攪乱による $\Delta\Psi_m$ 上昇は酸化ストレスの悪循環を生む可能性がある。糖尿病母体の胎児においては、そのような高グルコース条件により誘導される酸化ストレスの悪循環が神経上皮領域において Ask1-FoxO3-Caspase 8 経路を活性化し、異所的な細胞死が起こることで NTDs となると考えられる（Yang et al., 2013）。しかし興味深いことに、高酸素条件下では逆に細胞死が抑制されることが先行研究で示唆されている（Morris and New, 1979）。このことは、酸化ストレスが神経管閉鎖不全を誘導する機構が高グルコース条件の場合とは異なることを示唆する。酸化ストレスは

細胞分化を促進する例が報告されていることから (Mantel et al., 2015; Owusu-Ansah and Banerjee, 2009; Yanes et al., 2010)、高酸素下での培養が NTDs につながる一つの機構として、酸化ストレスが神経上皮細胞の早熟な分化 (premature differentiation) を誘導し、それが細胞運動性の低下につながるというモデルを現在考えている。

2. シグナリングセンターの細胞のエネルギー代謝状態

子宮内で胚の JC-1 染色を行った際、胎生 8.5 日胚の神経板領域が低い $\Delta\Psi_m$ を示した一方、非神経外胚葉と神経外胚葉との境界領域にあたる神経隆起領域 (NR: neural ridge) は高い $\Delta\Psi_m$ を示した (図 1)。NR は BMP や FGF、WNT といったモルフォゲンを産生することでシグナリングセンターとして機能することが知られており (Casparly and Anderson, 2003)、モルフォゲンとミトコンドリアのエネルギー代謝状態との関連は興味深い点である。古典的研究によりカエルのオーガナイザー領域 (原口背唇部) では解糖系活性が高いことが報告されており (Waddington, 1956)、高い $\Delta\Psi_m$ が NR 領域での高い解糖系活性を反映している可能性が考えられる。それではオーガナイザー領域での高い解糖系活性はどのような生理的意義をもつのであろうか? 解糖系活性の亢進が生じる例として、T 細胞が抗原刺激を受け、サイトカイン (IL-1 β 等) 産生を亢進させるときが報告されている (Tannahill et al., 2013; Wang et al., 2011)。オーガナイザー領域における解糖系亢進も同様に盛んな物質産生 (モルフォゲン産生) に重要である可能性が考えられる。また一方で、WNT の安定性、拡散能、受容体との相互作用の制御には、糖鎖修飾や脂質修飾といった翻訳後修飾が重要であることが知られていることから (Hacker et al., 2005; Miura and Treisman, 2006)、細胞のエネルギー代謝状態が翻訳後修飾の制御を介してモルフォゲン活性を制御している可能性も考えられる。

また神経管閉鎖期胚の NR ではプログラム細胞死の 1 つであるアポトーシスが多量に生じ、それが神経管閉鎖の円滑な進行に寄与することが報告されている (Nonomura et al., 2013; Yamaguchi et al., 2011)。しかしアポトーシスを誘導するトリガーは未だ不明であり、細胞のエネルギー代謝状態とアポトーシスとの関連は興味深い (Green et al., 2014)。この時期の NR 領域の細胞が生体内においても高い $\Delta\Psi_m$ を示すことを本研究では見出しており (図 1)、TCA 回路活性と ETC 活性との不均衡により生じる酸化ストレスが NR 領域のアポトーシスを誘

導している可能性が考えられる。抗酸化剤 NAC 処理によりアポトーシスが阻害される様子は観察されてなかった（補遺 5、6）。しかし、正常胚の ROS 色素による染色を行ったところ、核の凝集したアポトーシスした細胞および一部の生細胞においてシグナルが観察されており（補遺 7）、この結果は上の可能性を示唆する。

3. 器官形成初期胚におけるエネルギー代謝状態変化と脆弱性との関連

ミトコンドリア電子伝達系が機能的に未成熟な神経管閉鎖期の胚では、酸素濃度の変化に応じたエネルギー代謝状態の亢進が酸化ストレスおよび $\Delta\Psi_m$ の上昇につながる、というモデルを本研究では見出した（図 5）。このモデルは、胎児を囲む生育環境の攪乱が生じた際のエネルギー代謝状態変化に関してであったが、器官形成初期には卵黄囊-胎児循環（胎生 8.5-9.5 日）および胎盤（胎生 8.5-10.5 日）の発達に伴い胚への酸素・栄養供給増加が生じると考えられ、そのような子宮内環境変化が正常発生過程においても内因性の酸化ストレスおよびエネルギー代謝状態変化を誘導すると予想される。本研究では実際、胚の $\Delta\Psi_m$ （図 6）および ATP レベル（図 7）が正常発生過程においても胎盤接続に伴い上昇することを示唆する結果を得ている。近年、活性酸素種（ROS: reactive oxygen species）がシグナル分子として機能することが様々報告されていることから（Le Belle et al., 2011; Mantel et al., 2015; Muliylil and Narasimha, 2014; Owusu-Ansah and Banerjee, 2009）、胎盤接続に伴い生じる内因性酸化ストレスが細胞のエネルギー代謝状態以外にも細胞増殖、細胞分化、そして細胞の運動性を制御することで器官形成初期胚の発生に寄与している可能性も十分考えられる。

また、哺乳類器官形成初期の胚は胎盤接続に伴うエネルギー代謝状態の再編成を有利に進めるために、環境変化に対する自身のエネルギー代謝状態の応答性を高めていると考えることもできる。この応答性の変化が結果的に環境攪乱に対する脆弱性につながっている可能性も予想される。そのような脆弱性とエネルギー代謝状態変化との関連解明には、環境変化に対する応答性を規定する因子、あるいはエネルギー代謝状態変化の制御因子の同定が必須である。そのためには今回見出した $\Delta\Psi_m$ やエネルギー代謝状態の変化を模倣する *in vitro* 実験系の確立が有用と考えられる。例えば、胚盤葉上層（epiblast）由来の幹細胞 EpiSCs (epiblast stem cells) は血清を含まない化学合成培地中で培養可能であり、

また神経板様の細胞へと分化誘導することが出来ることから (Brons et al., 2007; Iwafuchi-Doi et al., 2012; Tesar et al., 2007)、EpiSCs を用いることで神経管閉鎖期胚の神経板で観察された $\Delta\Psi_m$ の変化を *in vitro* で模倣できる可能性がある。EpiSCs を神経板様の細胞へと分化誘導した時の解糖系遺伝子群の発現変化は定量 PCR で確認済みであるが (補遺 8)、 $\Delta\Psi_m$ の変化はまだ確認できておらず、今後確認する予定である。EpiSCs を用いて $\Delta\Psi_m$ の変化を再現できた場合は、shRNA や CRISPR/Cas-9 を用いた遺伝子操作を用いることで $\Delta\Psi_m$ 制御に関わる因子の探索が可能と考えている。

4. エネルギー代謝状態再編成が器官形成初期過程に果たす役割

器官形成初期には解糖系の抑制および TCA 回路活性の亢進が生じることが、*ex vivo* 培養系を用いた古典的研究で報告されていた。しかし、先行研究は解析技術の限界から胚体外に排出される二酸化炭素・乳酸の量しか定量出来ておらず、この時期に生じるエネルギー代謝状態変化の詳細は不明であった。本研究ではメタボローム解析を用いて器官形成初期胚の細胞内代謝産物の変化を網羅的に解析することで、1) TCA 回路のみならず解糖系の活性もこの時期に亢進すること、そして2) そのようなグルコース代謝の亢進に伴い PFK-1/Aldolase の反応を起点に解糖系流路の再編成が起こり、ペントースリン酸経路 (PPP) へのグルコース流入が増えることを見出した。それではこのようなグルコース代謝状態の再編成は器官形成初期過程にどのような役割を果たしているのだろうか？先行研究において、PPP 阻害剤に対する感受性が器官形成初期の胚で特に高いことが報告されていた (Chamberlain and Nelson, 1963; McCandless and Scott, 1981; Turbow and Chamberlain, 1968)。器官形成初期は劇的な胚体サイズ・細胞数の増大が生じるとともに細胞分化が大きく進行する時期にあたる。細胞分化に伴う OXPHOS 亢進は酸化ストレス、およびそれに起因する細胞死につながる可能性があることから、バイオマス産生に加え胚の抗酸化能を高めることが細胞分化を進める上で重要となる (L'Honore et al., 2014)。PPP は、脂質合成および細胞の酸化還元状態の制御に重要な NADPH の産生にのみならず核酸合成にも寄与していることから (Patra and Hay, 2014)、PPP 亢進はバイオマス産生および胚の抗酸化能の亢進に寄与することで器官形成初期の胚発生を支えると考えられる。

また近年、解糖系に関わる酵素・代謝産物がシグナル分子として機能することや (Chang et al., 2015; Chang et al., 2013; Ho et al., 2015; Lee et al., 2015; Luo et al., 2011; Yang et al., 2011)、人工性多能性幹細胞 (iPSCs: induced pluripotent stem cells) の誘導時にエネルギー代謝状態が幹細胞マーカーの発現変化に先立って変化することも報告されており (Folmes et al., 2011)、器官形成初期胚においても細胞のエネルギー代謝状態が物質産生や酸化還元状態の制御以外にも細胞分化プログラムなどの発生プログラムの制御に関与している可能性もある。例えばがん細胞を用いた系で、細胞内の乳酸が NDRG3 と呼ばれるタンパク質の安定化を介して Raf-ERK 経路を活性化し、血管形成を促進することが報告されている (Lee et al., 2015)。胚の血管形成は器官形成開始に伴い開始することから、本研究で見出した解糖系の亢進が NDRG3 安定化を介して胚の血管形成を促進している可能性も十分考えられる。実際、胎生 8.5-10.5 日にかけて胚の NDRG3 タンパク量が增加することを本研究では見出しており (補遺 9)、NDRG3 の蓄積が器官形成初期胚で果たす役割の解明は興味深い。

5. 器官形成初期胚における PFK-1/Aldolase 活性の制御

本研究では器官形成初期胚における解糖系流路の制御に PFK-1 および Aldolase の活性制御が寄与することを見出した。しかしこれらの解糖系酵素の活性は、PFK-1 反応以下の解糖系代謝産物量が劇的に減少する胎生 8.5-9.5 日にかけては大きく変化していない (図 9A)。酵素活性変化と代謝産物量変化のタイミングが一致しないことから、PFK-1 および Aldolase の活性がタンパク質レベル以外の制御を受けていることが示唆され、その一つの可能性としてアロステリックな制御がある。Aldolase のアロステリック制御はまだ報告がない一方、PFK-1 に関しては様々なアロステリック制御因子 (negative regulator: クエン酸、ATP、positive regulator: フルクトース-2,6-リン酸) が知られ、特にフルクトース-2,6-リン酸 (F-2,6-BP) は PFK-1 活性の制御に大きく寄与している (Mor et al., 2011)。F-2,6-BP は 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB) と呼ばれる酵素により合成および分解の両方を制御されている。哺乳類には PFKFB1-4 が存在し、そのうち PFKFB3 はフォスファターゼ活性よりもキナーゼ活性が強く、F-2,6-BP の合成に主に働く。また、F-2,6-BP は TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator) と呼ばれる酵素による分解を受けることが知られ、細胞内 F-2,6-BP 濃度の制御にはこれらの酵素が主要な役割を果たしている。

PFKFB および TIGAR の mRNA 発現が胎生 8.5-9.5 日にかけて大きく変化するという結果は定量 PCR を用いた解析では得られていないものの (補遺 10)、PFKFB3 の発現は転写制御以外にもメチル化による翻訳後制御も受けることが報告されており (Yamamoto et al., 2014)、器官形成初期胚においても同様の制御が働いている可能性が考えられる。またアロステリック制御以外の活性制御機構として、解糖系酵素の細胞内局在の変化が関与している可能性がある。例えば糖新生に関わるグルコキナーゼは飢餓時に核に隔離されることで不活性化されることが知られており (Agius, 2008)、解糖系酵素も同様の制御を受けている可能性がある。Aldoa は細胞質のみならず核にも局在することが知られていたことから (Mamczur et al., 2013)、胎生 8.5 日胚および胎生 9.5 日胚における Aldolase の細胞内局在を調べたところ、胎生 8.5-9.5 日にかけて Aldoa の核への局在が増える傾向が本研究で観察されている (補遺 11)。この結果は示唆的であり、解糖系酵素の細胞内局在の制御が器官形成初期における解糖系活性の変化に重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

6. 器官形成初期に生じるエネルギー代謝状態変化の制御因子

哺乳類器官形成初期には、卵黄囊-胎児循環の発達および胎盤接続に伴い胎児を囲む子宮内環境が変化すると予想される。エネルギー代謝状態変化と子宮内環境変化が同時期に生じることから、胚のエネルギー代謝状態変化は単なる環境変化の結果であると考えられてきた (Akazawa et al., 1994; Clough, 1985; Clough and Whittingham, 1983; New, 1978)。実際、TCA 回路が高酸素条件下で亢進するという本研究の結果は上記の考えを支持する (図 4B)。しかし一方で、酸素条件によらず胎生 9.5 日胚が胎生 8.5 日胚よりも高い解糖系活性を維持するという結果は (図 4A)、器官形成初期胚のエネルギー代謝状態変化に環境変化という外因性要因以外にも発生プログラムという内因性要因が関与することを示唆する。環境要因と分化プログラムによるエネルギー代謝状態の制御を考える際、Aldoa の発現制御は興味深い。Aldoa を含む様々な解糖系酵素群の遺伝子発現は低酸素応答因子 (Hif1 α) による転写制御を受けることは有名であり (Denko, 2008; Iyer et al., 1998)、胎盤接続に伴う酸素供給増加が Hif1 α を介して Aldoa の発現抑制に寄与している可能性がある。また一方で、発生に伴う Aldoa mRNA の発現変化が胚の頭尾軸にそって進行する様子が観察されており (図 10)、頭尾軸にそって進む細胞分化プログラムが Aldoa の発現制御に寄与している可

能性も考えられる (Stern et al., 2006)。胎生 8.5-10.5 日には幹細胞の多能性制御に重要な *Lin28a* の発現も胚の頭尾軸にそって大きく変化することが先行研究で報告されていたことから (Balzer et al., 2010)、本研究では *Lin28a* により制御される発生プログラムに着目して研究を進めた。解糖系遺伝子群の mRNA 発現に関して、*Lin28a* を過剰発現した胎生 10.5 日胚と対象群とで顕著な差は観察されていないものの (補遺 12)、*Lin28a* は RNA 結合タンパク質として転写後制御に寄与することが報告されていることから (Cho et al., 2012)、プロテオーム解析やメタボローム解析を行うことで *Lin28a* とエネルギー代謝状態変化との関連について解析を進める予定である。

また器官形成初期に生じるエネルギー代謝状態の変化は組織レベル、あるいは胚全体のレベルで生じるのであろうか？この点を議論する上でも *Lin28a* および *Aldoa* の発現変化は興味深い。三胚葉形成が完了した胎生 8.5 日胚では細胞運命が *specify* された状態にあるにも関わらず、多能性獲得に必須な *Lin28a* は全身で強く発現しており、その後発生の進行に伴い胚の後方へと局限していく (Balzer et al., 2010)。また、成体において筋肉特異的に発現する *Aldoa* の発現に関しても、胎生 8.5 日胚では全身で強く発現しており、その後発現が胚の後方および将来筋肉などの組織に分化する体節に局限するようになる (図 10)。以上の事実を考慮すると、胚全体を用いたメタボローム解析により見出したエネルギー代謝状態変化は、細胞運命が *specify* された状態から *determine* された状態へと移行する際の全身性の変化を捉えている可能性があると考えられる。今後、組織ごとのエネルギー代謝状態変化を解析することが可能となれば、上記の可能性について検討可能と考えている。

7. エネルギー代謝による神経管閉鎖運動の制御機構

通常酸素条件下 (21% O₂) における実験であるが、本研究では神経管閉鎖の組織融合過程に解糖系が必須である可能性を見出した (図 14)。解糖系による神経管閉鎖制御の機構として現在、細胞のアクチン骨格系の制御を想定している。先行研究において、中脳領域の神経板の左右端が接着する際、左右の非神経外胚葉領域の細胞が細胞突起を伸ばし、それらが互いに結合することで神経板の左右端が結合していくこと様子 (“buttoning-up”) が観察されている (Pyrgaki et al., 2010)。解糖系が細胞のアクチン骨格系を制御することは血管内皮細胞の *sporouting* に関する研究で報告されており (De Bock et al., 2013)、非神経外胚葉

領域の細胞においても解糖系がアクチン骨格系の制御に関与している可能性がある。現在この可能性に迫るべく、より高倍のレンズを用いた神経管閉鎖のライブイメージング解析を計画している。

また、リン酸化型ピルビン酸脱水素酵素 (pPDH; phosphorylated-PDH E1 α subunit) の免疫染色を胎生 8.5 日胚で行ったところ、神経外胚葉領域よりも非神経外胚葉領域で強いシグナルが観察された (**補遺 13**)。ピルビン酸脱水素酵素は解糖系代謝産物の TCA 回路への流入を制御する酵素であり、ピルビン酸のアセチル CoA への変換を触媒する。その活性は PDKs (pyruvate dehydrogenase kinases) によるリン酸化により負に制御されており (Harris et al., 2002)、上の結果はグルコースの TCA 回路への流入が非神経外胚葉領域よりも神経外胚葉領域で多いことを示唆する。本研究では、未熟なミトコンドリア電子伝達系への過負荷が酸化ストレスにつながる可能性を見出しており、この結果は神経外胚葉領域では ROS の産生が起りやすい状態になっていることを示唆する。重要なことに、Rho キナーゼ (ROCK) を介した ROS による細胞骨格系の制御がショウジョウバエ背側融合過程 (dorsal closure) の促進に寄与することが先行研究で報告されている (Muliylil and Narasimha, 2014)。よって、神経外胚葉領域においても ROS が細胞骨格系の制御を通じて神経管閉鎖の促進に寄与している可能性が考えられる。

8. 器官形成初期における Lin28a の発現制御機構

本研究では器官形成初期に生じるエネルギー代謝状態変化の制御因子候補として Lin28a に着目して研究を進めた。Lin28 の発現制御の機構として、*let-7* microRNAs (miRNAs) による負の制御が良く知られているものの (Tzialikas and Romer-Seibert, 2015)、*tetO-Lin28a* トランスジェニックマウスを用いた Lin28a の過剰発現実験において、成熟型 *let-7* miRNAs の量がきれいに抑制されているにもかかわらず、内因性の Lin28a の発現が発生ステージの進行に従って低下する様子が観察されている (**図 16C**)。この結果は、器官形成初期胚における Lin28a の発現が *let-7* miRNAs 以外の分子による制御を受けていることを示唆しており、その候補分子として c-Myc を現在想定している。ヒト ES 細胞由来の神経幹細胞を用いた神経分化誘導系において、Myc が Lin28a の発現を正に制御しうることが報告されている (Xie et al., 2014)。本学修士課程に行った DNA マイクロアレ

イ解析において、胎生 8.5-10.5 日にかけて cMyc の発現が低下する様子が観察されており、この結果は上記の可能性を示唆する。

9. 発生と代謝との関係解明に向けての今後の課題および展望

細胞の代謝状態はハウスキーピング的役割を担うという認識が強く、生命現象の制御を考える際に長らく見過ごされてきたものの、近年のがん細胞および幹細胞を用いた代謝研究が契機となり、細胞の代謝状態による生命現象の制御が注目されるようになった (McKnight, 2010)。しかしこれまでのところ、そのような代謝研究は培養細胞を用いた *in vitro* 実験系のものがほとんどであり、本研究のように *in vivo* における細胞のエネルギー代謝状態変化に着目した研究はほとんどない。そのため細胞の代謝状態が *in vivo* においてどのように生命現象と協調して変化するかはほとんど不明であり、今後 *in vivo* における代謝と生命現象との関係解明が求められる (Agathocleous and Harris, 2013)。ただし、この点に迫るためには細胞の代謝状態を時空間解像度をもって解析する技術が不可欠である。近年、遺伝学的な代謝プローブの開発に加え (Merrins et al., 2013; Nakano et al., 2011; San Martin et al., 2014; San Martin et al., 2013)、質量顕微鏡の技術が飛躍的に進歩していることから (Bailey et al., 2015; Hamilton et al., 2015; Steinhauser et al., 2012)、これらの技術を用いることで上記の課題に取り組むことが可能と考えられる。また代謝と生命現象との関係解明にはこのような解析技術の開発に加え、細胞の代謝状態を組織・時期特異的に操作することも求められる。生体内において細胞の代謝状態を時空間特異的に操作することは未だ技術的に困難であることから、生体内の現象を模倣する *in vitro* 培養系の確立が必須である。近年、マウス胚発生過程の体節形成を無血清の化学合成培地中で再現することの出来る系が開発されており (Lauschke et al., 2013)、そのような生体内の発生現象を模倣する *in vitro* 培養系の開発が進めば、今後の発生と代謝の研究は飛躍的に前進すると期待される。

また本研究では、発生期における胎児のエネルギー代謝状態変化のみに着目して研究を進めてきたが、胎児とそれ以外の組織との間での代謝相互作用も今後の研究テーマとして興味深い。例えば、胎盤発達以前の時期において胚への物質供給を担う卵黄膜が、器官形成初期においては胚よりも TCA 回路依存的なエネルギー代謝状態をとることが本研究で示唆されているが (補遺 14)、卵黄膜のエネルギー代謝状態が胎児の代謝要求に応じて変化することが正常発生に

寄与している可能性がある。また妊娠期には、母体組織の生理状態（組織サイズやエネルギー代謝状態）が劇的に変化することも報告されており（Bustamante et al., 2010; Gielchinsky et al., 2010; King, 2006）、母体組織－胎児間の代謝相互作用も正常発生に重要な役割を果たしていると考えられている。今後、細胞の代謝状態を一つの組織に限定するのではなく、生命体全体の中で捉えるような研究も行っていきたいと考えている。

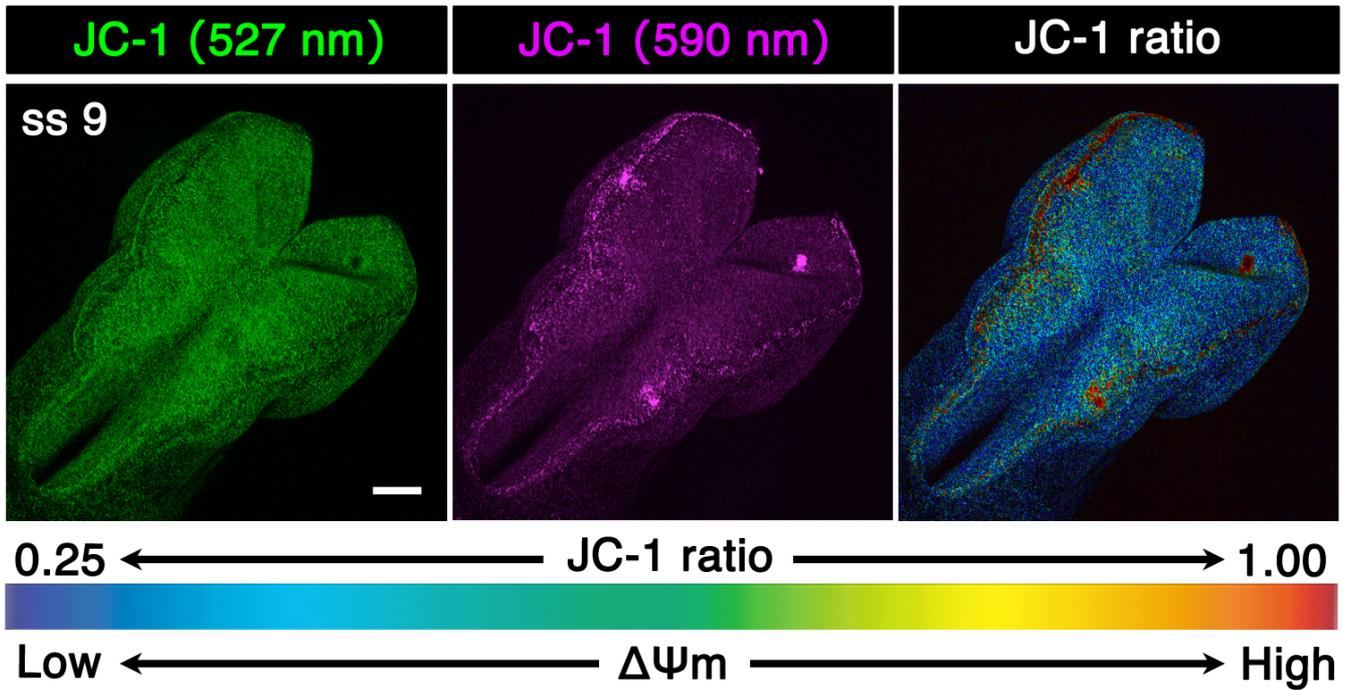


図1. 胎生8.5日胚の神経板は*in vivo*では低いミトコンドリア膜電位を示す

JC-1染色を*in utero*で行なった結果。胎生8.5日胚の神経板は、*ex utero*でJC-1染色を行なった場合と異なり低いミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) を示した。ただし、神経隆起領域は*in utero*でJC-1染色を行なった場合も高い $\Delta\Psi_m$ を示した。JC-1 ratio、JC-1蛍光 (590 nm)/JC-1蛍光 (527 nm)。Scale bar、100 μm 。ss: somite stage。

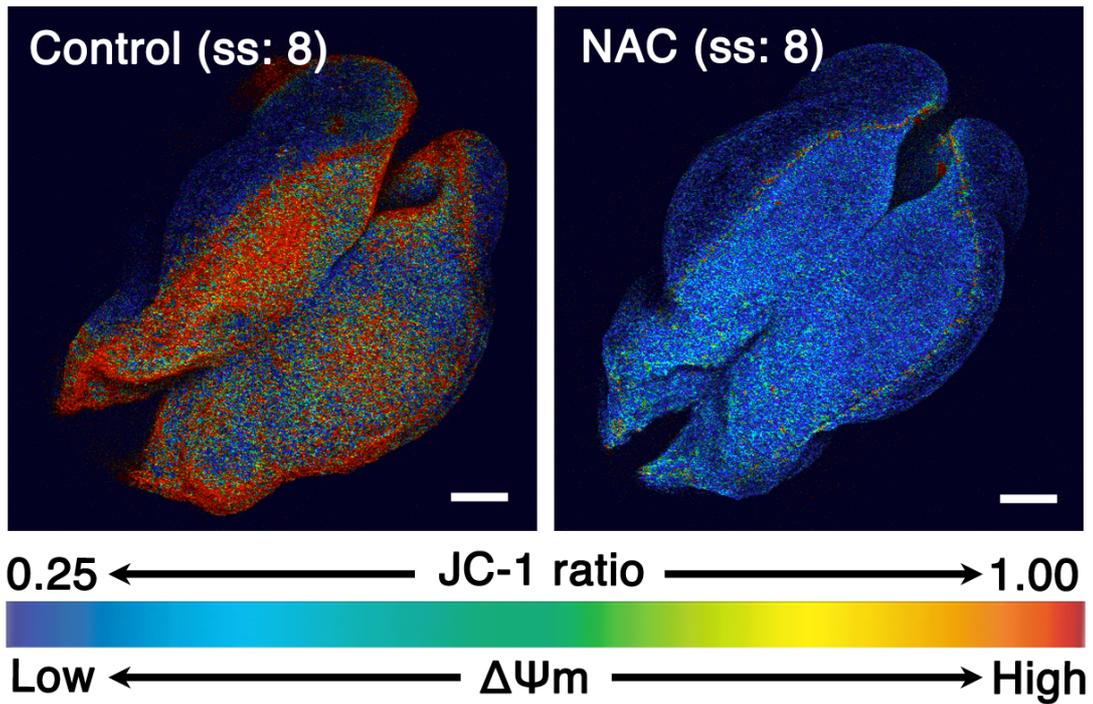


図2. 酸化ストレスがミトコンドリア膜電位の上昇を誘導する

N-acetylcysteine (NAC) 処理胚のJC-1染色 (*ex vivo*: 21% O₂) の結果。胎生 8.5日胚の神経板の $\Delta\Psi_m$ がNAC処理により抑制された。JC-1 ratio、JC-1蛍光 (590 nm)/JC-1蛍光 (527 nm)。Scale bar、100 μ m。ss: somite stage。

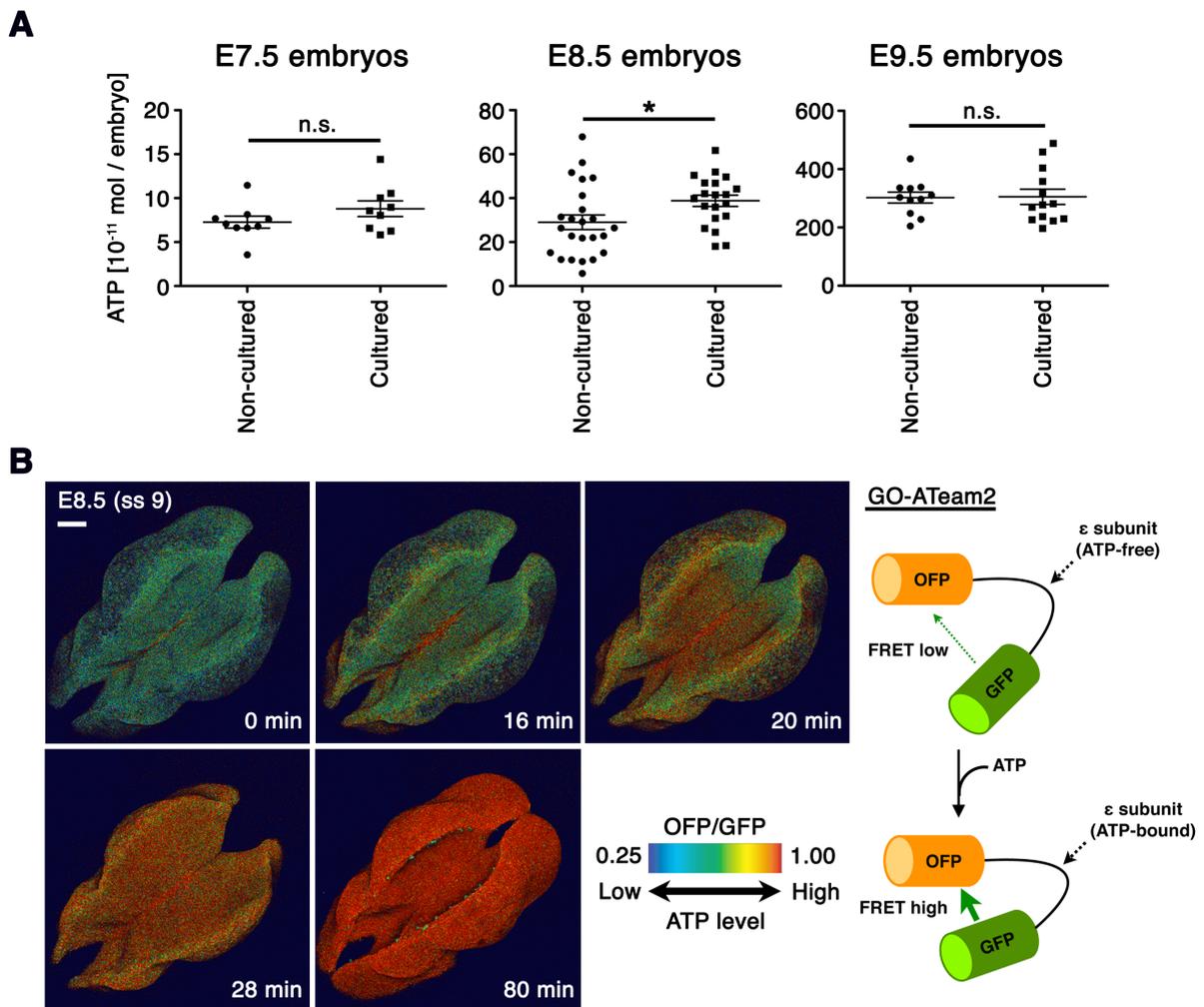


図3. 胎生8.5日胚は環境変化に応答してエネルギー代謝を亢進させる

(A) *ex vivo*培養が胚のATP含有量に与える影響。子宮から回収直後の胚 (non-cultured) と *ex vivo* (21% O₂)で90分間培養した胚 (cultured) のATP含有量を比較した。胎生8.5日胚では培養によりATP含有量が有意に増加した一方、胎生7.5日胚および胎生9.5日胚ではATP含有量の有意な変化は観察されなかった。(B) GO-ATeam2トランスジェニックマウスのライブイメージング解析。胎生8.5日胚 (somite stage (ss) : 9) は*ex vivo*培養時 (21% O₂) に胚全体のレベルでATPレベルを増加させた。Time interval、4 min。Scale bar、100 μm。

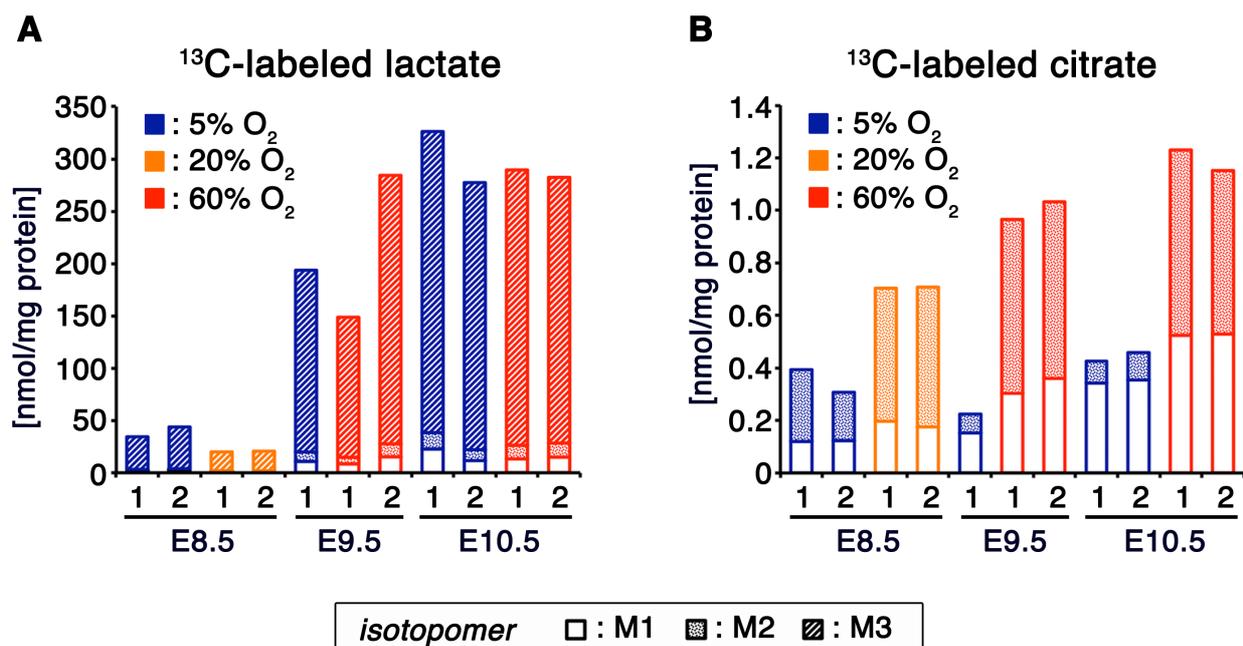


図4. グルコースのTCA回路の流入が高酸素下で促進された

異なる酸素条件下での $^{13}\text{C}_6$ -glucoseを用いたpathway tracing。全胚培養系を用い、 $^{13}\text{C}_6$ -glucose 存在下で60分間培養した。 $^{13}\text{C}_6$ -glucose由来の乳酸およびクエン酸の産生量を示しており、それぞれの棒グラフは独立したサンプルを表す。(A) 高酸素下で乳酸の産生が胎生8.5日胚で抑制された一方、胎生9.5日胚および胎生10.5日胚では抑制されなかった。(B) クエン酸の産生は全ての発生ステージの胚で高酸素条件で促進された。

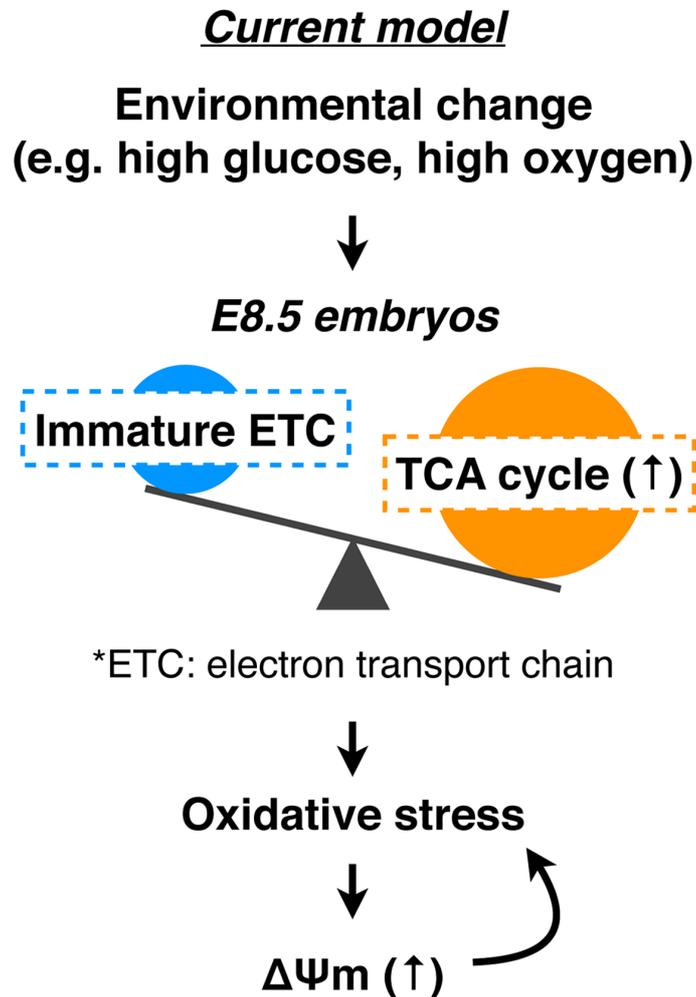


図5. 環境変化に伴うミトコンドリア膜電位上昇のモデル

環境変化に神経管閉鎖期胚が曝されるとTCA回路の亢進が生じ、NADH/FADH₂の産生亢進が未熟なミトコンドリア電子伝達系の過負荷を産む。その結果酸化ストレスが生じ、ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) の上昇が誘導されると考えられる。 $\Delta\Psi_m$ が高い状態は酸化ストレスのリスクが高いため、酸化ストレスの悪循環が生じる可能性が考えられる。

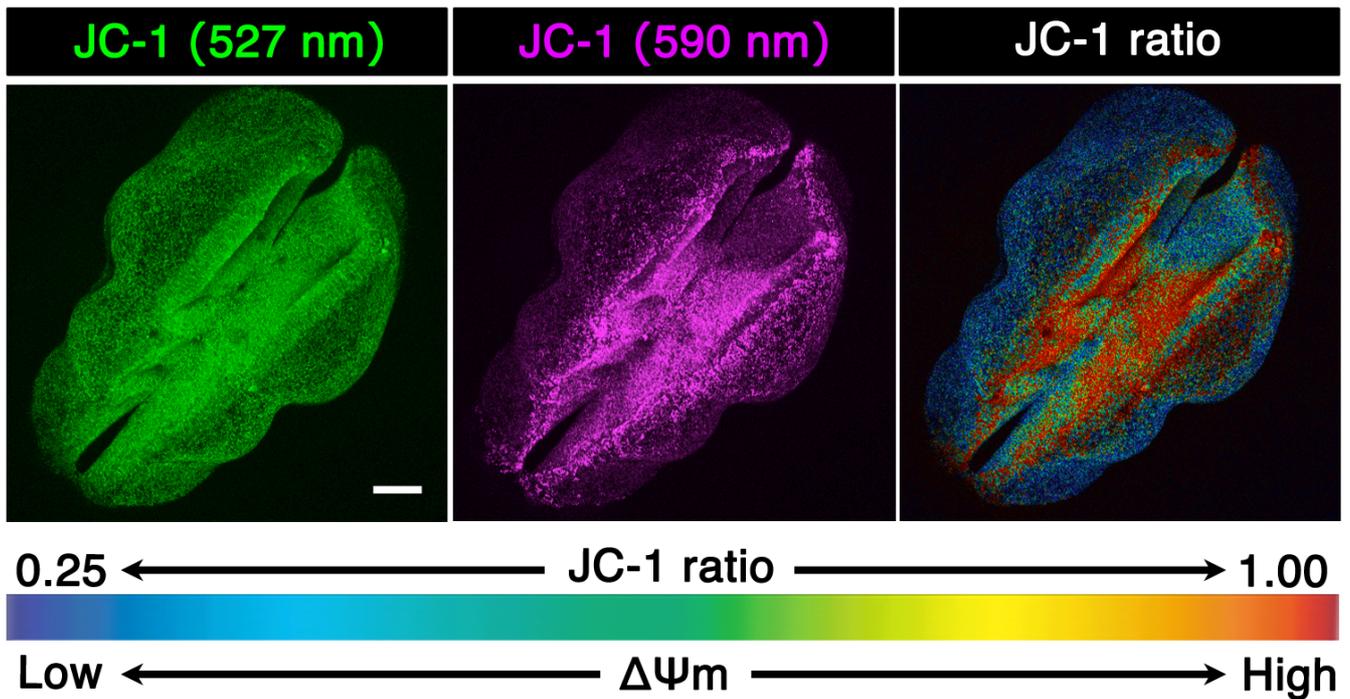


図6. 内因性酸化ストレスが神経板のミトコンドリア膜電位上昇を誘導する可能性がある

JC-1染色を*in utero*で行なった。神経板の湾曲が生じている胎生8.5日胚の中には、神経板で高いミトコンドリア膜電位を示す個体があった (n = 2/7)。JC-1 ratio、JC-1蛍光 (590 nm)/JC-1蛍光 (527 nm)。Scale bar、100 μm 。

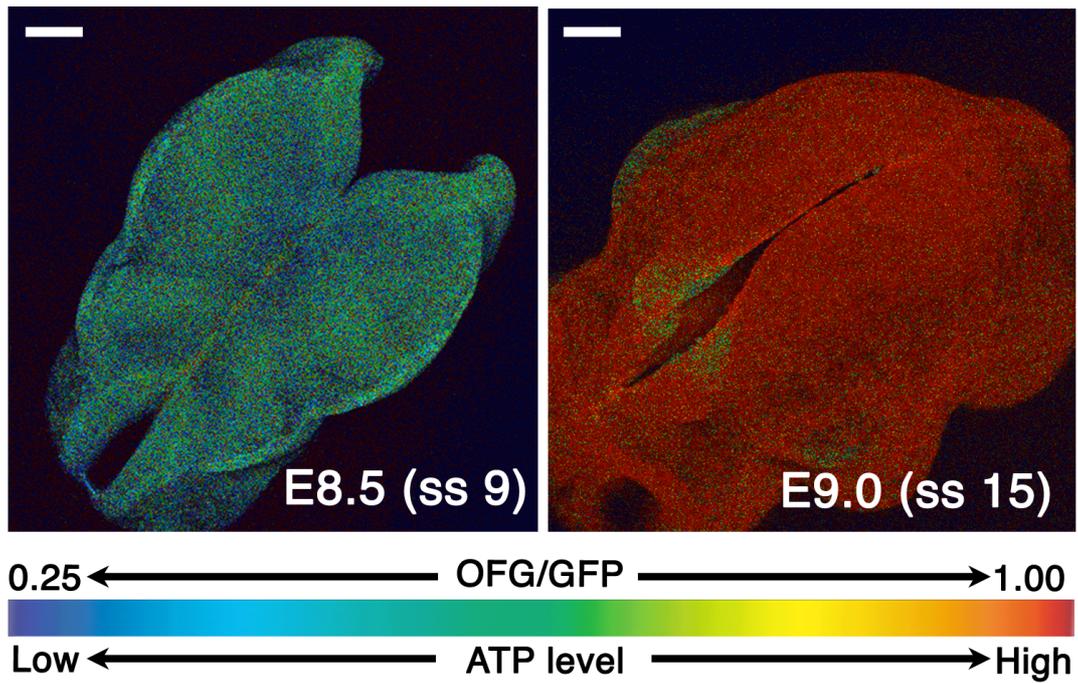


図7. 絨毛尿膜循環の確立に伴い胚のATPレベルが増加する

解剖後すぐのGOATeam発現胚のGOATeam ratio (OFG/GFP)。絨毛尿膜融合の完了した胎生9.0日胚は胎生8.5日胚よりも高いATPレベル (GOATeam ratio) を示した。Scale bar、100 μ m。ss: somite stage。

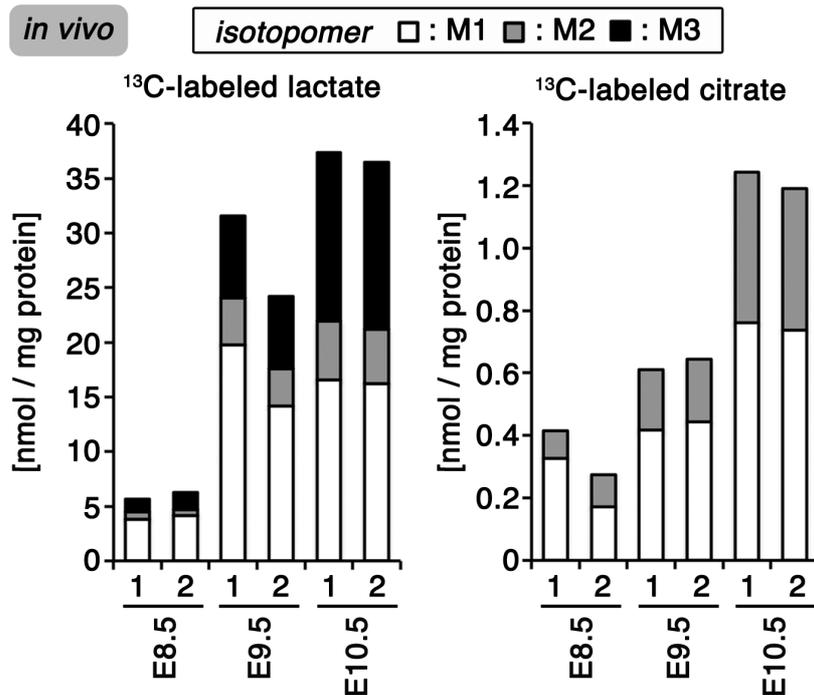


図8. 器官形成初期に解糖系およびTCA回路の活性亢進が生じる

*In vivo*での¹³C₆-glucoseを用いたpathway tracing。¹³C₆-glucoseを妊娠マウスに尾静脈注射し、60分後に胚を回収した。¹³C₆-glucose由来の乳酸およびクエン酸の産生量を表しており、それぞれの棒グラフは独立したサンプルを表す。乳酸およびクエン酸の産生量が胎生8.5-10.5日にかけて増加した。

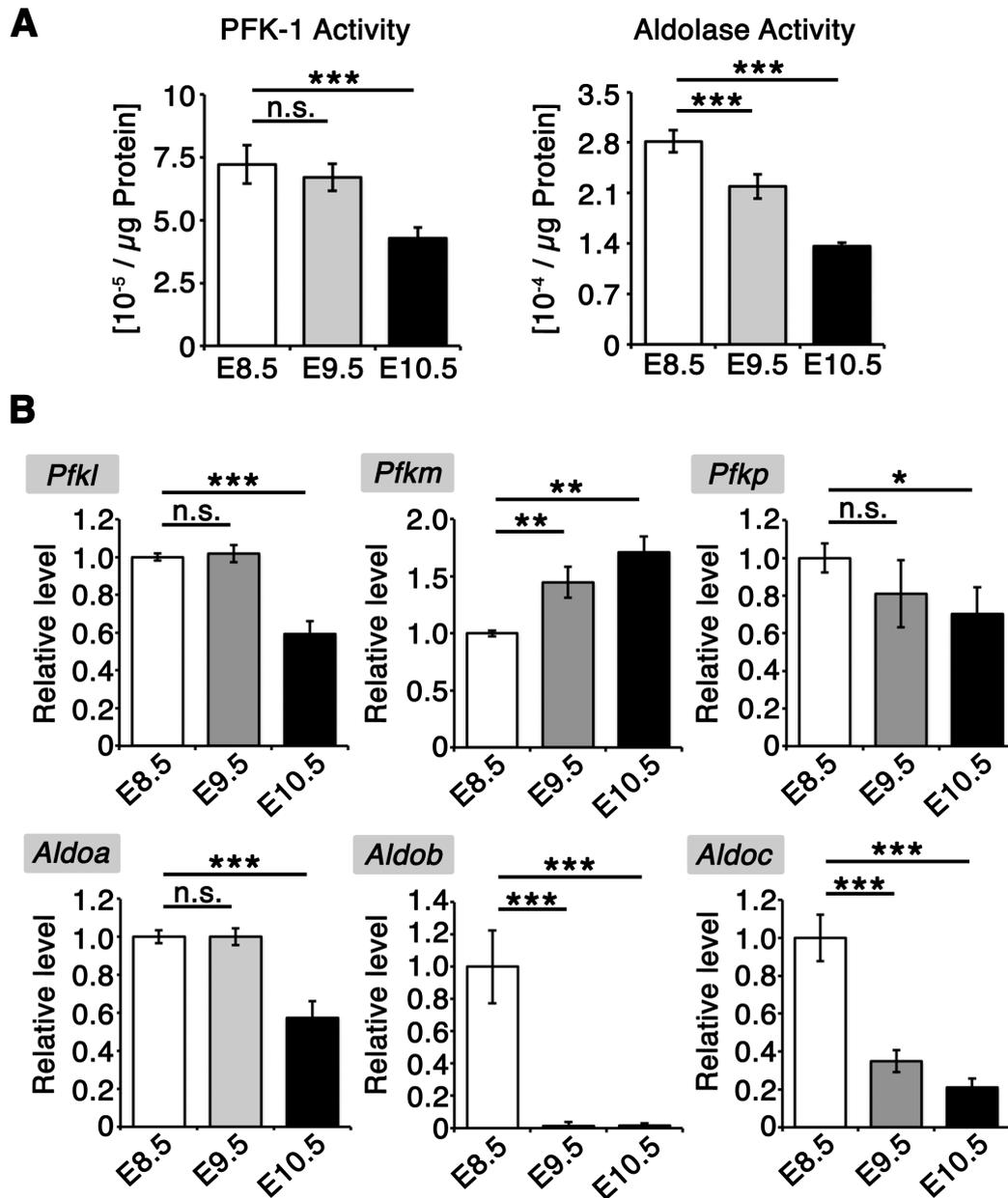


図9. 解糖系の流れがPFK-1およびAldolaseが触媒する反応で減速する

(A) 胚全体の溶解物を用いた PFK-1およびAldolaseの酵素活性評価。PFK-1およびAldolaseの酵素活性が胎生8.5-10.5日にかけて有意に減少した ($n = 7$; $***p < 0.001$ vs. E8.5; n.s., not significant; Welch's t-test; Data are represented as the mean \pm SD)。 (B) AldolaseおよびPFK-1の定量PCR。TBPを内部標準として用いた ($n = 4$; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ vs. E8.5; n.s., not significant; Welch's t-test; Data are represented as the mean \pm SD)。

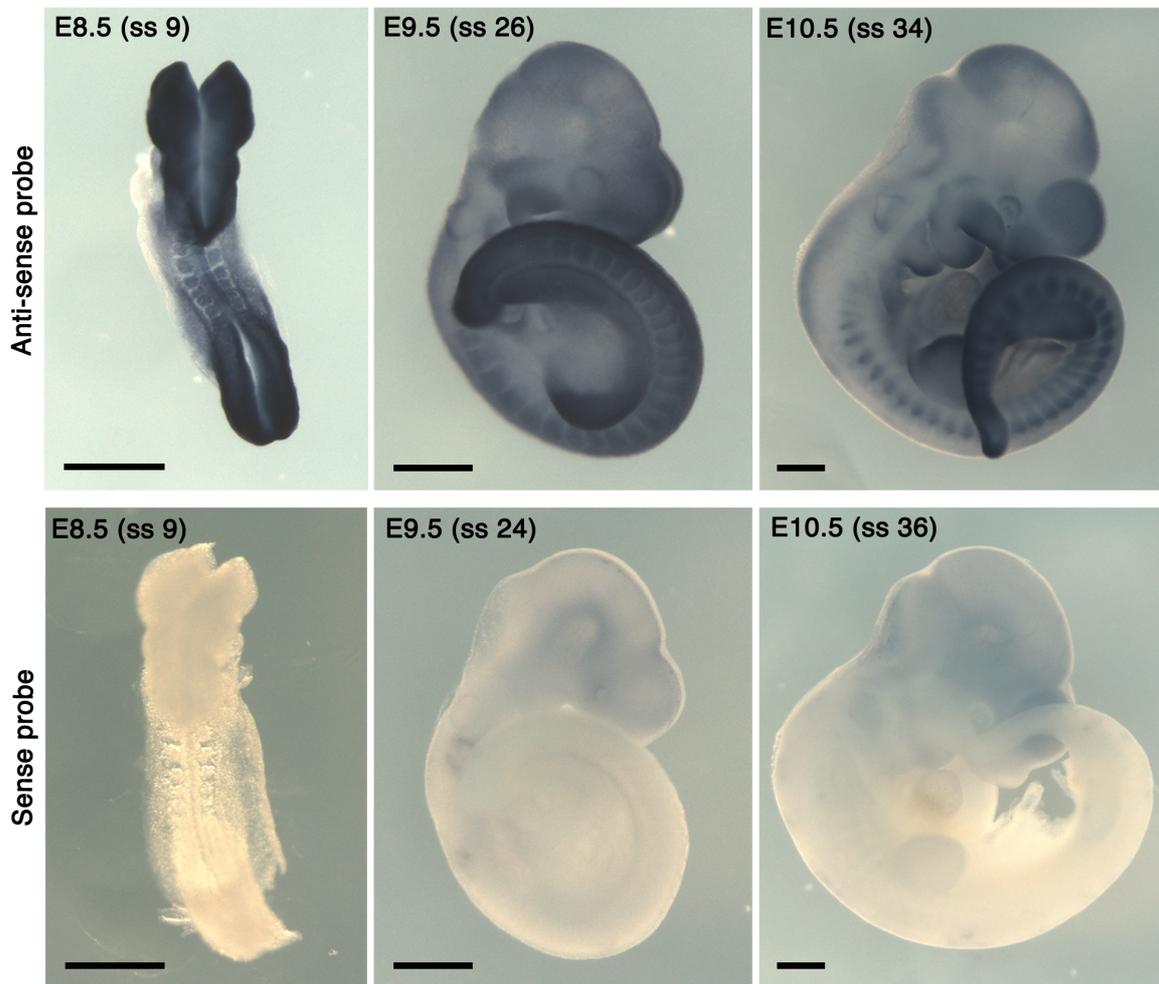


図10. Aldoaの発現が胎生8.5-10.5日にかけて胚の後方へと限局していく

*Aldoa*のwhole mount *in situ* hybridization。胎生8.5日胚ではAldoaが全身で強く発現していたが、発生の進行とともに胚の後方側へと限局していき、胎生10.5日胚では体節、肢芽、および胚の後方側で強い発現が見られた。Scale bar、500 μ m。ss: somite stage。

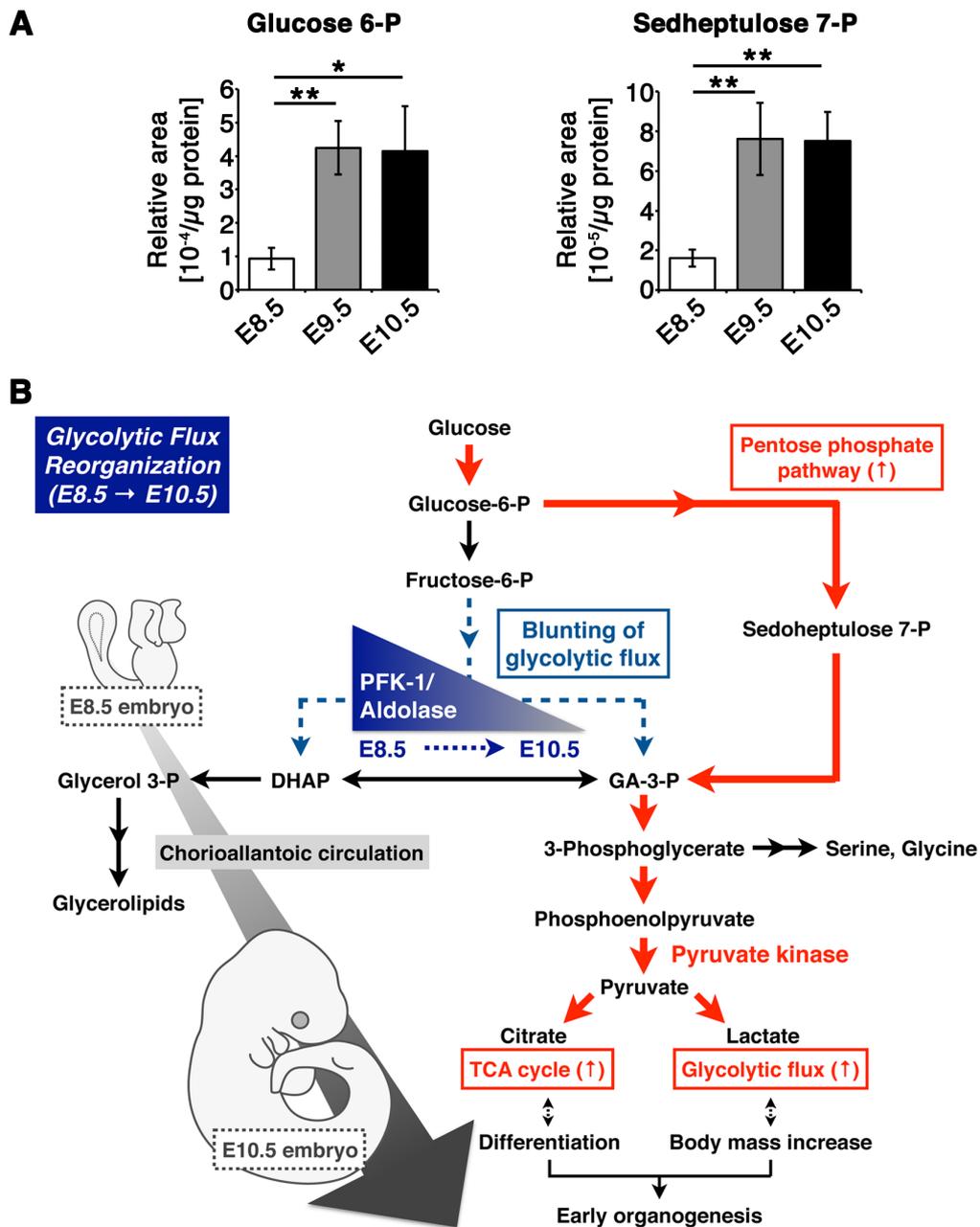


図11. 器官形成初期の胚で生じる解糖系流路の再編成

(A) IC-MSを用いたペントースリン酸経路の代謝産物測定。Area値をタンパク量で標準化した結果を示す (n = 4; *p < 0.05, **p < 0.01 vs. E8.5; Welch's t-test; E8.5, ss 8-11; E9.5, ss 24-25; E10.5, ss 34-35)。(B) 器官形成初期にはグルコース代謝（解糖系およびTCA回路）の亢進が生じるとともに、PFK-1およびAldolaseの活性抑制が生じることでグルコースがペントースリン酸経路経路を迂回するようになる。

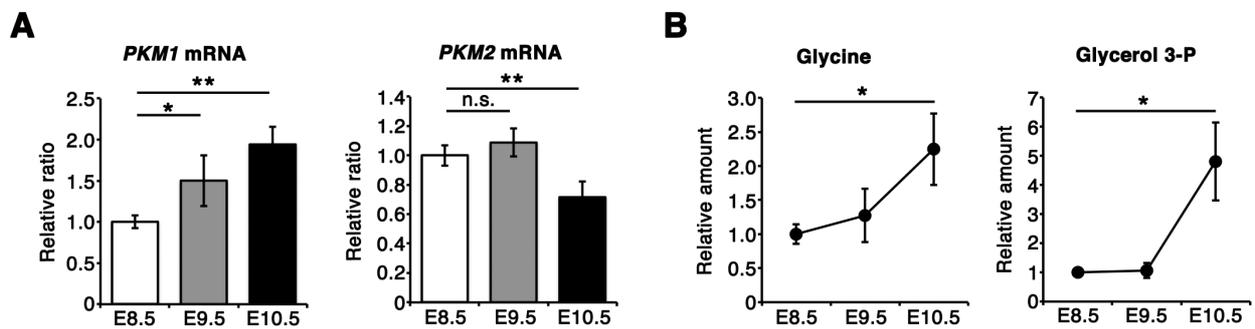


図12. 胎生9.5日以降にGA-3-P以降の解糖系代謝産物量が減少することに対する説明

(A) *PKM1*および*PKM2*の定量PCR。TBPを内部標準として用いた (n = 4; *p < 0.05、**p < 0.01 vs. E8.5; n.s.、not significant ; Welch's t-test; Data are represented as the mean ± SD)。(B) CE-MSを用いたグリセロール-3-リン酸 (G-3-P) およびグリシンの定量。E8.5, somite stage (ss) 10–12; E9.5, ss 24–26; E10.5, ss 35–37 (n = 3; *p < 0.05 vs. E8.5 embryos; Welch's t-test; Data are represented as the mean ± SD)。

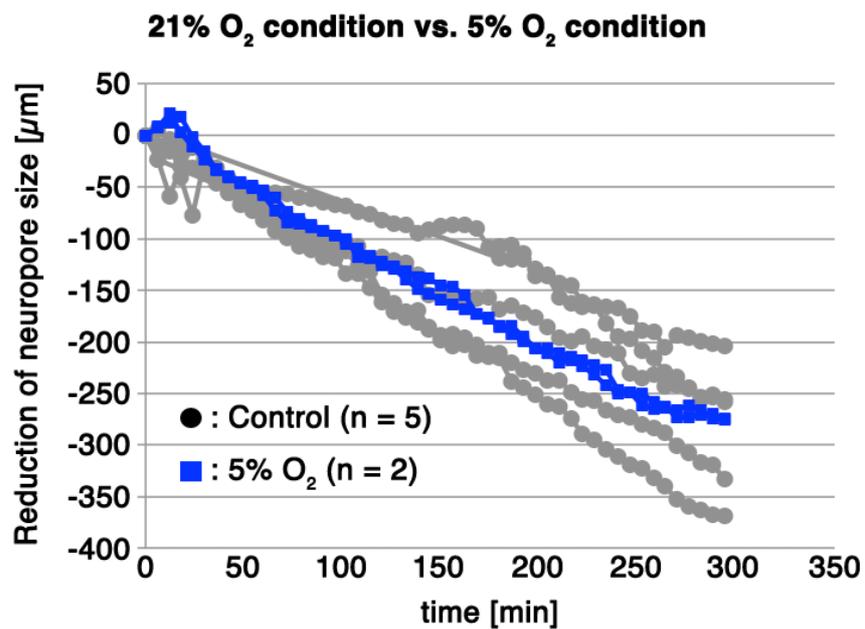


図13.低酸素条件と高酸素条件とで神経管閉鎖速度に顕著な差は観察されなかった
 5% O₂条件下における神経管閉鎖のライブイメージング解析。神経孔の前端から後端までの長さを定量し、経時変化を調べた。5% O₂条件と21% O₂条件とで神経管閉鎖速度に顕著な差は観察されなかった。

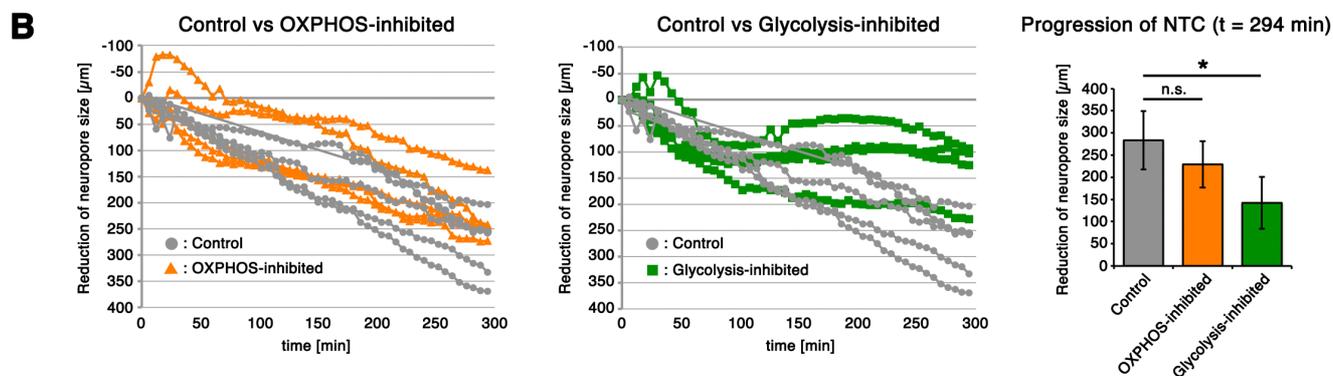
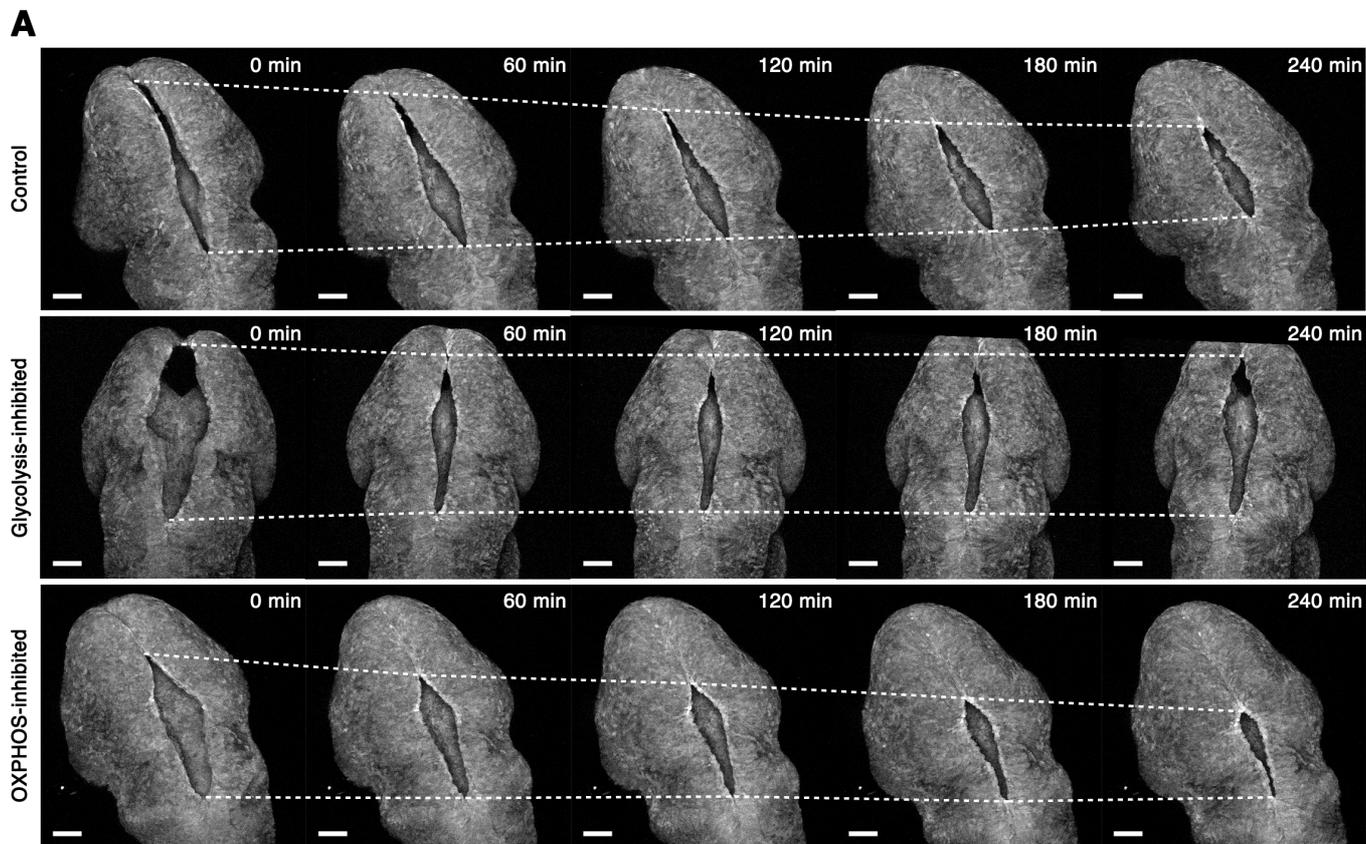


図14. 解糖系の維持が神経管閉鎖の進行に必須である

(A) 神経管閉鎖のライブイメージング解析 (21% O₂条件下)。神経板の融合過程が解糖系阻害下 (10 mM 2-deoxyglucose (2-DG), 25 μM glycogen phosphorylase inhibitor (2-DG)) で阻害された一方、OXPPOS阻害条件下 (oligomycin, 10 or 25 μM) では阻害されなかった。(B) Aの定量結果。神経孔の前端から後端までの長さ (L) を定量し、神経管閉鎖の進行度合 (ΔL) を L (t = 0 min) - L (t = 294 min) と定義した (*p < 0.05 ; Welch's t-test ; Data are represented as the mean ± SD)。

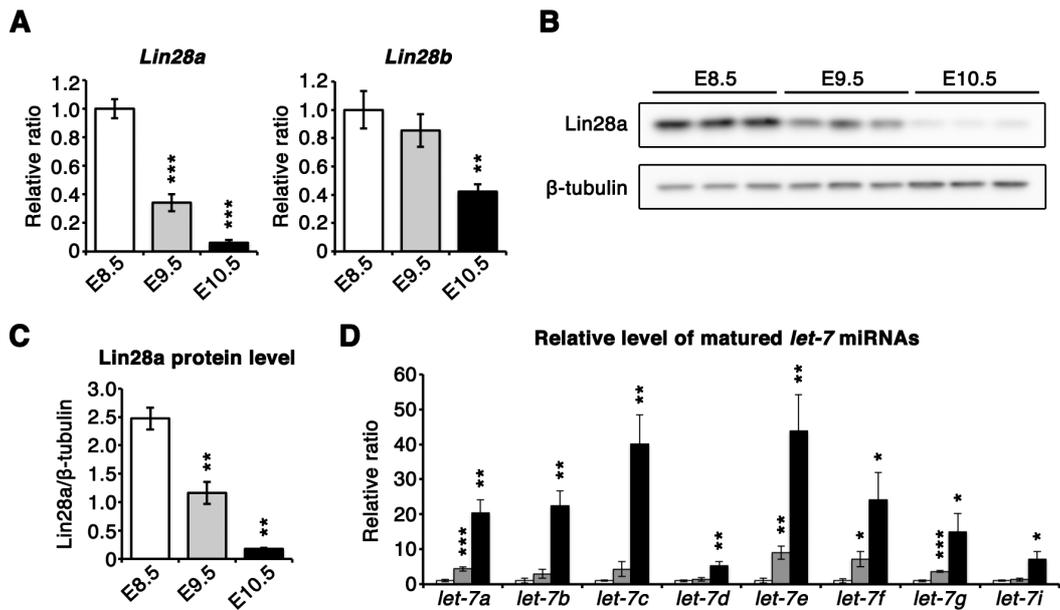


図15. 器官形成初期にはLin28a/let-7経路が大きく変動する

(A) *Lin28a*および*Lin28b*の定量PCR (n = 4; **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. E8.5; Welch's t-test ; Data are represented as the mean \pm SD) 。 *TBP*を内部標準として用いた。(B) *Lin28a*のウエスタンブロッティング。胚全体の組織溶解液を用い、各発生ステージに関して独立したサンプルをn = 3として泳動した。(C) Bの定量結果 (n = 3; **p < 0.01 vs. E8.5; Welch's t-test ; Data are represented as the mean \pm SD) 。(D) 成熟型*let-7* miRNAsの定量PCR (n = 4; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. E8.5; Welch's t-test ; Data are represented as the mean \pm SD) 。

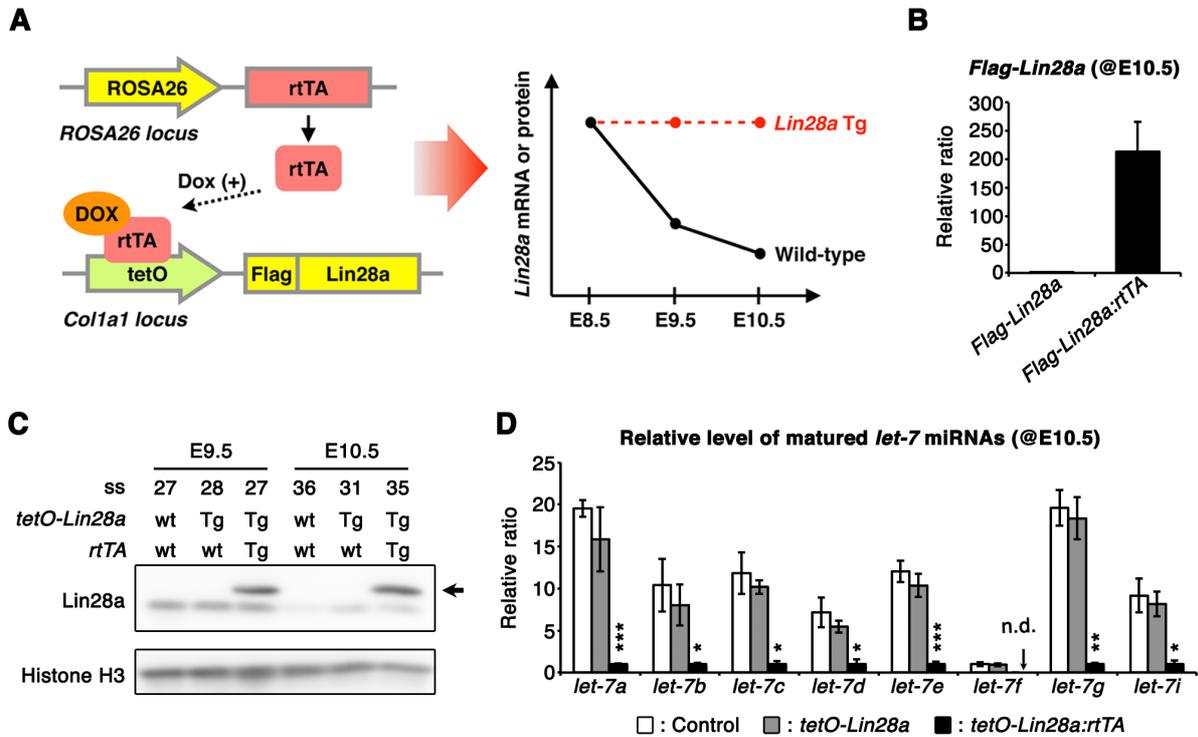


図16. tetO-Lin28a:rtTAマウスを用いた時期特異的なLin28a過剰発現の確認

(A) Dox依存的なLin28a過剰発現系の模式図。(B) *Flag-Lin28a*の定量PCR。TBPを内部標準として用いた。9-TB Doxを胎生8.5日および胎生9.5日に投与した際の胎生10.5日胚での*Flag-Lin28a*の発現 (n = 3; *p < 0.05; Welch's t-test)。(C) Lin28aのウエスタンブロッティング。胎生9.5日胚 (9-TB-Dox: 胎生8.5日) および胎生10.5日胚 (9-TB Dox: 胎生8.5日、胎生9.5日) でFlag-Lin28aの発現 (矢印) が観察された。Flag-Lin28aを過剰発現しても内因性Lin28aの発現は胎生9.5-10.5日にかけて低下した。ss、somite stage。(D) 成熟型 *let-7* miRNAsの定量PCR。*tetO-Lin28a:rtTA*胚に対する相対比 (*let-7f*は*tetO-Lin28a*胚に対する相対比)。U6-*snRNA*を内部標準として用いた (n = 3; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. E8.5; Welch's t-test ; Data are represented as the mean ± SD)。

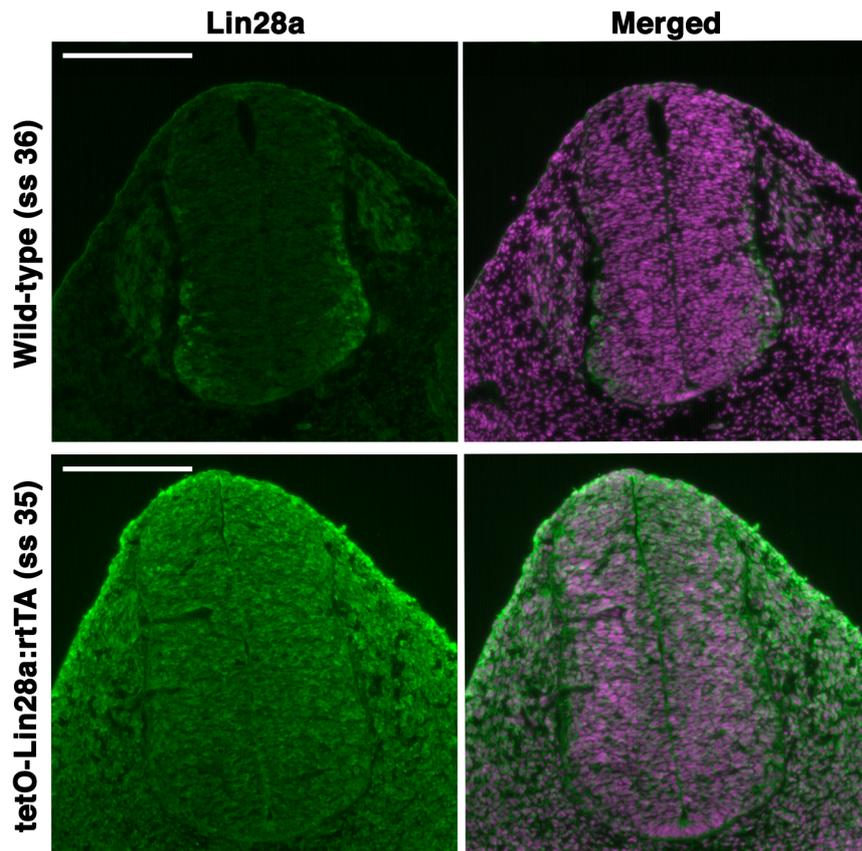


図17. Dox投与によりLin28aが全身で過剰発現される

抗Lin28a抗体を用いた免疫染色。9-TB Doxを胎生8.5日および胎生9.5日に投与した際の胎生10.5日胚におけるLin28a（緑）の発現（マゼンタ：Hoechst）。野生型では神経管の基底膜側で強い発現が観察された一方、tetO-Lin28a:rtTA胚では表皮、間充織、神経管全ての細胞で強い発現が観察された。Scale bar、200 μ m。ss: somite stage。

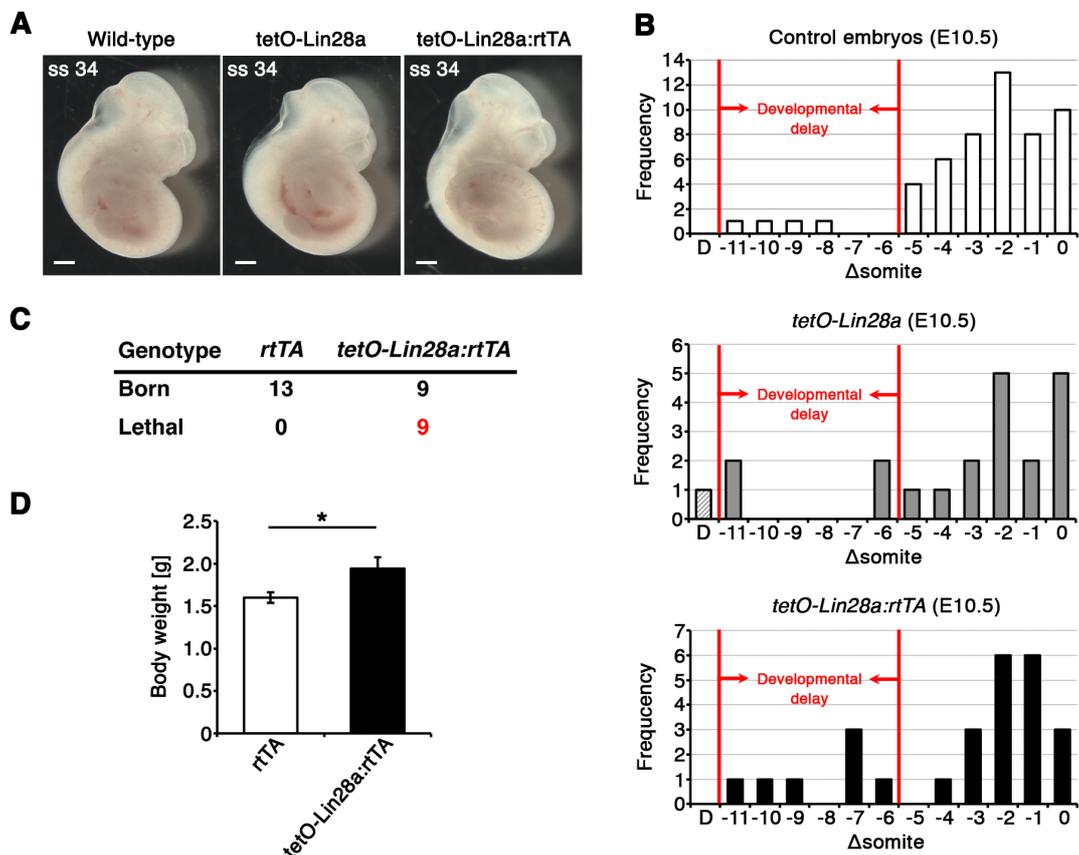


図18. 時期特異的なLin28aの過剰発現が正常発生に与える影響

(A) 胎生10.5日の*tetO-Lin28a:rtTA*胚 (9-TB Dox投与：胎生8.5日および胎生9.5日)。Scale bar、500 μ m。(B) 遺伝子型と発生ステージの関係。 Δ somite = somite number – maximum somite number in the same litterと定義し、 Δ somite \leq -6の個体を発生遅延と判断。胎生10.5日において、*tetO-Lin28a:rtTA*胚は同腹子に比べ発生遅延を示した。D: developmental defects。(C, D) *tetO-Lin28a:rtTA*マウスのP0における致死率 (C) および体重 (D)。胎生8.5日および胎生9.5日にDoxを投与した (*rtTA*, n = 6; *tetO-Lin28a:rtTA*, n = 5; *p \leq 0.01; Welch's t-test; Data are represented as the mean \pm SD)。

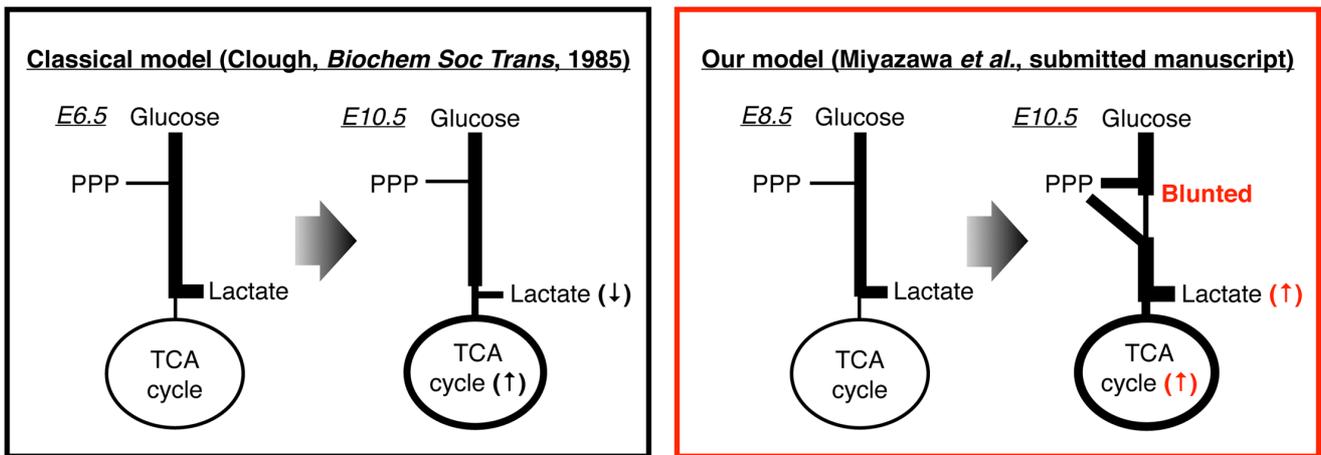
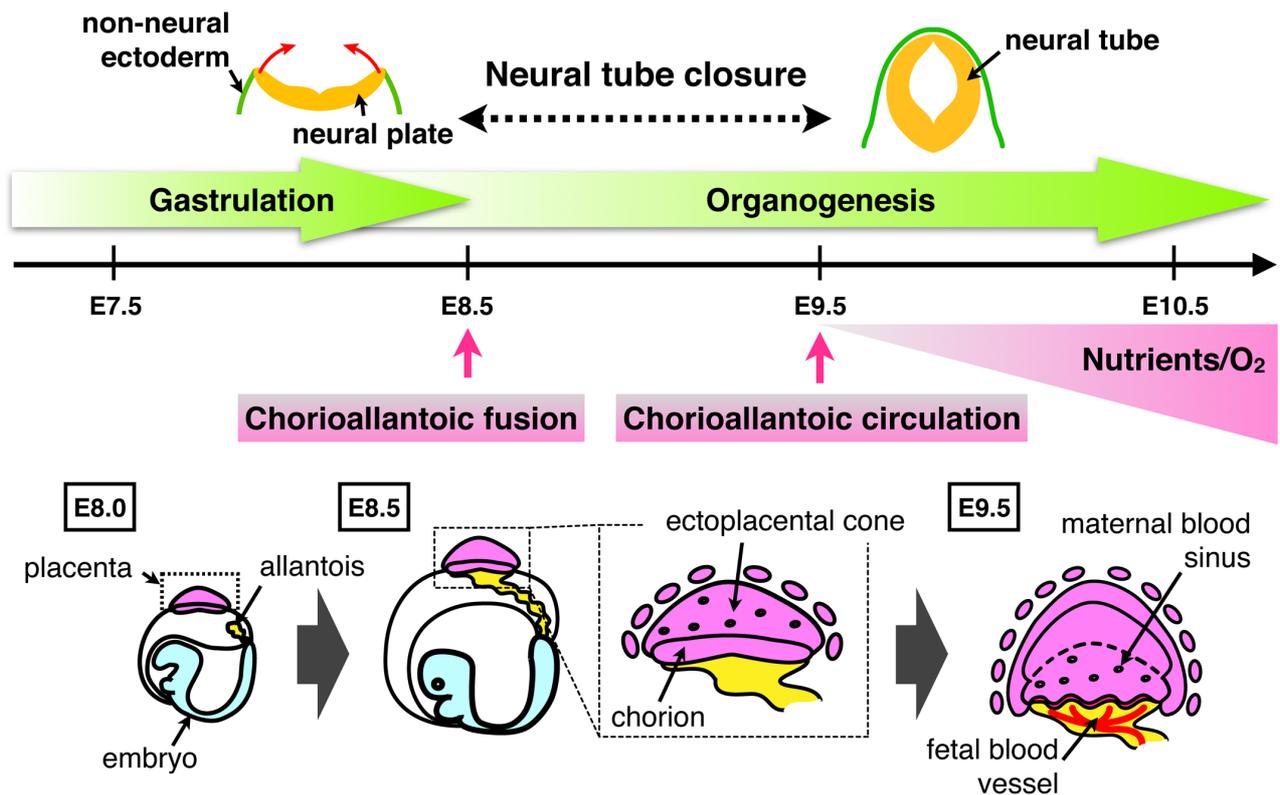


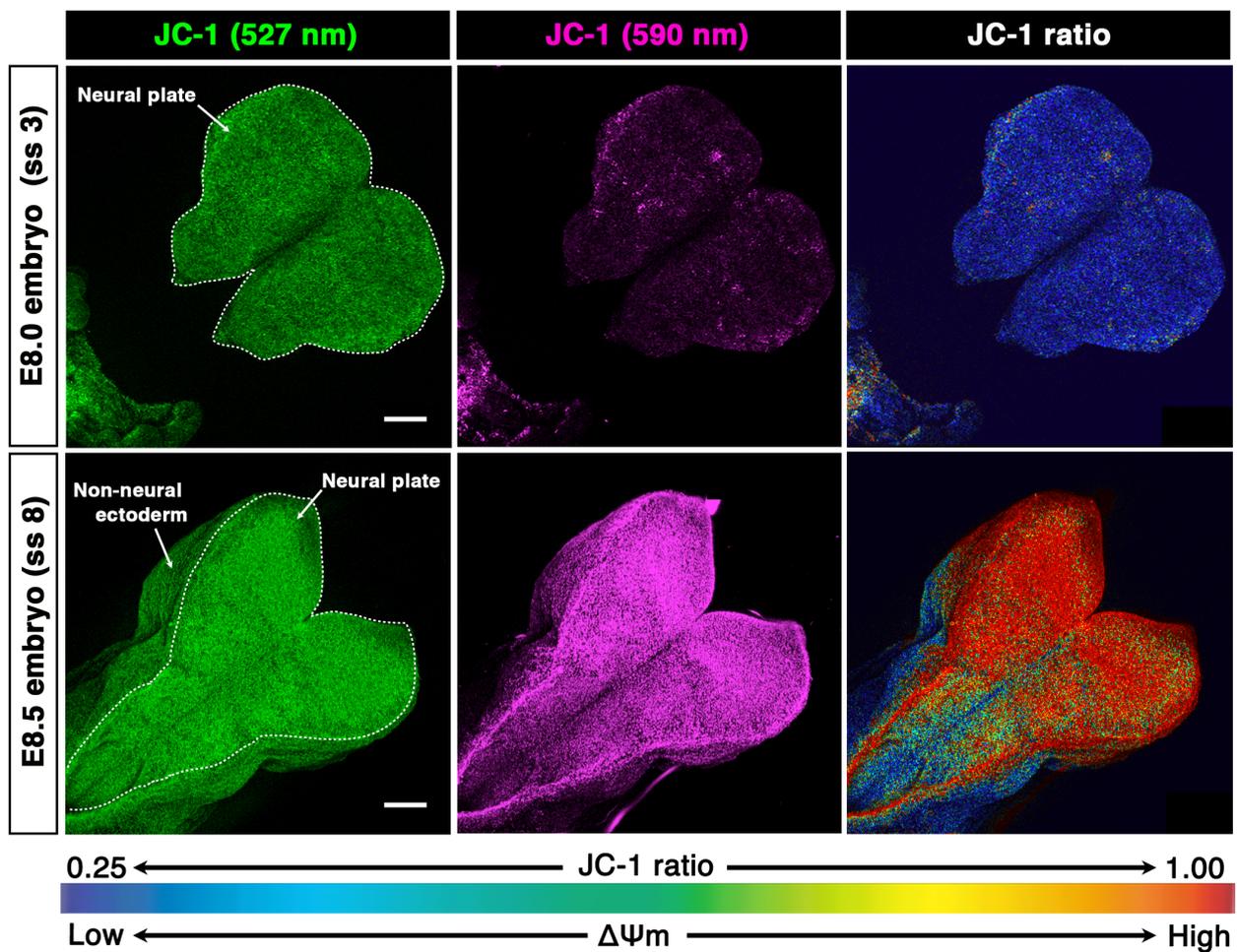
図19.エネルギー代謝状態変化に関する古典的モデルと本研究で示されたモデルとの比較

器官形成初期に生じるエネルギー代謝状態変化に関して、古典的研究では解糖系の抑制およびTCA回路活性の亢進というモデルが提示されていた（左；Clough, 1985）。本研究では、この時期にTCA回路のみならず解糖系の活性も亢進するとともに、解糖系流路が再編成されペントースリン酸経路（PPP）を迂回するようになるという新しいモデルを提示した（右）。



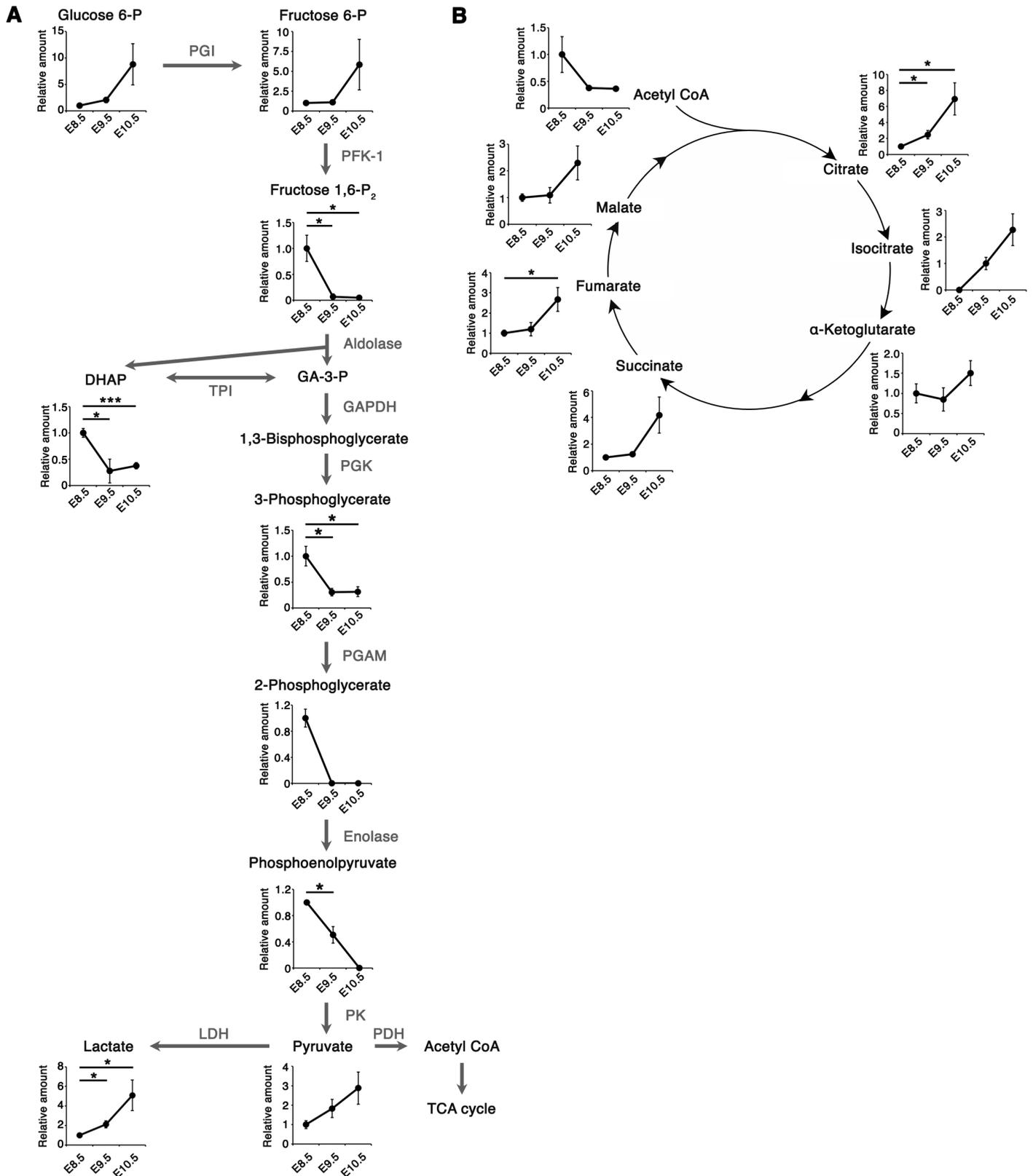
補遺1. 哺乳類器官形成初期には胎盤接続に伴い子宮内環境が変化する

胎生8.5日 (somite stage (ss): 6-8) に胚の尿膜が胎盤 (絨毛膜) と接続した後 (chorio-allantoic fusion)、胎児由来の血管が胎盤側へと伸長することで絨毛尿膜循環 (chorioallantoic circulation) が確立する (胎生9.5日 ; ss 22-26)。この時期は器官形成が開始する時期にあたり、器官形成の例として中枢神経系形成に必須な神経管閉鎖過程の進行があげられる。



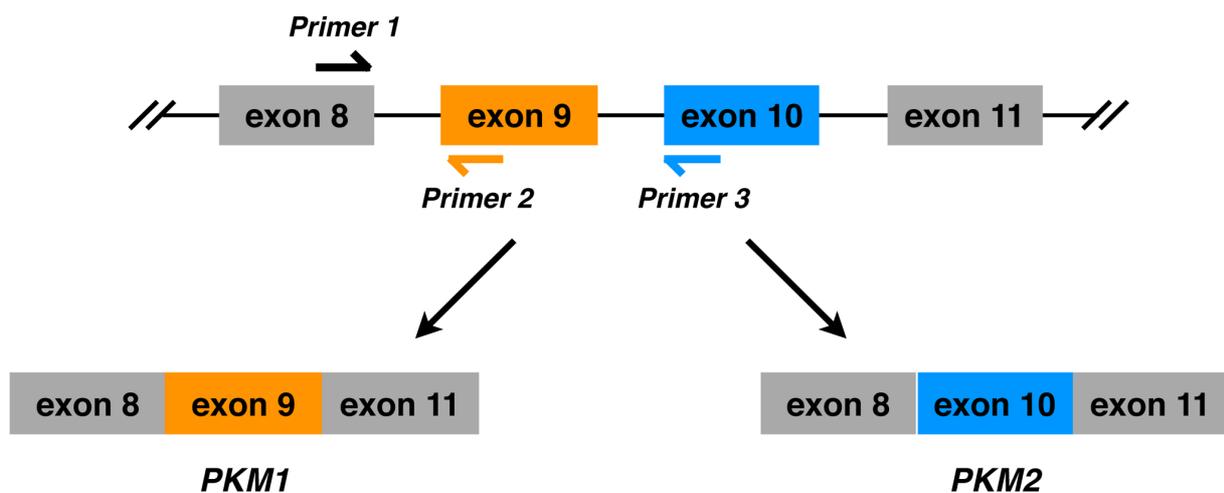
補遺2. 高酸素条件下における神経板のミトコンドリア膜電位

JC-1染色を*ex vivo* (21% O_2) で行なった結果。*ex vivo* 条件下において胎生8.0日胚の神経板が低いミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) を示した一方、胎生8.5日胚の神経板は高い $\Delta\Psi_m$ を示した。JC-1 ratio、JC-1蛍光 (590 nm)/JC-1蛍光 (527 nm)。Scale bar、100 μm 。ss: somite stage。



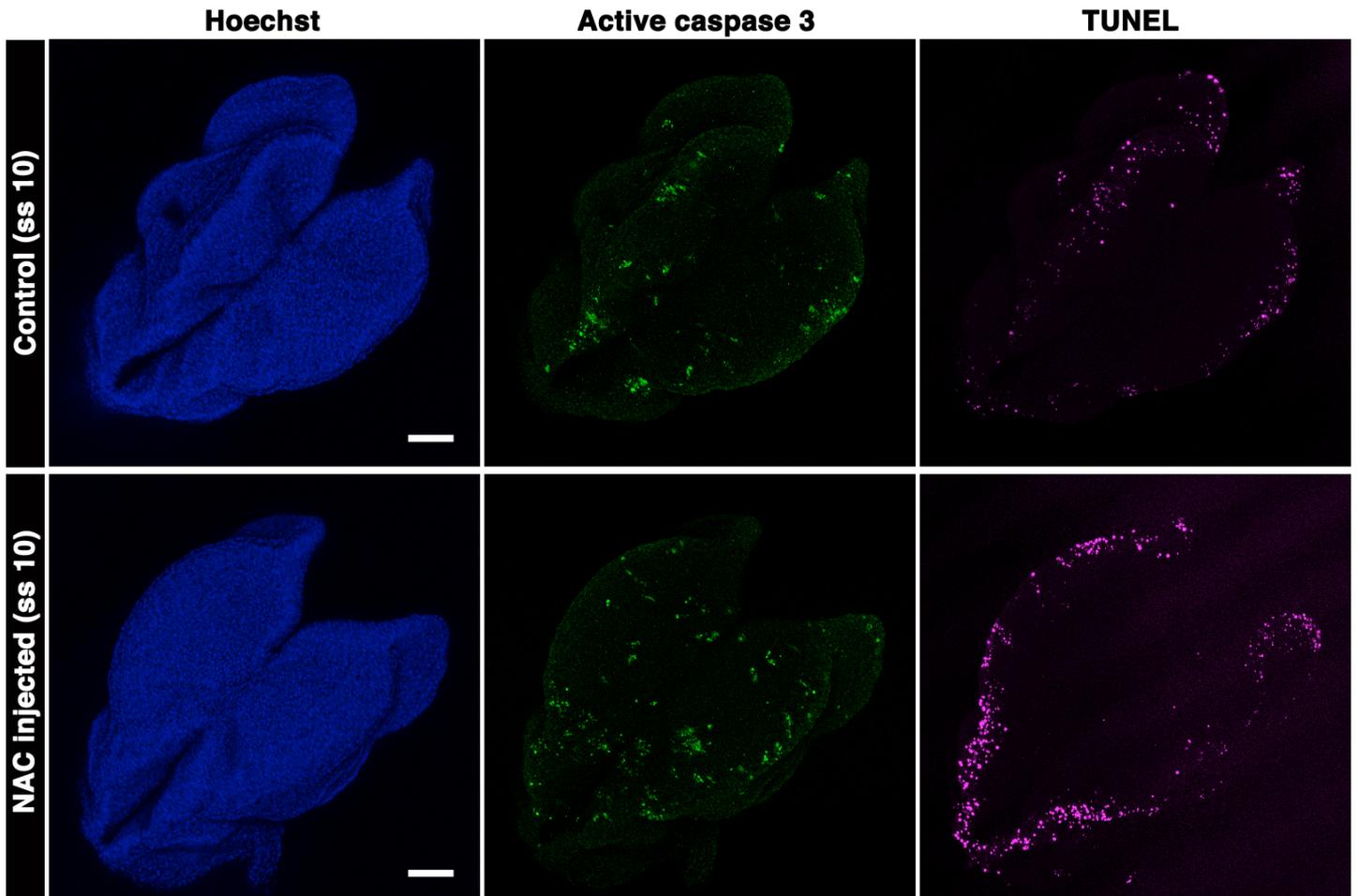
補遺3. 器官形成初期の胚における解糖系/TCA回路の代謝産物量変化

CE-MSを用いたメタボローム解析。胚全体（卵黄膜、羊膜を除く）をサンプルとして用いており、縦軸は相対量を表す。E8.5, ss 10–12; E9.5, ss 24–26; E10.5, ss 35–37 (n = 3; *p < 0.05 vs. E8.5 embryos; Welch's t-test; Data are represented as the mean ± SD)。 (A, B) 胎生8.5-10.5日における解糖系 (A) およびTCA回路 (B) の代謝産物量変化。DHAP, dihydroxyacetone phosphate; GA-3-P, glyceraldehyde 3-phosphate。



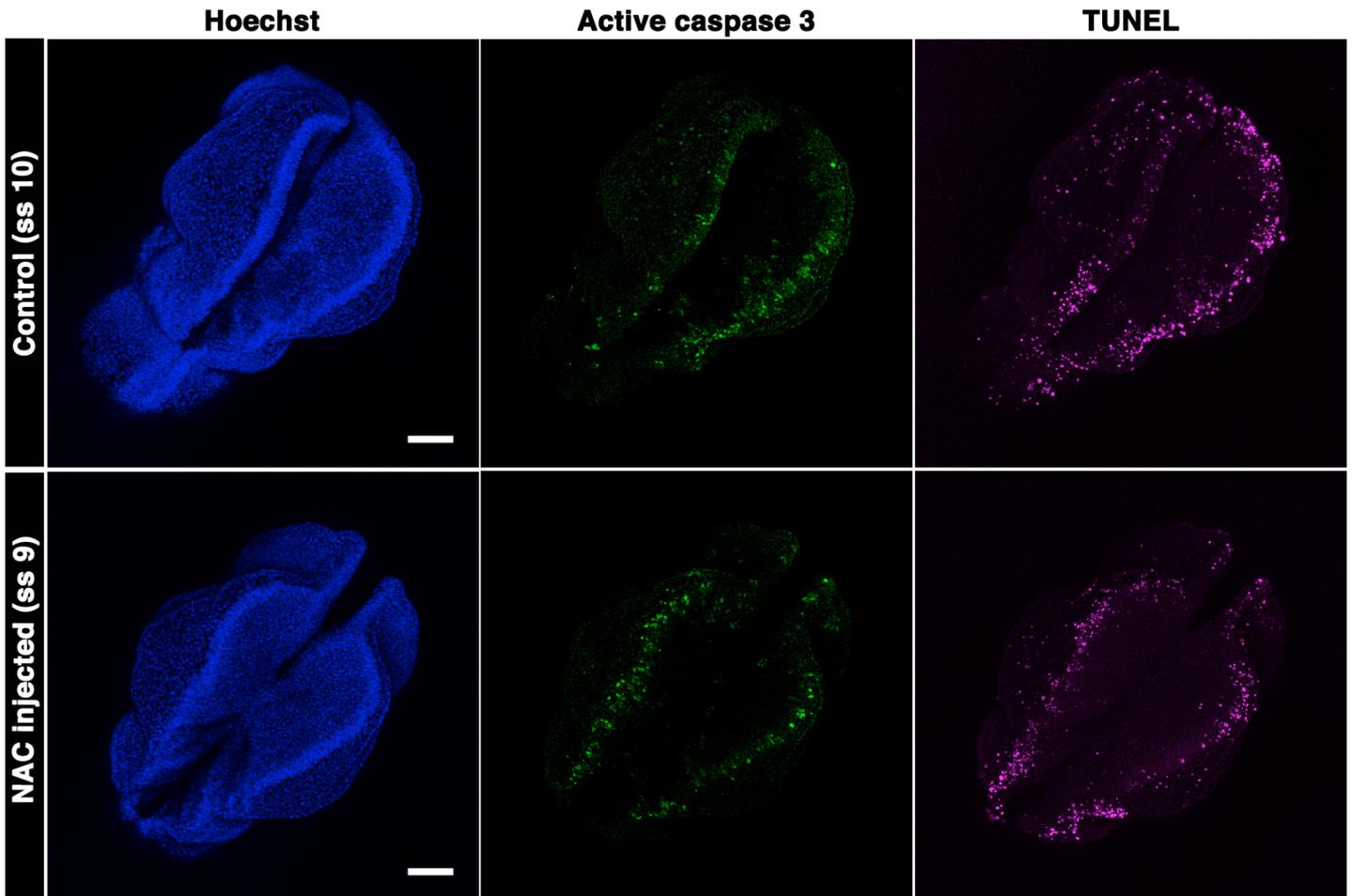
補遺4. PKM1、PKM2特異的なPCRプライマーの設計

PKM1はエクソン9を含む一方、PKM2はエクソン9の代わりにエクソン10を含むことから、それぞれのアイソフォーム特異的なエクソンに対してプライマーを設計した。PKM1検出用プライマーセット、プライマー1および2；PKM2検出用プライマーセット、プライマー1および3。



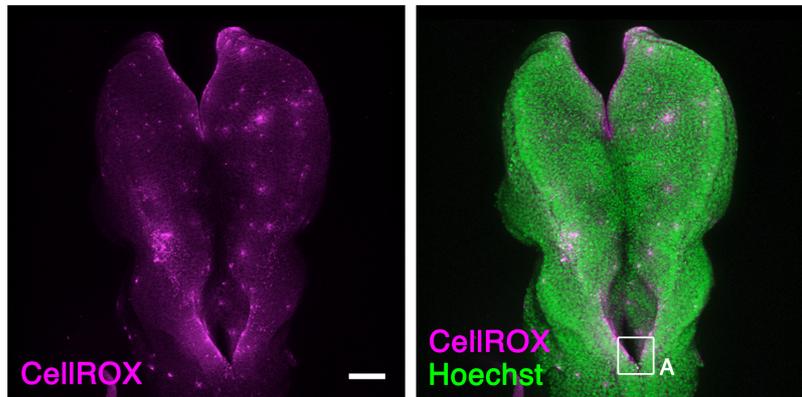
補遺5. NACを妊娠マウスに腹腔投与しても胎生8.5日胚のアポトーシスは抑制されなかった

NACによるアポトーシス抑制効果の評価。NACを200 mg/kg体重で腹腔注射し、2時間後に胚を回収・固定した。NACを腹腔投与した群でも対照群と同様にactive caspase 3 (green) およびTUNEL (magenta) のシグナルが観察された。核はHoechst (blue) で標識している。Scale bar、100 μ m。ss: somite stage。

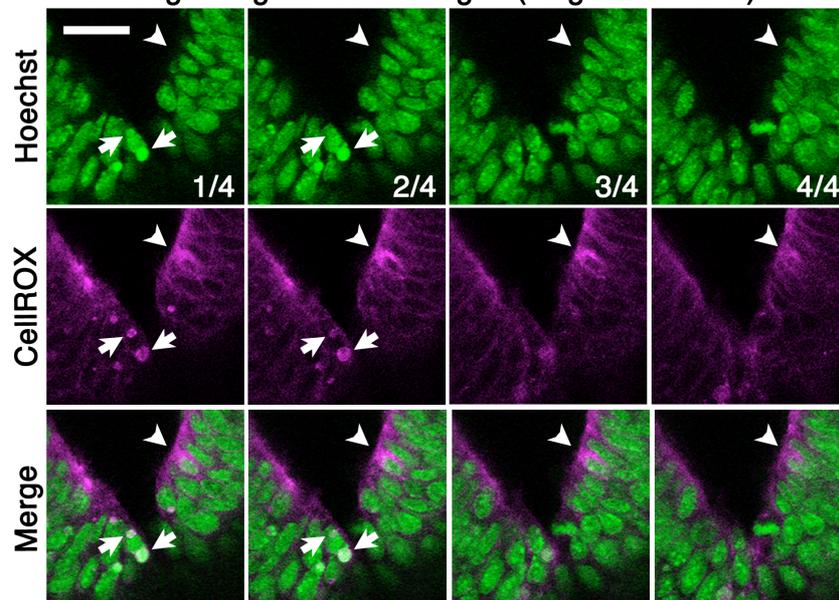


補遺6. NACを子宮内投与しても胎生8.5日胚のアポトーシスは抑制されなかった

NACによるアポトーシス抑制効果の評価。腹腔注射ではNACが胎児に届かない可能性が考えられることから、NACを子宮内に注入し、2時間後に胚を回収・固定した。NACを子宮内投与した群でも対照群と同様active caspase 3 (green) およびTUNEL (magenta) のシグナルが観察された。核はHoechst (blue) で標識している。Scale bar、100 μ m。ss: somite stage。

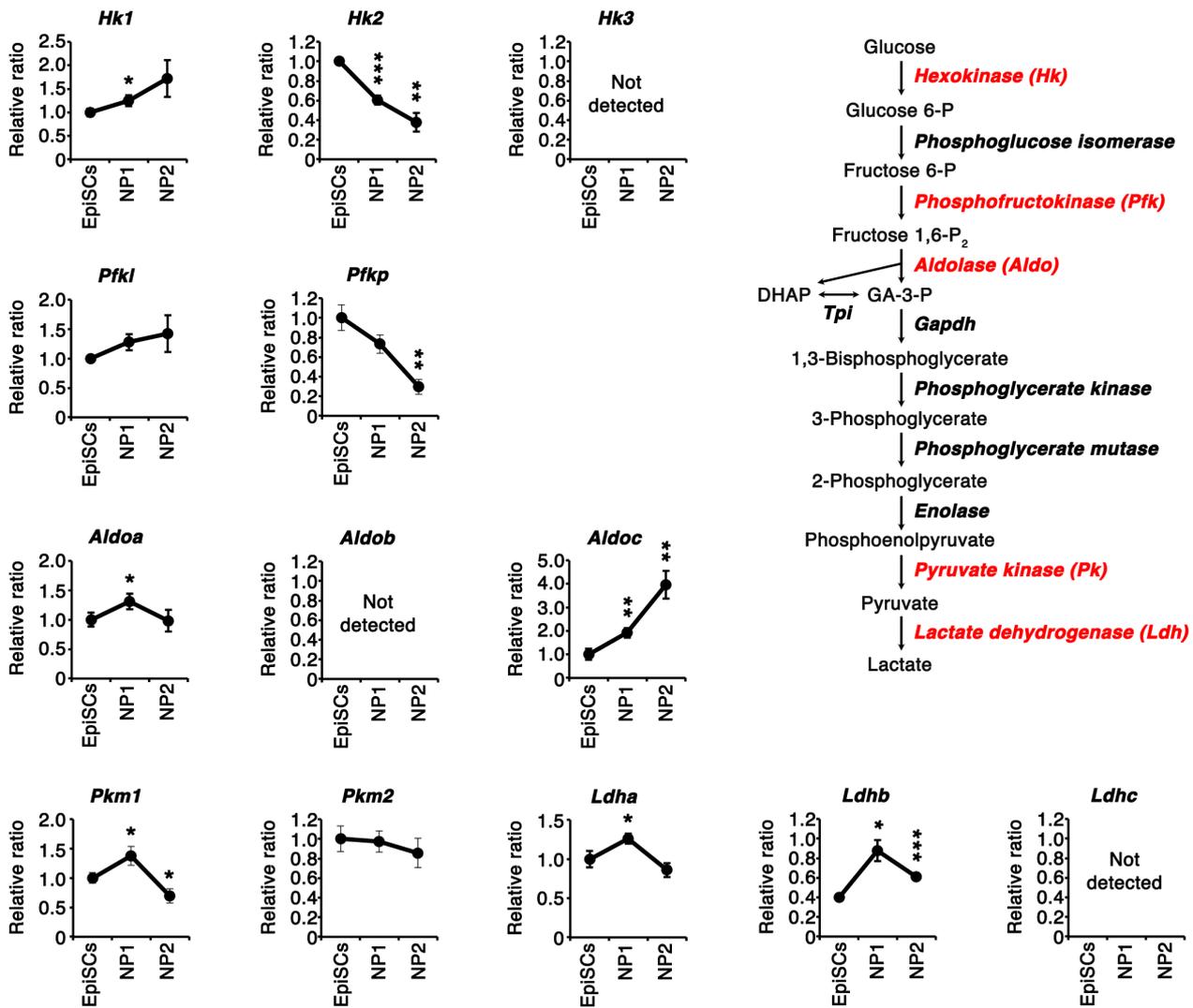


High magnification images (single z-section)



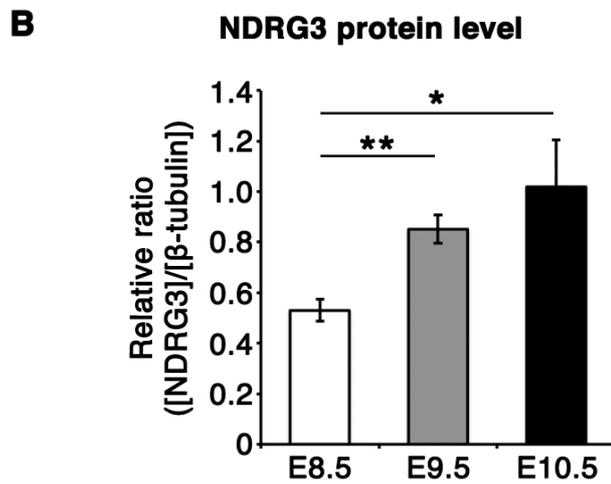
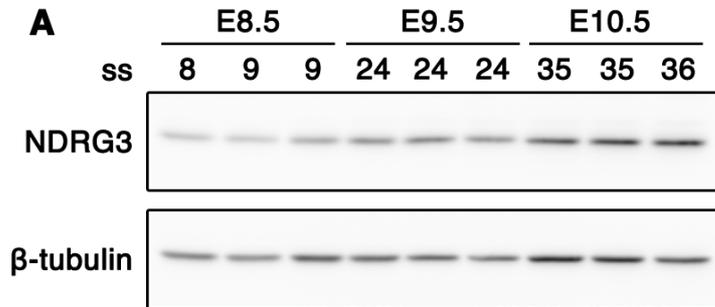
補遺7. アポトーシス細胞および一部の生細胞でROSが検出された

ROS色素CellIROXを用いた胎生8.5日胚の染色。 *Ex vivo*条件 (21% O₂) で60分間胚を染色した。上段、maximum intensity projection画像 (somite stage 10; scale bar, 100 μm)。下段、領域Aのsingle z-section画像 (scale bar, 30 μm; z-step, 3 μm)。一部の生細胞 (arrowhead) および核の凝集したアポトーシス細胞 (arrow) で強いシグナルが観察された。



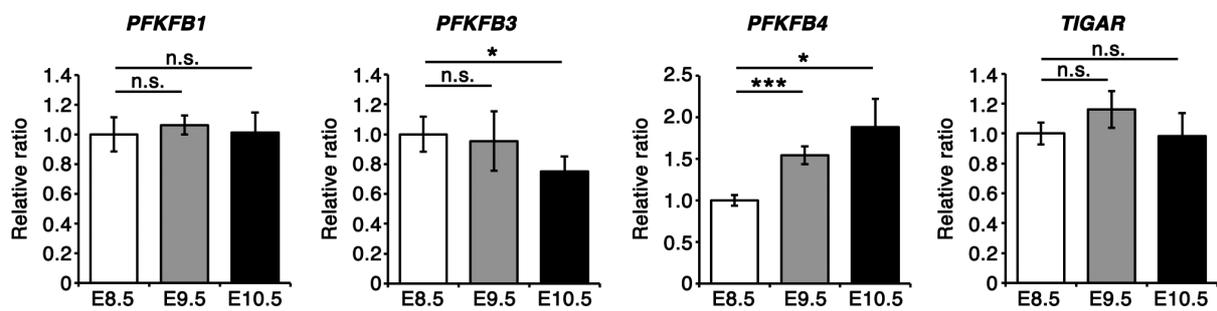
補遺8. EpiSCsを神経板様細胞へと分化誘導したときの解糖系遺伝子群の発現変化

解糖系遺伝子群の定量PCR。EpiSCsを神経板様細胞へと分化誘導してから一日目(NP1)および二日目(NP2)における解糖系遺伝子群の発現を調べた(n = 3; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. EpiSCs; Welch's t-test; Data are represented as the mean ± SD)。Gapdh: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, Tpi: triose phosphate isomerase。



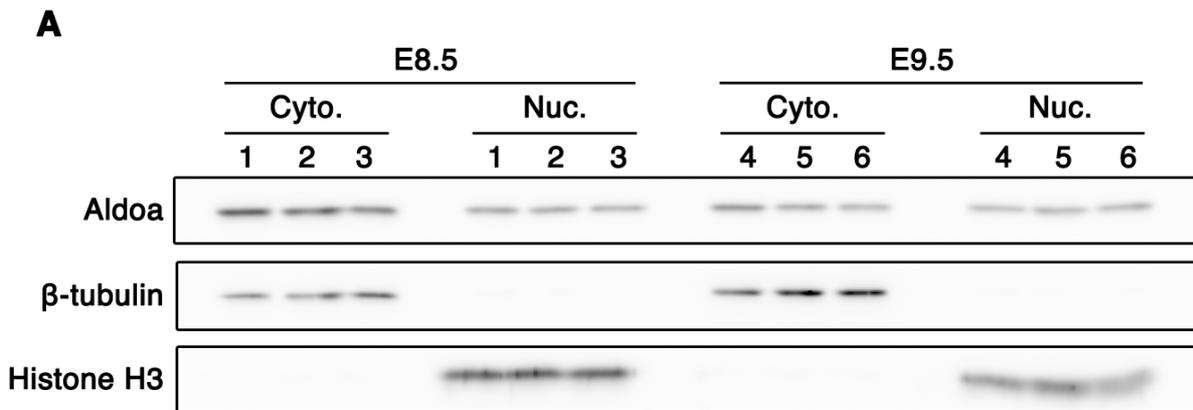
補遺9. NDRG3のタンパク量が胎生8.5-10.5日にかけて増加する

(A) NDRG3のウエスタンブロッティング。胚全体の組織溶解液を用い、各発生ステージに関して独立したサンプルをn = 3として泳動した。(B) Aの定量結果 (n = 3; *p < 0.05, **p < 0.01 vs. E8.5; Welch's t-test ; Data are represented as the mean \pm SD) 。



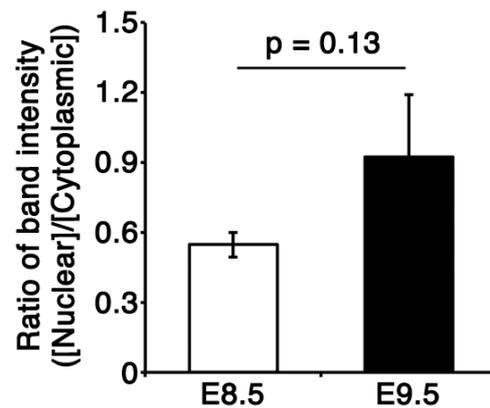
補遺10. 胎生8.5-10.5日胚におけるPFKFBおよびTIGARのmRNA発現変化

PFKFBおよびTIGARの定量PCR。TBPを内部標準として用いた (n = 4; *p < 0.05, ***p < 0.001 vs. E8.5; n.s., not significant; Welch's t-test; Data are represented as the mean ± SD)。



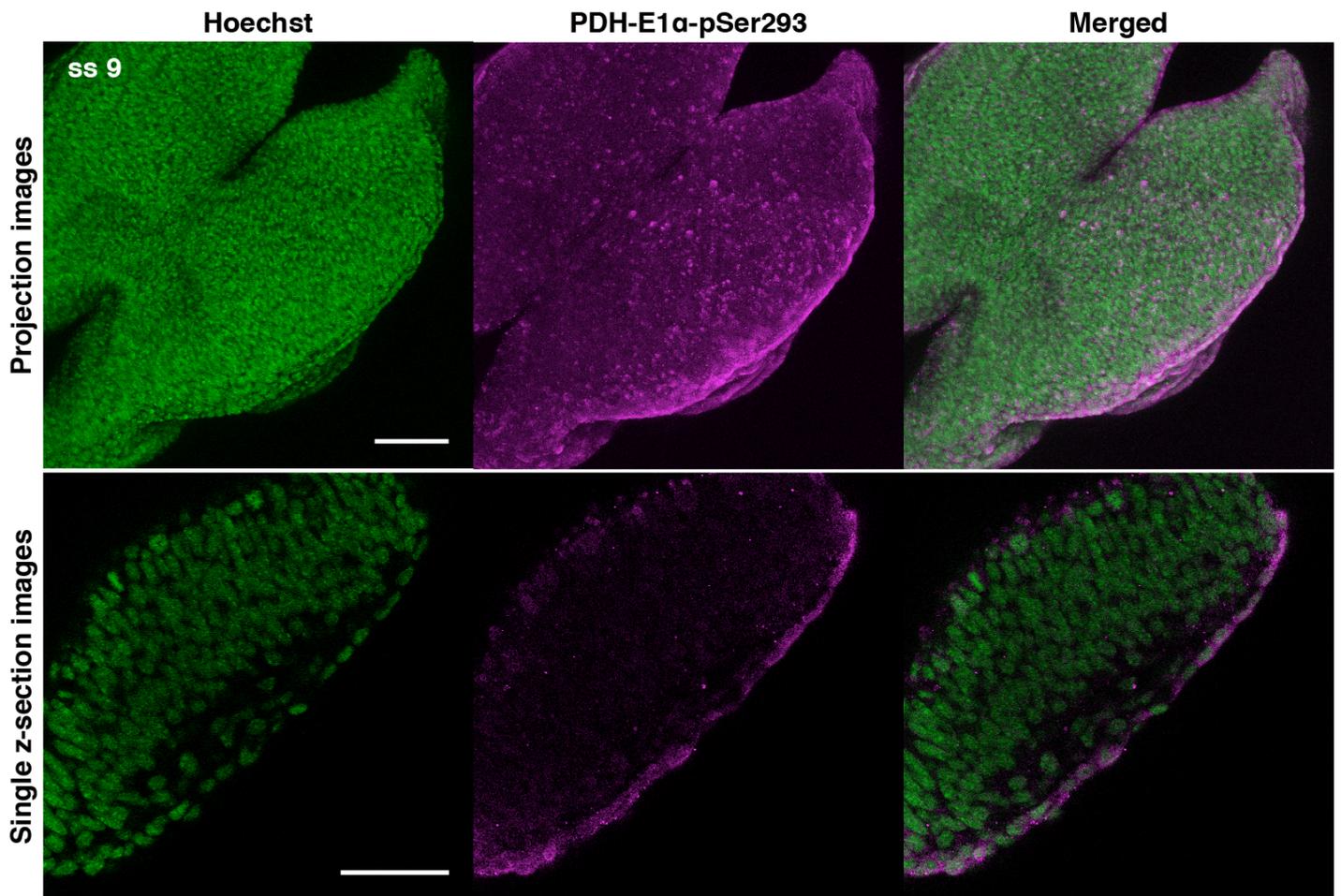
B

Nuclear/Cytoplasmic ratio of Aldoa



補遺11. 胎生8.5-9.5日にかけてAldoaの核局在が増える傾向が観察された

(A) 胚の細胞質画分と核画分を用いたAldoaのウエスタンブロッティング。細胞質画分 (Cyto.) と核画分 (Nuc.) のマーカーとして β -tubulinおよびHistone H3をそれぞれ用いた。(B) Aの定量結果。核画分に対する細胞質画分のAldoaバンド強度比を定量した (n = 3; Welch's t-test ; Data are represented as the mean \pm SD) 。

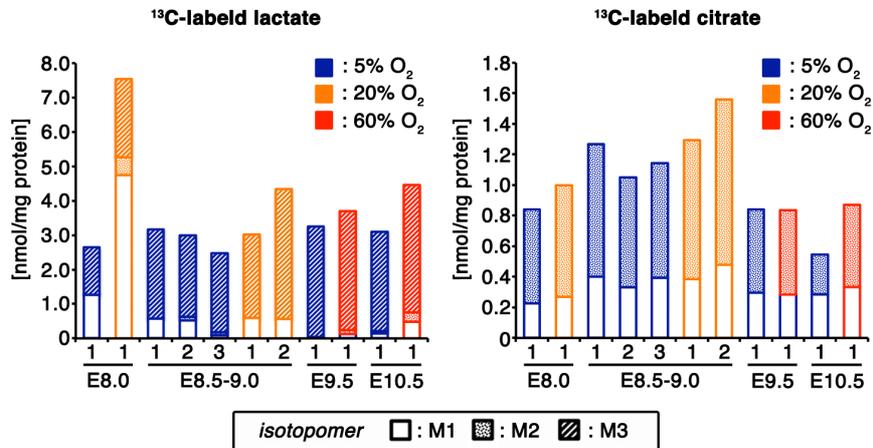


補遺13. リン酸化型ピルビン酸脱水素酵素の発現が非神経外胚葉領域で観察された

胎生8.5日胚を用いたリン酸化型ピルビン酸脱水素酵素（PDH-E1α-pSer293）の免疫組織染色。神経外胚葉よりも非神経外胚葉領域でPDH-E1α-pSer293（magenta）の強いシグナルが観察された。上段：Scale bar、100 μm、下段：Scale bar、20 μm。ss: somite stage。

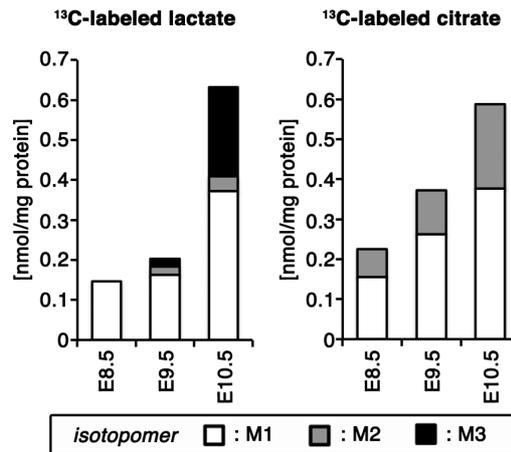
A

Yolk sac_ex vivo



B

Yolk sac_in vivo



補遺14. 器官形成初期の卵黄膜ではTCA回路が活発である

¹³C₆-glucoseを用いたpathway tracing。全胚培養系 (A; ¹³C₆-glucose 存在下で60分間培養) および*in vivo* (B; ¹³C₆-glucoseを妊娠マウスに尾静脈注射し、60分後に卵黄膜を回収) における卵黄膜での¹³C₆-glucose由来の乳酸およびクエン酸の産生量を示しており、それぞれの棒グラフは独立したサンプルを表す。卵黄膜での乳酸の産生は胚と比べ1/10程度であった一方、クエン酸の産生は同程度であった (図4、8を参照)。この結果は、卵黄膜が胚よりもTCA回路依存的なエネルギー代謝状態であることを示唆する。(A) E8.0, somite stage (ss) 4–6; E8.5–9.0, ss 6–17; E9.5, ss 24–28; E10.5, ss 34–37。(B) E8.5, ss 8–12; E9.5, ss 22–26; E10.5, ss 32–36。

表 1. 定量PCRに用いたプライマーセット

Gene symbol	Primer type	Sequence (5' to 3')
<i>Aldoa</i>	forward	TGGGAAGAAGGAGAACCTGA
	reverse	GACAAGCGAGGCTGTTGG
<i>Aldob</i>	forward	CTATGCCAGCATCTGTCAGC
	reverse	TCATGGTCTCCGTCAGGAA
<i>Aldoc</i>	forward	CGTAGGCATCAAGGTTGACA
	reverse	GAGCACAGCGTTCCAAGAG
<i>Hk1</i>	forward	GTGGACGGGACGCTCTAC
	reverse	TTCACTGTTTGGTGCATGATT
<i>Hk2</i>	forward	TTCACCTTCTCCTTCCCTTG
	reverse	CCCTTTGTCCACTTGAGGAG
<i>Hk3</i>	forward	CAGGGAGCAGCAGACATTG
	reverse	TCTCCTTTAGGATTCCGAGGA
<i>Ldha</i>	forward	TGGCAGCCTCTTCCTTAAAA
	reverse	CAGCTTGGAGTTCGCAGTTA
<i>Ldhb</i>	forward	ACAAGTGGGTATGGCATGTG
	reverse	ACATCCACCAGGGCAAGTT
<i>Ldhc</i>	forward	GAACACTGGAAAATGTTCACAA
	reverse	GCCCTTCATGTTAAGGACCTC
<i>Lin28a</i>	forward	ACATGCAGAAGCGAAGATCC
	reverse	CCTTGGCATGATGGTCTAGC
<i>Lin28b</i>	forward	GAGTCCAGGATGATTCCAAGA
	reverse	TGCTCTGACAGTAATGGCACTT
<i>PFKFB1</i>	forward	AGCCTTTGGATGAGGAATTG
	reverse	GTGTGCCACATCGAAGAT
<i>PFKFB2</i>	forward	TTGGATAAAGGCGCAGGTT
	reverse	TGGCTTGTCACGATGTGTG
<i>PFKFB3</i>	forward	AACAGCTTTGAGGAGCGTGT
	reverse	CCGGGAGCTTTCATGTTT
<i>PFKFB4</i>	forward	GTACCCGAAGGGTGAGTCC
	reverse	TCTCCAGTTCATGATGACG
<i>Pfkl</i>	forward	GGGTCATGTACAGCGAGGA
	reverse	GGCCTCCATACCCATCTTG
<i>Pfkm</i>	forward	AGATCGTAGACGCCATCACC
	reverse	GGCCATCACTTCTAACACAA
<i>Pfkp</i>	forward	CAAGAGAGATCTCCTGTTTCAACC
	reverse	CTTGGGGATCCTGTGCTC
<i>PKM1</i>	forward	ACTACCCTCTGGAGGCTGTTC
	reverse	AAGCTCTTCAAACAGCAGACG
<i>PKM2</i>	forward	ACTACCCTCTGGAGGCTGTTC
	reverse	GTGGGGTTCGCTGGTAATG
<i>TBP</i>	forward	GAACATCATGGATCAGAACAACA
	reverse	ATAGGGATTCCGGGAGTCAT
<i>TIGAR</i>	forward	TGTAAAGACATGGCGGTGAA
	reverse	TCCGCGACTCCGTACATC

参考文献

大隅典子、二宮 洋一郎、江藤 一洋 (1997) 神経発生研究における哺乳類全胚培養法. ニューロサイエンスラボマニュアル 3「神経生物学研究に必要な胚と個体の遺伝子操作法」(シュプリンガー・フェアラーク東京)、217-246

宮沢英延 東京大学大学院薬学系研究科修士論文 (2009) マウス神経管閉鎖期前後に生じるエネルギー代謝状態変化の制御機構および意義の解明

Agathocleous, M., and Harris, W.A. (2013). Metabolism in physiological cell proliferation and differentiation. *Trends in cell biology* 23, 484-492.

Agathocleous, M., Love, N.K., Randlett, O., Harris, J.J., Liu, J., Murray, A.J., and Harris, W.A. (2012). Metabolic differentiation in the embryonic retina. *Nature cell biology* 14, 859-864.

Agius, L. (2008). Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *The Biochemical journal* 414, 1-18.

Akazawa, S., Unterman, T., and Metzger, B.E. (1994). Glucose metabolism in separated embryos and investing membranes during organogenesis in the rat. *Metabolism: clinical and experimental* 43, 830-835.

Ambros, V., and Horvitz, H.R. (1984). Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 226, 409-416.

Anastasiou, D., Pouligiannis, G., Asara, J.M., Boxer, M.B., Jiang, J.K., Shen, M., Bellinger, G., Sasaki, A.T., Locasale, J.W., Auld, D.S., *et al.* (2011). Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science* 334, 1278-1283.

Arora, R., and Papaioannou, V.E. (2012). The murine allantois: a model system for the study of blood vessel formation. *Blood* 120, 2562-2572.

Bailey, A.P., Koster, G., Guillemier, C., Hirst, E.M., MacRae, J.I., Lechene, C.P., Postle, A.D., and Gould, A.P. (2015). Antioxidant Role for Lipid Droplets in a Stem Cell Niche of *Drosophila*. *Cell* 163, 340-353.

Balzer, E., Heine, C., Jiang, Q., Lee, V.M., and Moss, E.G. (2010). LIN28 alters cell fate succession and acts independently of the let-7 microRNA during neurogliogenesis in vitro. *Development* 137, 891-900.

Bamforth, S.D., Braganca, J., Eloranta, J.J., Murdoch, J.N., Marques, F.I., Kranc, K.R., Farza, H., Henderson, D.J., Hurst, H.C., and Bhattacharya, S. (2001). Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking Cited2, a new Tcf2 co-activator. *Nature genetics* 29, 469-474.

Banerjee, D., and Slack, F. (2002). Control of developmental timing by small temporal RNAs: a paradigm for RNA-mediated regulation of gene expression. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 24, 119-129.

Blom, H.J., Shaw, G.M., den Heijer, M., and Finnell, R.H. (2006). Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nature reviews Neuroscience* 7, 724-731.

Brons, I.G., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., *et al.* (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448, 191-195.

Bustamante, J.J., Copple, B.L., Soares, M.J., and Dai, G. (2010). Gene profiling of maternal hepatic adaptations to pregnancy. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 30, 406-415.

Caspary, T., and Anderson, K.V. (2003). Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. *Nature reviews Neuroscience* 4, 289-297.

Chamberlain, J.G., and Nelson, M.M. (1963). Multiple congenital abnormalities in the rat resulting from acute maternal niacin deficiency during pregnancy. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 112, 836-840.

Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C., and Schumacker, P.T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America 95, 11715-11720.

Chang, A.J., Ortega, F.E., Riegler, J., Madison, D.V., and Krasnow, M.A. (2015). Oxygen regulation of breathing through an olfactory receptor activated by lactate. *Nature* 527, 240-244.

Chang, C.H., Curtis, J.D., Maggi, L.B., Jr., Faubert, B., Villarino, A.V., O'Sullivan, D., Huang, S.C., van der Windt, G.J., Blagih, J., Qiu, J., *et al.* (2013). Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell* 153, 1239-1251.

Cho, J., Chang, H., Kwon, S.C., Kim, B., Kim, Y., Choe, J., Ha, M., Kim, Y.K., and Kim, V.N. (2012). LIN28A is a suppressor of ER-associated translation in embryonic stem cells. *Cell* 151, 765-777.

Chouchani, E.T., Pell, V.R., Gaude, E., Aksentijevic, D., Sundier, S.Y., Robb, E.L., Logan, A., Nadtochiy, S.M., Ord, E.N., Smith, A.C., *et al.* (2014). Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 515, 431-435.

Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Harris, M.H., Ramanathan, A., Gerszten, R.E., Wei, R., Fleming, M.D., Schreiber, S.L., and Cantley, L.C. (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452, 230-233.

Clough, J.R. (1985). Energy metabolism during mammalian embryogenesis. *Biochemical Society transactions* 13, 77-79.

Clough, J.R., and Whittingham, D.G. (1983). Metabolism of [¹⁴C]glucose by postimplantation mouse embryos in vitro. *Journal of embryology and experimental morphology* 74, 133-142.

Davis, A.C., Wims, M., Spotts, G.D., Hann, S.R., and Bradley, A. (1993). A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes & development* 7, 671-682.

De Bock, K., Georgiadou, M., Schoors, S., Kuchnio, A., Wong, B.W., Cantelmo, A.R., Quaegebeur, A., Ghesquiere, B., Cauwenberghs, S., Eelen, G., *et al.* (2013). Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell* 154, 651-663.

Denko, N.C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature reviews Cancer* 8, 705-713.

Dunwoodie, S.L. (2009). The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Developmental cell* 17, 755-773.

Eriksson, U.J. (2009). Congenital anomalies in diabetic pregnancy. *Seminars in fetal & neonatal medicine* 14, 85-93.

Folmes, C.D., Nelson, T.J., Martinez-Fernandez, A., Arrell, D.K., Lindor, J.Z., Dzeja, P.P., Ikeda, Y., Perez-Terzic, C., and Terzic, A. (2011). Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell metabolism* 14, 264-271.

Formentini, L., Sanchez-Arago, M., Sanchez-Cenizo, L., and Cuezva, J.M. (2012). The mitochondrial ATPase inhibitory factor 1 triggers a ROS-mediated retrograde prosurvival and proliferative response. *Molecular cell* 45, 731-742.

Gielchinsky, Y., Laufer, N., Weitman, E., Abramovitch, R., Granot, Z., Bergman, Y., and Pikarsky, E. (2010). Pregnancy restores the regenerative capacity of the aged liver via activation of an mTORC1-controlled hyperplasia/hypertrophy switch. *Genes & development* 24, 543-548.

Green, D.R., Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2014). Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science* 345, 1250-1256.

Gurtan, A.M., Ravi, A., Rahl, P.B., Bosson, A.D., JnBaptiste, C.K., Bhutkar, A., Whittaker, C.A., Young, R.A., and Sharp, P.A. (2013). Let-7 represses Nr6a1 and a mid-gestation developmental program in adult fibroblasts. *Genes & development* 27, 941-954.

Hacker, U., Nybakken, K., and Perrimon, N. (2005). Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nature reviews Molecular cell biology* 6, 530-541.

Hamilton, L.K., Dufresne, M., Joppe, S.E., Petryszyn, S., Aumont, A., Calon, F., Barnabe-Heider, F.,

Furtos, A., Parent, M., Chaurand, P., *et al.* (2015). Aberrant Lipid Metabolism in the Forebrain Niche Suppresses Adult Neural Stem Cell Proliferation in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Cell stem cell* 17, 397-411.

Harris, R.A., Bowker-Kinley, M.M., Huang, B., and Wu, P. (2002). Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex. *Advances in enzyme regulation* 42, 249-259.

Ho, P.C., Bihuniak, J.D., Macintyre, A.N., Staron, M., Liu, X., Amezcua, R., Tsui, Y.C., Cui, G., Micevic, G., Perales, J.C., *et al.* (2015). Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-tumor T Cell Responses. *Cell* 162, 1217-1228.

Iwafuchi-Doi, M., Matsuda, K., Murakami, K., Niwa, H., Tesar, P.J., Aruga, J., Matsuo, I., and Kondoh, H. (2012). Transcriptional regulatory networks in epiblast cells and during anterior neural plate development as modeled in epiblast stem cells. *Development* 139, 3926-3937.

Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y., *et al.* (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes & development* 12, 149-162.

Johnson, M.T., Mahmood, S., and Patel, M.S. (2003). Intermediary metabolism and energetics during murine early embryogenesis. *The Journal of biological chemistry* 278, 31457-31460.

Kaminski, M.M., Sauer, S.W., Kaminski, M., Opp, S., Ruppert, T., Grigaravicius, P., Grudnik, P., Grone, H.J., Krammer, P.H., and Gulow, K. (2012). T cell activation is driven by an ADP-dependent glucokinase linking enhanced glycolysis with mitochondrial reactive oxygen species generation. *Cell reports* 2, 1300-1315.

King, J.C. (2006). Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes. *Annual review of nutrition* 26, 271-291.

Korshunov, S.S., Skulachev, V.P., and Starkov, A.A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS letters* 416, 15-18.

- L'Honore, A., Commere, P.H., Ouimette, J.F., Montarras, D., Drouin, J., and Buckingham, M. (2014). Redox regulation by Pitx2 and Pitx3 is critical for fetal myogenesis. *Developmental cell* 29, 392-405.
- Larsson, N.G., Wang, J., Wilhelmsson, H., Oldfors, A., Rustin, P., Lewandoski, M., Barsh, G.S., and Clayton, D.A. (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nature genetics* 18, 231-236.
- Lauschke, V.M., Tsiarris, C.D., Francois, P., and Aulehla, A. (2013). Scaling of embryonic patterning based on phase-gradient encoding. *Nature* 493, 101-105.
- Le Belle, J.E., Orozco, N.M., Paucar, A.A., Saxe, J.P., Mottahedeh, J., Pyle, A.D., Wu, H., and Kornblum, H.I. (2011). Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. *Cell stem cell* 8, 59-71.
- Lee, D.C., Sohn, H.A., Park, Z.Y., Oh, S., Kang, Y.K., Lee, K.M., Kang, M., Jang, Y.J., Yang, S.J., Hong, Y.K., *et al.* (2015). A lactate-induced response to hypoxia. *Cell* 161, 595-609.
- Li, X., Weng, H., Xu, C., Reece, E.A., and Yang, P. (2012). Oxidative stress-induced JNK1/2 activation triggers proapoptotic signaling and apoptosis that leads to diabetic embryopathy. *Diabetes* 61, 2084-2092.
- Lindhurst, M.J., Fiermonte, G., Song, S., Struys, E., De Leonardis, F., Schwartzberg, P.L., Chen, A., Castegna, A., Verhoeven, N., Mathews, C.K., *et al.* (2006). Knockout of Slc25a19 causes mitochondrial thiamine pyrophosphate depletion, embryonic lethality, CNS malformations, and anemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 15927-15932.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.
- Lu, C., and Thompson, C.B. (2012). Metabolic regulation of epigenetics. *Cell metabolism* 16, 9-17.
- Lucitti, J.L., Jones, E.A., Huang, C., Chen, J., Fraser, S.E., and Dickinson, M.E. (2007). Vascular remodeling of the mouse yolk sac requires hemodynamic force. *Development* 134, 3317-3326.

- Lunt, S.Y., and Vander Heiden, M.G. (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annual review of cell and developmental biology* 27, 441-464.
- Luo, W., Hu, H., Chang, R., Zhong, J., Knabel, M., O'Meally, R., Cole, R.N., Pandey, A., and Semenza, G.L. (2011). Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 145, 732-744.
- Mamczur, P., Gamian, A., Kolodziej, J., Dziegiel, P., and Rakus, D. (2013). Nuclear localization of aldolase A correlates with cell proliferation. *Biochimica et biophysica acta* 1833, 2812-2822.
- Mantel, C.R., O'Leary, H.A., Chitteti, B.R., Huang, X., Cooper, S., Hangoc, G., Brustovetsky, N., Srour, E.F., Lee, M.R., Messina-Graham, S., *et al.* (2015). Enhancing Hematopoietic Stem Cell Transplantation Efficacy by Mitigating Oxygen Shock. *Cell* 161, 1553-1565.
- McCandless, D.W., and Scott, W.J. (1981). The effect of 6-aminonicotinamide on energy metabolism in rat embryo neural tube. *Teratology* 23, 391-395.
- McGrath, K.E., Koniski, A.D., Malik, J., and Palis, J. (2003). Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood* 101, 1669-1676.
- McKnight, S.L. (2010). On getting there from here. *Science* 330, 1338-1339.
- Merrins, M.J., Van Dyke, A.R., Mapp, A.K., Rizzo, M.A., and Satin, L.S. (2013). Direct measurements of oscillatory glycolysis in pancreatic islet beta-cells using novel fluorescence resonance energy transfer (FRET) biosensors for pyruvate kinase M2 activity. *The Journal of biological chemistry* 288, 33312-33322.
- Miura, G.I., and Treisman, J.E. (2006). Lipid modification of secreted signaling proteins. *Cell cycle* 5, 1184-1188.
- Mor, I., Cheung, E.C., and Vousden, K.H. (2011). Control of glycolysis through regulation of PFK1: old friends and recent additions. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 76, 211-216.

Morriss, G.M., and New, D.A. (1979). Effect of oxygen concentration on morphogenesis of cranial neural folds and neural crest in cultured rat embryos. *Journal of embryology and experimental morphology* 54, 17-35.

Muliyil, S., and Narasimha, M. (2014). Mitochondrial ROS regulates cytoskeletal and mitochondrial remodeling to tune cell and tissue dynamics in a model for wound healing. *Developmental cell* 28, 239-252.

Nakano, M., Imamura, H., Nagai, T., and Noji, H. (2011). Ca²⁺(+) regulation of mitochondrial ATP synthesis visualized at the single cell level. *ACS chemical biology* 6, 709-715.

New, D.A. (1978). Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 53, 81-122.

Nonomura, K., Yamaguchi, Y., Hamachi, M., Koike, M., Uchiyama, Y., Nakazato, K., Mochizuki, A., Sakaue-Sawano, A., Miyawaki, A., Yoshida, H., *et al.* (2013). Local apoptosis modulates early mammalian brain development through the elimination of morphogen-producing cells. *Developmental cell* 27, 621-634.

Owusu-Ansah, E., and Banerjee, U. (2009). Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* 461, 537-541.

Patra, K.C., and Hay, N. (2014). The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in biochemical sciences* 39, 347-354.

Peng, S., Chen, L.L., Lei, X.X., Yang, L., Lin, H., Carmichael, G.G., and Huang, Y. (2011). Genome-wide studies reveal that Lin28 enhances the translation of genes important for growth and survival of human embryonic stem cells. *Stem cells* 29, 496-504.

Pyrgaki, C., Trainor, P., Hadjantonakis, A.K., and Niswander, L. (2010). Dynamic imaging of mammalian neural tube closure. *Developmental biology* 344, 941-947.

Reers, M., Smiley, S.T., Mottola-Hartshorn, C., Chen, A., Lin, M., and Chen, L.B. (1995). Mitochondrial

membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods in enzymology* 260, 406-417.

San Martin, A., Ceballo, S., Baeza-Lehnert, F., Lerchundi, R., Valdebenito, R., Contreras-Baeza, Y., Alegria, K., and Barros, L.F. (2014). Imaging mitochondrial flux in single cells with a FRET sensor for pyruvate. *PloS one* 9, e85780.

San Martin, A., Ceballo, S., Ruminot, I., Lerchundi, R., Frommer, W.B., and Barros, L.F. (2013). A genetically encoded FRET lactate sensor and its use to detect the Warburg effect in single cancer cells. *PloS one* 8, e57712.

Shinoda, G., Shyh-Chang, N., Soysa, T.Y., Zhu, H., Seligson, M.T., Shah, S.P., Abo-Sido, N., Yabuuchi, A., Hagan, J.P., Gregory, R.I., *et al.* (2013). Fetal deficiency of lin28 programs life-long aberrations in growth and glucose metabolism. *Stem cells* 31, 1563-1573.

Shyh-Chang, N., and Daley, G.Q. (2013). Lin28: primal regulator of growth and metabolism in stem cells. *Cell stem cell* 12, 395-406.

Shyh-Chang, N., Daley, G.Q., and Cantley, L.C. (2013a). Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development* 140, 2535-2547.

Shyh-Chang, N., Zhu, H., Yvanka de Soysa, T., Shinoda, G., Seligson, M.T., Tsanov, K.M., Nguyen, L., Asara, J.M., Cantley, L.C., and Daley, G.Q. (2013b). Lin28 enhances tissue repair by reprogramming cellular metabolism. *Cell* 155, 778-792.

Steinhauser, M.L., Bailey, A.P., Senyo, S.E., Guillermier, C., Perlstein, T.S., Gould, A.P., Lee, R.T., and Lechene, C.P. (2012). Multi-isotope imaging mass spectrometry quantifies stem cell division and metabolism. *Nature* 481, 516-519.

Stern, C.D., Charite, J., Deschamps, J., Duboule, D., Durston, A.J., Kmita, M., Nicolas, J.F., Palmeirim, I., Smith, J.C., and Wolpert, L. (2006). Head-tail patterning of the vertebrate embryo: one, two or many unresolved problems? *The International journal of developmental biology* 50, 3-15.

Sugiura, Y., Honda, K., Kajimura, M., and Suematsu, M. (2014). Visualization and quantification of

cerebral metabolic fluxes of glucose in awake mice. *Proteomics* 14, 829-838.

Tanimura, T., and Shepard, T.H. (1970). Glucose metabolism by rat embryos in vitro. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 135, 51-54.

Tannahill, G.M., Curtis, A.M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E.M., McGettrick, A.F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N.J., Kelly, B., Foley, N.H., *et al.* (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature* 496, 238-242.

Tennessen, J.M., Baker, K.D., Lam, G., Evans, J., and Thummel, C.S. (2011). The *Drosophila* estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth. *Cell metabolism* 13, 139-148.

Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., and McKay, R.D. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448, 196-199.

Tian, W.N., Braunstein, L.D., Pang, J., Stuhlmeier, K.M., Xi, Q.C., Tian, X., and Stanton, R.C. (1998). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *The Journal of biological chemistry* 273, 10609-10617.

Tsialikas, J., and Romer-Seibert, J. (2015). LIN28: roles and regulation in development and beyond. *Development* 142, 2397-2404.

Turbow, M.M., and Chamberlain, J.G. (1968). Direct effects of 6-aminonicotinamide on the developing rat embryo in vitro and in vivo. *Teratology* 1, 103-108.

Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* 552, 335-344.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033.

Waddington, C. H., (1956). PRINCIPLES OF EMBRYOLOGY (New York: Macmillan).

Wales, R.G., Martin, K.L., and Leese, H.J. (1995). Glucose utilization by components of the mouse conceptus during early embryogenesis. *Journal of reproduction and fertility* *104*, 125-132.

Wang, R., Dillon, C.P., Shi, L.Z., Milasta, S., Carter, R., Finkelstein, D., McCormick, L.L., Fitzgerald, P., Chi, H., Munger, J., *et al.* (2011). The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity* *35*, 871-882.

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* *123*, 309-314.

Ward, P.S., and Thompson, C.B. (2012). Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer cell* *21*, 297-308.

Xie, Y., Zhang, J., Lin, Y., Gaeta, X., Meng, X., Wisidagama, D.R., Cinkornpumin, J., Koehler, C.M., Malone, C.S., Teitell, M.A., *et al.* (2014). Defining the role of oxygen tension in human neural progenitor fate. *Stem cell reports* *3*, 743-757.

Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Takemoto, K., Kuida, K., Yosida, H., and Miura, M. (2011). Live imaging of apoptosis in a novel transgenic mouse highlights its role in neural tube closure. *The Journal of cell biology* *195*, 1047-1060.

Yamamoto, T., Takano, N., Ishiwata, K., Ohmura, M., Nagahata, Y., Matsuura, T., Kamata, A., Sakamoto, K., Nakanishi, T., Kubo, A., *et al.* (2014). Reduced methylation of PFKFB3 in cancer cells shunts glucose towards the pentose phosphate pathway. *Nature communications* *5*, 3480.

Yanes, O., Clark, J., Wong, D.M., Patti, G.J., Sanchez-Ruiz, A., Benton, H.P., Trauger, S.A., Despons, C., Ding, S., and Siuzdak, G. (2010). Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation. *Nature chemical biology* *6*, 411-417.

Yang, P., Li, X., Xu, C., Eckert, R.L., Reece, E.A., Zielke, H.R., and Wang, F. (2013). Maternal hyperglycemia activates an ASK1-FoxO3a-caspase 8 pathway that leads to embryonic neural tube defects.

Science signaling 6, ra74.

Yang, W., Xia, Y., Ji, H., Zheng, Y., Liang, J., Huang, W., Gao, X., Aldape, K., and Lu, Z. (2011). Nuclear PKM2 regulates beta-catenin transactivation upon EGFR activation. *Nature* 480, 118-122.

Yang, X., Borg, L.A., and Eriksson, U.J. (1995). Altered mitochondrial morphology of rat embryos in diabetic pregnancy. *The Anatomical record* 241, 255-267.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.

Zhao, Z., and Reece, E.A. (2013). New concepts in diabetic embryopathy. *Clinics in laboratory medicine* 33, 207-233.

Zhou, X., and Anderson, K.V. (2010). Development of head organizer of the mouse embryo depends on a high level of mitochondrial metabolism. *Developmental biology* 344, 185-195.

Zhu, H., Shah, S., Shyh-Chang, N., Shinoda, G., Einhorn, W.S., Viswanathan, S.R., Takeuchi, A., Grasemann, C., Rinn, J.L., Lopez, M.F., *et al.* (2010). Lin28a transgenic mice manifest size and puberty phenotypes identified in human genetic association studies. *Nature genetics* 42, 626-630.

Zhu, H., Shyh-Chang, N., Segre, A.V., Shinoda, G., Shah, S.P., Einhorn, W.S., Takeuchi, A., Engreitz, J.M., Hagan, J.P., Kharas, M.G., *et al.* (2011). The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell* 147, 81-94.

Zohn, I.E., and Sarkar, A.A. (2010). The visceral yolk sac endoderm provides for absorption of nutrients to the embryo during neurulation. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 88, 593-600.

謝辞

本論文の完成までに終始ご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室の三浦正幸教授に心より深い尊敬と感謝の念を表します。

本研究の遂行と本論文の執筆に際して、直接の指導者として実験の心構えから直接の実験手技に関するまで熱心にご指導、ご助言を下さりました東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室の山口良文助教に心より感謝いたします。

本研究の遂行に際し、多くの有益なご助言と暖かい励ましを賜りました東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室の小幡史明元特任助教（現フランシスクリック研究所所属）、古藤日子助教、勝山朋紀助教、倉永英里奈元講師（現理化学研究所発生・再生科学総合研究センター所属）、千原崇裕准教授に深く感謝いたします。

本研究のグルコースフラックス解析にご協力いただいた、慶應義塾大学医学部の末松誠教授、杉浦悠毅博士、本田久楽々さんにこの場を借りて深く感謝いたします。また同大学の山本雄広博士には酵素活性測定に際して有益なご助言を賜りましたのでこの場を借りて深く感謝いたします。

本研究の研究材料である GO-ATeam2 トランスジェニックマウスをご提供頂いた京都大学大学院医学系研究科の山本正道博士にこの場を借りて御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し有益なご助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科分子生物学教室の後藤由季子教授にこの場を借りて御礼申し上げます。また同研究室の岸雄介先生には、子宮への JC-1 色素注入実験に関して有用なご助言を頂きましたのでこの場を借りて御礼申し上げます。

本研究の研究材料である EpiSCs を分与して下さった Oxford University（現 Case Western Reserve University）の Paul Tesar 博士にこの場を借りて御礼申し上げます。

そして終始暖かい励ましとご協力を賜りました東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室の皆様にも心より御礼申し上げます。