

論文の内容の要旨

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

【背景と目的】

細胞増殖・分化等の生命現象を制御する因子として近年、細胞のエネルギー代謝状態が注目されている。哺乳類器官形成初期には劇的な細胞増殖・分化が生じるとともに、胚を囲む子宮内環境が胎盤接続に伴い変化する。この時期の胚は生育環境の変化によるエネルギー代謝状態の攪乱に脆弱であり、またエネルギー代謝制御因子の変異体の多くが器官形成初期に致死となることから、エネルギー代謝状態の適切な制御がこの時期の胚発生に必須と考えられる。しかしこれまでのところ、この時期に生じるエネルギー代謝状態変化の実体およびその生理的意義は不明であった。そこで本研究では、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機構の解明、および器官形成初期胚で生じるエネルギー代謝状態変化の様式とその制御機構の解明を目指した。

【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

器官形成初期には中枢神経系形成の最初期過程である神経管閉鎖が進行する（マウス胎生 8.5-9.5 日）。本来低酸素下で発生する神経管閉鎖期胚を高酸素下で培養すると神経管閉鎖障害を示し、このときミトコンドリアが低酸素培養時よりも発達したクリステを示すことが先行研究で報告されており、このことは環境攪乱に対する胚の脆弱性にミトコンドリアエネルギー代謝状態の変化が関わる可能性を示唆する。本学修士課程において私は、生体内より高い酸素下（21% O₂）での *ex vivo* 培養系において胎生 8.5 日胚の神経板が非神経外胚葉領域よりも高いミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) を示すことを見出していた。そこで *in vivo* での $\Delta\Psi_m$ を調べる目的で $\Delta\Psi_m$ センサー JC-1 を用いた胚の染色を妊娠マウスの子宮内で行ったところ、胎生 8.5 日胚の神経板は *ex vivo* で染色を行った場合と異なり低い $\Delta\Psi_m$ を示した。一方、胎生 8.0 日胚の神経板は高酸素下においても低い $\Delta\Psi_m$ を示すことが私の本学修士課程の結果から示されていた。以上の結果は、胚体外環境変化に対する神経板のミトコンドリアエネルギー代謝状態の応答性が胎生 8.0-8.5 日にかけて変化することを示唆する。

次に、*ex vivo* での $\Delta\Psi_m$ 上昇の原因解明を目指した。低酸素から高酸素への移行は虚血再

灌流でみられるよう酸化ストレスが生じる可能性があることから、 $\Delta\Psi_m$ に対する酸化ストレスの影響を検討した。抗酸化剤 N-acetylcysteine で胎生 8.5 日胚を処理したところ、神経板の $\Delta\Psi_m$ が抑制された。この結果は、酸化ストレスが $\Delta\Psi_m$ 上昇に寄与することを示唆する。

そこで次に、高酸素下での *ex vivo* 培養が胎生 8.5 日胚において酸化ストレスにつながる機構の解明を目指した。*ex vivo* 培養系 (21% O₂) での短時間培養により ATP 含有量が胎生 8.5 日胚で有意に増加した一方、胎生 7.5 日と胎生 9.5 日の胚では変化しなかった。この結果は、発生ステージ間で酸素濃度変化に対する胚の応答性が異なることを示唆する。そこで次に、酸素濃度がエネルギー代謝状態に与える影響を安定炭素同位体標識グルコース (¹³C₆-glucose) を用いた代謝フラックス解析により検討した。解糖系最終代謝産物である乳酸の産生が胎生 8.5 日胚において高酸素下で減少した一方、胎生 9.5 日と胎生 10.5 日の胚では酸素濃度の影響を大きく受けなかった。一方、TCA 回路の入り口にあたるクエン酸の産生は、胎生 8.5-10.5 日胚全てにおいて高酸素下で増加した。胎生 8.5 日胚のミトコンドリア電子伝達系 (ETC) が機能的に未成熟であることが私の本学修士課程の研究から示唆されていた。したがって高酸素下での $\Delta\Psi_m$ 上昇の機構として、酸素濃度の変化に応じて TCA 回路の亢進が生じると、NADH/FADH₂ の産生増加が未熟な ETC の過負荷につながり、それが酸化ストレスおよび $\Delta\Psi_m$ 上昇を惹起する、というモデルが考えられる。

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

哺乳類器官形成初期には絨毛尿膜循環 (CC: chorioallantoic circulation) 確立に伴い母体から胚への酸素・栄養供給が増えることから、CC 確立に伴う子宮内環境変化が内因性酸化ストレスを惹起し、それが胚のエネルギー代謝状態変化を誘導する可能性がある。私は本学修士課程のメタボローム解析の結果から、この時期に解糖系と TCA 回路の活性が亢進する可能性を見出していたものの、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り、代謝経路活性を必ずしも反映しない。そこで代謝経路活性を直接評価する目的で、胚での乳酸およびクエン酸の産生を ¹³C₆-glucose を用いた代謝フラックス解析により調べたところ、どちらの産生も胎生 8.5-10.5 日にかけて増加した。以上の結果は、器官形成初期に解糖系と TCA 回路の活性が亢進することを示唆する。

一方、解糖系の亢進と矛盾して、PFK-1 が触媒する反応を起点に解糖系の流れが低下する可能性もメタボローム解析で見出していたので、次にこの点を検討した。その結果、PKF-1 と Aldolase の遺伝子発現および酵素活性が胎生 8.5-10.5 日にかけて減少することが明らかとなった。Aldolase 抑制が PFK-1 抑制よりも早い時期におこり、活性抑制の程度が PFK-1 よりも大きかったことから、Aldolase の制御がこの時期の解糖系流路の制御に重要と考えられる。そこで器官形成初期に発現する主要な Aldolase である Aldolase a の発現パターンを

whole-mount *in situ* hybridization により調べた。Aldolase a は胎生 8.5 日胚では全身で高発現しているが、その後発生に伴い胚の後方側へと限局していった。以上の結果は、器官形成初期には解糖系の流れが胚の前後軸に沿って減速することを示唆する。

器官形成初期には解糖系（乳酸産生）の亢進が生じることから、上記の結果は解糖系の流れが PFK-1/Aldolase が触媒する反応を迂回しながら維持されることを示唆する。その 1 つのモデルとして、核酸等の生体構成因子合成および細胞の酸化還元状態の維持に重要なペントースリン酸経路（PPP）へのグルコース流量の増加が考えられる。実際、PPP 代謝産物の 1 つであるセドヘプツロース-7-リン酸の量が胎生 8.5-9.5 日にかけて有意に増加した。よって、哺乳類器官形成初期にはグルコース代謝亢進に伴い解糖系流路が再編成され、PPP へのグルコース流量が増加することが示唆される。

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

ヘテロクロニック遺伝子 *Lin28* は *let-7* microRNAs 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。*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すことが先行研究で報告されていたことから、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として *Lin28a* に着目した。定量 PCR の結果、胎生 8.5-9.5 日にかけて *Lin28a* の発現が劇的に減少するとともに *let-7* microRNAs の発現が劇的に増加することが明らかとなった。そこで私は、ドキシサイクリン（Dox）依存的に *Lin28a* を過剰発現させることの出来る *tetO-Lin28a* トランスジェニックマウスを用い、時期特異的な *Lin28a* 過剰発現が正常発生に及ぼす影響を調べた。胎生 8.5 日および胎生 9.5 日に Dox を投与したところ、*tetO-Lin28a* トランスジェニックマウスは形態学的な異常を特に示さないにもかかわらず出生直後に致死となった。

【まとめと考察】

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。 $\Delta\Psi_m$ が高い状態は酸化ストレスのリスクが高いことから、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み発生異常を引き起こすと考えられる。また、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が明らかとなった。さらに重要なことに、器官形成初期にはグルコース代謝亢進に伴い解糖系流路が再編成され、PPP へのグルコース流量が増加することも本研究により明らかとなった。器官形成初期に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進行することから、バイオマス産生を亢進させる

ことに加え、酸化的リン酸化亢進に伴う酸化ストレスを防ぐことが正常発生に必須である。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 の産生のみならず核酸合成にも寄与していることから、PPP 亢進はこの時期の胚発生を支える上で重要と考えられる。以上の成果は、器官形成初期における代謝と発生と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。今後は、時期特異的な **Lin28a** 過剰発現が致死性につながる原因を探るとともに、器官形成初期に生じるエネルギー代謝状態変化の制御機構解明を目指す。