

審査の結果の要旨

氏名 宮沢英延

本論文は、哺乳類器官形成初期の胚において環境攪乱が発生異常につながる機構、および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に関する研究成果を述べたものである。高酸素条件や高グルコース条件への暴露が器官形成初期の胚において神経管閉鎖不全につながる機構は不明である。また、胚のエネルギー代謝状態が発生と協調して変化することが正常発生に必須と考えられるものの、器官形成初期胚で生じるエネルギー代謝状態変化も不明な点が多い。学位申請者はミトコンドリア膜電位センサーを用いた解析により、環境攪乱が脆弱性につながる機構として、神経板での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見出した。さらに申請者は、近年急速に発達した質量分析系の技術を用いることで、マウス器官形成初期胚で生じるエネルギー代謝状態変化を詳細に明らかにした。

器官形成初期には中枢神経系の形成に必須な神経管閉鎖過程が進行する（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の胚を高酸素下で培養すると神経管閉鎖障害を示し、その原因として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が先行研究で示唆されていた。そこで申請者は、ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) センサー JC-1 を用いた胚の染色を *in vivo* (低酸素条件) および *ex vivo* (高酸素条件) で行うことで、胎生 8.5 日胚の神経板の $\Delta\Psi_m$ が胚体外環境変化に敏感に応答して変化することを見出した。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を惹起する可能性があることから、申請者は酸化ストレスと $\Delta\Psi_m$ との関連を検討し、抗酸化剤 N-acetylcysteine が *ex vivo* 培養時に生じる神経板の $\Delta\Psi_m$ 上昇を抑えることを明らかにした。以上の結果は、環境変化により惹起される酸化ストレスが胎生 8.5 日胚の神経板においてミトコンドリアエネルギー代謝状態の変化を誘導することを示唆する。次に申請者は、酸素濃度変化がエネルギー代謝状態に与える影響を安定炭素同位体 (^{13}C) 標識グルコースを用いた代謝フラックス解析を用いて検討することで、高酸素下で TCA 回路活性が亢進することを見出した。申請者は、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可能性を本学修士課程の研究で見出していたことから、環境変化が酸化ストレスを惹起する機構として次のモデルを提唱した。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 の過負荷を生み、それが酸化ストレスにつながる。

また申請者は本学修士課程に行ったメタボローム解析の結果から、マウス器官形成初期の胚において解糖系および TCA 回路活性が亢進する可能性を見出していた。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、代謝経路活性を反映しない可能性があることから、申請者は $^{13}\text{C}_6\text{-glucose}$ を用いた代謝フラックス解析により代謝経路活性を直接評価し、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を明らかにした。

また申請者は、この時期に解糖系が亢進するにもかかわらず、解糖系酵素である 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。この可能性を検討する目的で、申請者は解糖系酵素の活性変化を生化学的に評価し、器官形成初期には解糖系酵素の PFK-1 および Aldolase の活性が実際に低下することを見出した。さらに申請者は、PFK-1 および Aldolase の活性が低下した状況で解糖系（乳酸産生）を維持する機構として、解糖系の流れが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を迂回するように再編成されるというモデルを提案し、ペントースリン酸経路の代謝産物の 1 つであるセドヘプツロース-7-リン酸の量が実際に器官形成初期に増加することを質量分析系を用いた解析により見出した。

最後に申請者は、マウス器官形成初期に生じる胚のエネルギー代謝状態変化の制御因子としてヘテロクロニック遺伝子である *Lin28a* および *let-7* microRNA に着目し、これらの遺伝子の発現が器官形成初期にダイナミックに変動することを定量 PCR により見出した。そこで申請者は、時期特異的な *Lin28a* 過剰発現マウスの解析を進め、器官形成初期に一過的に *Lin28a* を過剰発現すると胚が出生直後に致死となることを見出した。申請者は現在、一過的な *Lin28a* の過剰発現が器官形成初期に生じるエネルギー代謝状態変化に与える影響を検討するとともに、致死の原因を探索している。

以上、本論文で申請者は哺乳類器官形成初期の胚において環境攪乱が神経管閉鎖不全につながる機構として、神経板での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。さらに申請者は、哺乳類器官形成初期の胚においてグルコース代謝の亢進に伴って解糖系流路が再編成されることを明らかにするとともに、このエネルギー代謝状態変化に *Lin28a/let-7* 経路が関与する可能性も見出した。以上の成果は、遺伝学的要因によらない先天奇形の発症機構解明につながる可能性のある重要な成果であるとともに、哺乳類器官形成初期に生じるエネルギー代謝状態変化に関する古典的モデルを刷新する重要な成果であり、代謝と発生との関係解明を進める上での基盤となると考えられる。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。