

論文内容の要旨

論文題目

*Xenopus* Glucose transporter 1 (xGLUT1) is required for cell movement  
in *Xenopus laevis*

(ツメガエル胚発生における細胞運動に対するグルコーストランスポーター1の機能解析)

氏名 須澤 佳子

<背景と目的>

細胞膜に存在する膜タンパク、グルコーストランスポーター (GLUT) は、細胞内外の濃度差を利用して細胞内に受動的に糖を取り込む促進拡散型の糖輸送体であり、生体へのエネルギー供給と細胞の生存に大変重要な役割を果たしている。GLUT ファミリーの輸送体は12回膜貫通型の構造をとり、哺乳類で現在14種が報告されており、それぞれ基質となる糖との親和性や組織への分布特性が異なることが知られている。

GLUT1 は GLUT ファミリーの代表的な糖輸送体で、主にグルコースを輸送する。GLUT1 は多くの組織に広く分布しており、ヒトでは主に赤血球、脳、胎盤、腎臓、癌化組織などで発現している。ヒトにおける GLUT1 異常は先天性脳疾患や代謝異常、糖尿病、癌などと関連することが報告されている。GLUT1 遺伝子の欠損により中枢神経系に重い障害が生じることが知られており、脳を中心とした神経系の細胞がエネルギー源である糖を取り込むためには GLUT1 が必須であり、

GLUT1 は神経系の発達や神経組織の生存維持に不可欠な因子であることが報告されてきた。しかし、神経系が形成される以前、つまり初期胚発生における GLUT1 の機能についてはこれまでほとんど研究されてこなかった。

近年、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) において、GLUT1 の相同因子 (xGLUT1) が、Activin/Nodal シグナルの下流で発現するという報告がなされた。Activin/Nodal シグナルは、中胚葉を誘導するための重要なシグナル経路であることから、中胚葉形成への xGLUT1 の関与が予想された。本研究において私は、アフリカツメガエル初期発生をモデルに、モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) を用いた xGLUT1 の機能阻害実験により、初期形態形成における xGLUT1 の機能を解析することを試みた。

## <結果>

### 1. xGLUT1 の Activin 応答と発現パターン

私はまず、アニマルキャップアッセイにより、xGLUT1 がアクチビン処理によって発現が上昇する因子であることを確認した。次に RT-PCR により、xGLUT1 は中胚葉誘導後である後期胞胚期から発現が上昇し、以後どの発生段階でもほぼ同じレベルの発現を維持し続けることがわかった。また Whole mount *in situ* hybridization により、xGLUT1 mRNA はツメガエルの原腸形成期において、原口上唇部を中心とする背側中胚葉領域に強く発現することが示された。胚内でのこの発現パターンは Activin/Nodal シグナルの下流の因子として知られる中胚葉マーカーである *chd* や *gsc* の発現パターンと類似していたことより、xGLUT1 と中胚葉形成との関連が予想された (図 1A)。さらに、神経板誘導後の神経領域周辺では、中軸中胚葉やそれに接する神経板に (図 1B)、また神経管閉鎖後では、神経管の腹側部分に xGLUT1 が局在していることが確認された (図 1C)。ボディパターン形成が終了した初期幼生期では、xGLUT1 は主に目、セメント線、体節、神経管へ局在することが確認された (図 1D)。これらの部位は、哺乳類において GLUT1 の発現が報告されている組織と一致していた。

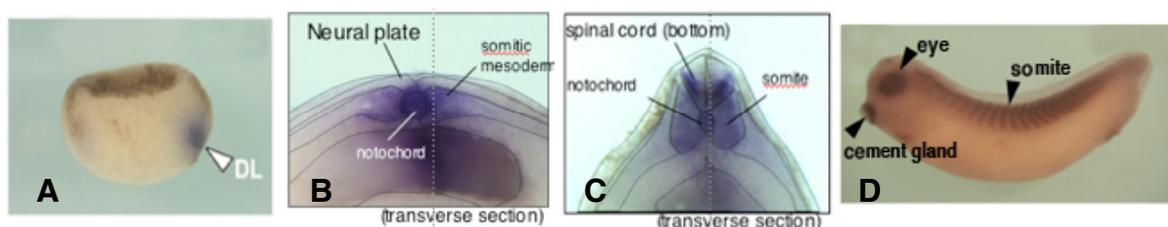


図 1. xGLUT1 mRNA の発現パターン (A) 初期原腸胚 (B) 神経板形成期 (C) 神経管閉鎖後 (D) 初期幼生

### 2. xGLUT1 の阻害が原腸陥入運動に及ぼす影響

原腸形成は、脊椎動物の発生過程に起こるダイナミックな細胞の移動である。原腸形成は中胚葉誘導後に起こり、後のボディパターン形成に非常に重要な役割を担っている。脊椎動物における原腸形成は、主に3つの動きから構成されており、それぞれ、予定外胚葉領域における覆い被せ運動 (epiboly)、中胚葉領域の背側帯域で始まる内部移行 (invagination)、原腸陥入に

伴って伸長する中胚葉領域の収斂伸長運動 (convergent extension) と呼ばれている。

本研究では、原腸胚期に中胚葉領域に局在する xGLUT1 の機能を調べるため、xGLUT1 に対するモルフォリノオリゴ (MO) を作成し、xGLUT1 の機能阻害実験を行った。予定表皮領域、予定内胚葉領域への MO の注入では顕著な影響が見られなかったが、予定背側中胚葉領域への注入は著しい形態形成異常を引き起こした。背側帯域へ MO を注入した胚では、原口閉鎖の阻害と原腸陥入の異常による体軸の縮小、頭部構造の欠損が観察された。組織切片の観察により、MO 注入胚から切り出した原口上唇部では、中胚葉壁の肥厚と細胞間隙の増加が観察された。

### 3. xGLUT1 が神経管の閉鎖に及ぼす影響

収斂伸長運動は、中胚葉領域の陥入だけではなく、予定神経領域の伸長と神経管の閉鎖にも関わることが知られている。xGLUT1 の収斂伸長運動への関与を裏付けるため、MO を予定神経領域である背側動物極へ注入した。MO 注入胚では、中枢神経系と頭部構造が完全に欠損し、注入部に特異的な神経管の閉鎖阻害が確認された (図 2)。以上より xGLUT1 は原腸陥入だけではなく神経管閉鎖期においても収斂伸長運動を通じて胚の形態形成に関与していることが示唆された。

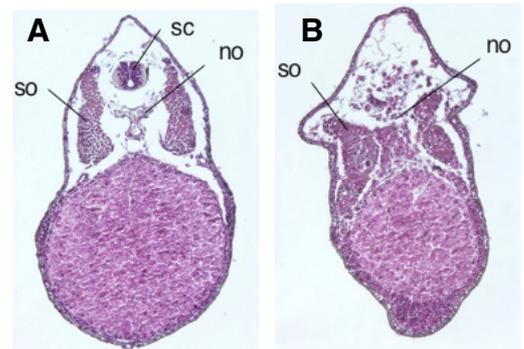


図 2. xGLUT1MO 注入により生じた神経管を欠損した胚 (B) と正常胚 (A)  
sc:spinal cord, so:somite, no:notochord.

### 4. xGLUT1 の阻害と中胚葉の誘導

正常な原腸陥入運動が起こるためには、中胚葉の誘導と細胞の移動の制御が正しく行われることが必要とされている。しかし MO 注入胚では、コントロール胚と比べて中胚葉マーカーの発現には顕著な違いは見られなかった。また MO 注入を行ったアニマルキャップをアクチビン処理したところ、アニマルキャップの伸長は抑制されたが中胚葉マーカーの誘導は MO の影響を受けないことが明らかになった。上記の結果より、xGLUT1 の阻害は中胚葉の誘導へは影響せず、細胞の移動に関わることが示唆された。

### 5. xGLUT1 と細胞移動

以上の結果より、xGLUT1 が収斂伸長運動に関与する可能性が示唆されたため、私は次に、収斂伸長運動への xGLUT1 の関与の可能性を調べた。収斂伸長運動は、双極化した細胞が横軸方向に相互に入り込むことによって生じる (図 3)。まず背側帯域のサンドイッチ外植体を作製したところ、xGLUT1MO は収斂伸長

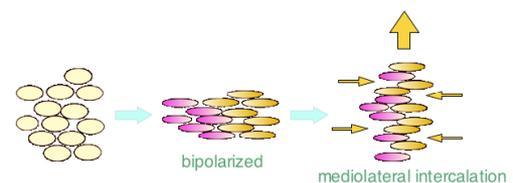
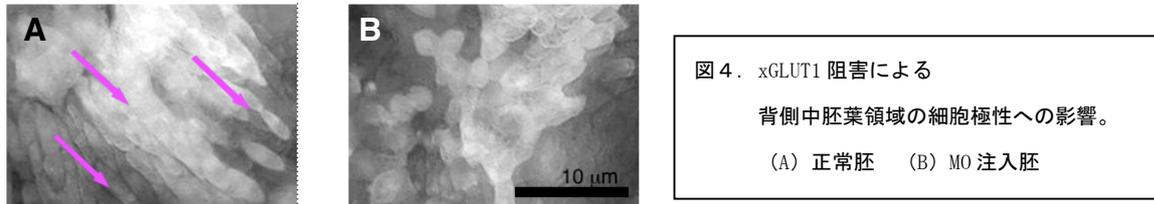


図 3. 収斂伸長運動における細胞の動き

運動による外植体の伸長を抑制することが示された。さらに私は接着培養した背側帯域内の細胞の動きを撮影し、xGLUT1MO による収斂伸長運動の阻害がどのように行われているかを観察した。コントロール外植体内では切り出し後約 4 時間で細胞は双極化し、極性に沿った一方向な細胞の移動が観察された (図 4A)。一方、xGLUT1 の機能を阻害した胚の原口上唇部では、細胞の極性が

消失し、細胞の形は丸いままで、方向性のある移動は観察されず、細胞は一カ所をランダムに巡回するような動きを見せた(図 4B)。この結果から、xGLUT1MO 注入胚では xGLUT1 の阻害によって細胞の極性と運動性が抑制されていたと考えられる。以上の結果より xGLUT1 は原腸形成期の背側中胚葉領域において、細胞極性の制御を通じて、収斂伸長運動に必須の因子であることが示唆された。



### <考察>

本研究では、糖輸送に関わる膜タンパクである xGLUT1 が Activin/Nodal シグナルの下流で発現することを示した。さらに xGLUT1 がアフリカツメガエル初期発生において原腸陥入時の収斂伸長運動に必須の因子であることを示した。

xGLUT1 が細胞極性を制御するメカニズムについては、2つの可能性が考えられる。一つ目は xGLUT1 が糖の取り込みを介して、運動に必要なエネルギーを供給しているという可能性である。収斂伸長運動は大規模な細胞運動であり、膨大なエネルギーを必要とする。過去の知見により原腸陥入が起こる背側帯域は胚内でもとくに解糖が盛んであるとされており、この部位は今回解析した xGLUT1 が局在する部位と一致している。またもう一つの可能性は、GLUT1 の C 末に存在する PDZ 結合領域が細胞内骨格や細胞間結合と相互作用することにより Wnt/PCP シグナル伝達系に関与する可能性である。動物の発生において、Wnt/PCP シグナル伝達系は収斂伸長運動と深く関わることが知られており、PCP 関連因子の多くが PDZ 領域や PDZ 結合領域を持つことが報告されている。

これまで GLUT1 の研究の多くが神経管の閉鎖後の胚もしくは出生後の個体について行われてきたが、本研究によって、xGLUT1 の発現が Activin/Nodal シグナルによって誘導されること、また、MO による xGLUT1 の機能阻害によって細胞極性の異常と原腸陥入の阻害が引き起こされることが示された。これらの結果より、GLUT1 は神経管が閉鎖する以前、中胚葉誘導が起こる時期から機能を開始していることが明らかになった。本研究の結果、神経管閉鎖以前の初期胚発生において xGLUT1 は背側中胚葉領域の細胞の極性を制御することで、正常な収斂伸長運動を引き起こし、続く原腸陥入運動を正常に進ませ、さらに、正常な神経管の形成に深く関わっていることが推測された。従来の GLUT1 の研究では、臨床学的な観点から糖輸送を通じた神経系の発達についての研究が数多く行われてきた。しかし、本研究では、神経形成期以前の初期胚発生において GLUT1 がボディパターン形成へ関与することを初めて示し、糖輸送に関わる因子と初期発生との間に未知の様々な関連が存在する可能性を提示した。