

## 42. 新生仔期グリコーゲン代謝を介した終脳発生機構の解明

後藤 仁志

Key words : グリコーゲン, 代謝, 発生, 大脳皮質

京都府立医科大学 大学院医学研究科  
神経発生生物学

### 緒 言

グリコーゲンは、グルコースで構成された細胞内多糖類である。グリコーゲンは肝臓や筋肉などの末梢組織に多く含まれており、エネルギー枯渇時や運動時のエネルギー供給源として使用されることが知られている。中枢神経は、グリコーゲンが存在する組織であるが、前者と比較してその機能は不明な点が多い。発生時期の中枢神経、とりわけ大脳皮質において、神経幹細胞として働く放射状グリア細胞がグリコーゲンを有することが知られているが、発生時期を追った変化やその機能は不明であった。

本研究では、発生期、特に新生仔期におけるグリコーゲンの生理的機能についてその一端を明らかとしたので報告する。

### 方法および結果

#### 1. グリコーゲンは発生期大脳皮質の RMS 領域のアストロサイト系譜細胞に特に豊富に存在している

発生期におけるグリコーゲンの局在を明らかとするために、古典的な Periodate Acid Schiff (PAS) 染色を行った (図 1)。その結果、グリコーゲンは胎生 16 日齢より脳実質に存在が認められた。発生期を通じてその局在領域は大脳皮質の腹側-背側の境界領域 (以降 subventricular zone: SVZ と略す。) に多く集積していることが認められた。この領域は、成体において神経新生がおこる Rostral migratory stream (RMS) にあたる部位であることが考えられるため、胎児脳を矢状断にしたのちに解析を行ったところ、RMS に沿って局在していることが明らかとなった。また、グリコーゲンに対する抗体を用いた二重組織染色の結果から、Tuj1 陽性の神経細胞ではなく、GLAST 陽性のアストロサイト系譜細胞が、グリコーゲンを豊富に蓄積していることが明らかとなった。

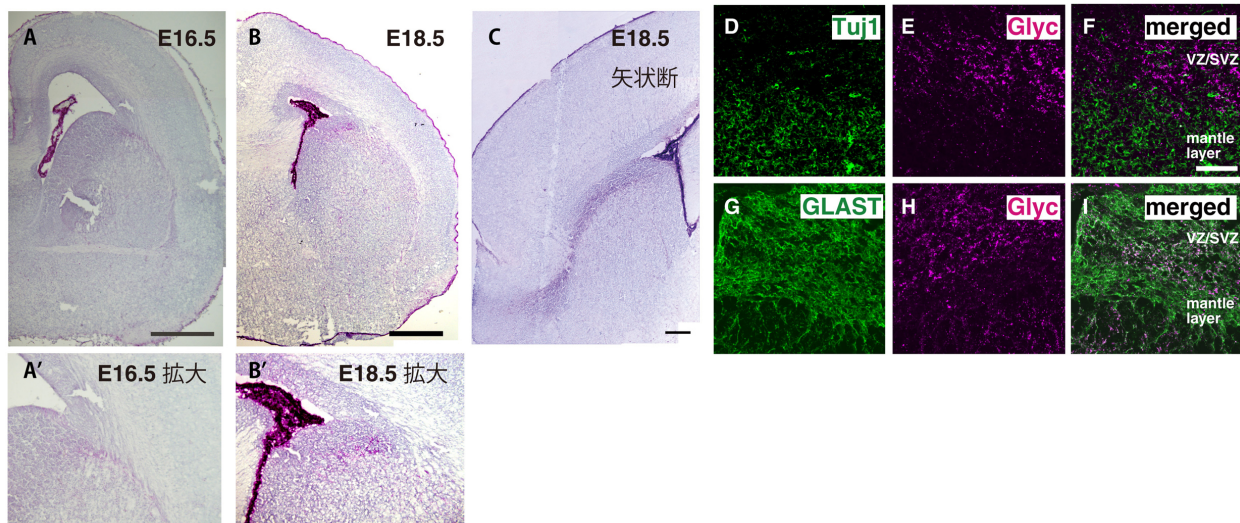


図1. 発生期大脳皮質におけるグリコーゲンの局在.

A-C) PAS 染色によるグリコーゲン染色. A, B は環状断にした切片を, C は矢状断にした切片をそれぞれ染色した. 大脳皮質腹側-背側境界領域のグリコーゲンが蓄積する領域を A' と B' で拡大している. スケールバーは  $100\mu\text{m}$  を示している. D-I) グリコーゲン抗体を用いた二重染色. 胎生 18.5 日齢の切片を, グリコーゲンと Tuj1 (D-F) あるいは, グリコーゲンと GLAST (G-I) を用いて染色し, 大脳皮質腹側-背側境界領域を示している. グリコーゲンは GLAST 陽性のアストロサイトと共局在している. スケールバー:  $50\mu\text{m}$ .

## 2. グリコーゲンは新生仔期に glycogen phosphorylase によって分解されて使用される

マウスなどの哺乳類では, 出生後に栄養環境が変化する. グリコーゲンの新生仔期における局在および変化を明らかにするため, 上記と同様の解析を行った. 新生仔期の SVZ におけるグリコーゲン免疫染色陽性像は胎生後期のそれと比較して減弱していた (図 2A-F). 更にそれぞれのステージの脳抽出物より, グリコーゲンを生化学的に定量を行うと, 胎生期と比べて新生仔期のグリコーゲンが減少していることが明らかとなった (図 2G). 更に, グリコーゲン利用酵素であるグリコーゲンホスホリラーゼの活性を生化学的に解析したところ, 酵素活性が生後に上昇していることが明らかとなった (図 2H). これらのことから, 生後まもなくグリコーゲンホスホリラーゼが活性化し, グリコーゲンを使用していることが明らかとなった.

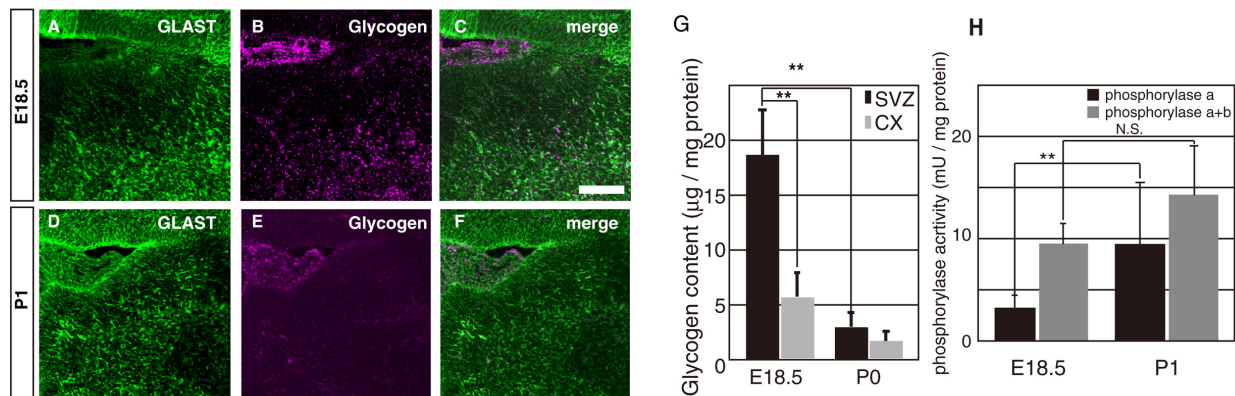


図2. 新生仔期におけるグリコーゲンの利用.

A-F) グリコーゲンと GLAST による二重染色. 胎生 18 日齢 (A-C) および出生直後 (P0) の切片を GLAST (緑) とグリコーゲン (赤) によって二重染色した. P0 ではグリコーゲン免疫陽性像が減弱している. スケールバーは  $50\ \mu\text{m}$  を示す. G) グリコーゲンの生化学的定量. 胎生 18.5 日および出生直後の大脳皮質 (CX) および SVZ より脳抽出物を調製し, グリコーゲン量を定量した. また, それぞれのタンパク質濃度を定量し, グリコーゲン量/タンパク質量の値をグラフ化した (\*\* $p < 0.01$ : one-way ANOVA). H) グリコーゲンホスホリラーゼの活性の変化. それぞれの発生期の脳抽出物より, タンパク質量あたりのグリコーゲンホスホリラーゼの活性を測定した. グリコーゲンホスホリラーゼには, 活性型タイプ (phosphorylase a) と, 低活性型タイプ (phosphorylase b) が存在し, 両者は相互変換される. 黒棒は, 活性型グリコーゲンホスホリラーゼ (phosphorylase a) を, 灰色は, トータルのグリコーゲンホスホリラーゼ活性 (phosphorylase a+b) を示す (\* $p < 0.05$ : t-test).

### 3. グリコーゲンホスホリラーゼを阻害すると, 細胞増殖の減少が認められる

近年, 細胞内エネルギー代謝は細胞周期の調節機構と密接に関わることが報告されている. そこで, 初代培養アストロサイトにグリコーゲンホスホリラーゼの siRNA を導入し, EdU で短時間処理することによって S 期の細胞を標識した. その結果, グリコーゲンホスホリラーゼをノックダウンすると細胞増殖が抑制されることを見出した. また, *in vivo* で同様の現象が認められるか否かを解析するために, 出生直後の側脳室にグリコーゲンホスホリラーゼの阻害剤である DAB を注入し, 2 日後の増殖細胞を解析した. その結果, SVZ 領域においてリン酸化ヒストン H3 陽性の M 期の細胞が減少していた. これらのことからグリコーゲン利用が新生仔期における細胞増殖の維持に必要であることが示唆される.

グリコーゲン利用阻害による増殖細胞の減少の分子機構を解析するため, siRNA を導入した初代培養アストロサイトより cDNA を調製し, リアルタイム PCR 法によって細胞周期阻害タンパク質の遺伝子発現を解析した. 細胞周期阻害タンパク質には Ink ファミリーと Cip/Kip ファミリーのものが存在するが, 後者に属する p27 や p21 といった遺伝子の発現上昇が認められた. これらのことから, グリコーゲン利用を阻害すると細胞周期阻害タンパク質の発現を誘導することにより, 細胞増殖を調節していることが明らかとなった.

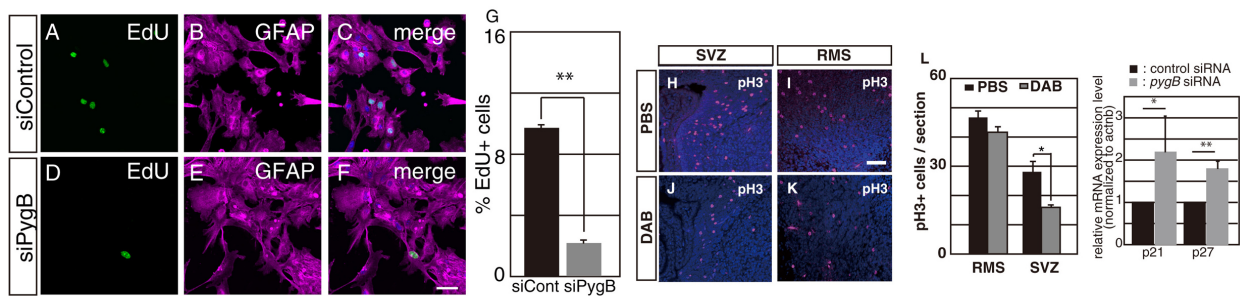


図3. グリコーゲンは新生仔期の細胞増殖に関与している。

A-F) 初代培養アストロサイトにおけるグリコーゲンは細胞増殖に関与する。初代培養アストロサイトにコントロール siRNA (A-C) およびグリコーゲンホスホリラーゼに対する siRNA (pygB, D-F) をトランスフェクションし、48 時間後に EdU 標識を行った。EdU (緑) と同時にアストロサイトマーカーである GFAP (赤) の染色も行った。スケールバーは  $50\mu\text{m}$  を示している。G) S 期の細胞の定量: GFAP 細胞全体に対する EdU/GFAP 共陽性細胞の割合を示している (\*\* $p < 0.01$ : t-test)。H-K) *in vivo* におけるグリコーゲンホスホリラーゼの阻害は細胞増殖を抑制する。生後直後のマウス側脳室に PBS (H, I) およびグリコーゲンホスホリラーゼの阻害剤 DAB (J, K) を注入し、48 時間後の細胞増殖をリン酸化ヒストン H3 (赤) の免疫染色によって染色した。L) リン酸化ヒストン H3 陽性細胞の定量。SVZ および RMS における切片あたりのリン酸化ヒストン H3 陽性細胞の数 (\* $p < 0.05$ : t-test)。M) 初代培養アストロサイトに control siRNA およびグリコーゲンホスホリラーゼに対する siRNA を導入し、p21 および p27 の発現をリアルタイム PCR 法によって定量した (\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ : t-test)。

## 考 察

発生期中枢神経には、グリコーゲンが存在することが報告されていたが、長らくその機能は不明であった。今回の研究において、新生仔期にグリコーゲンが利用され、その利用が阻害されると *in vivo* においても細胞周期が阻害されることから、グリコーゲンは生後の時期の細胞周期を維持するために必要であることが考えられる。生後にグリコーゲン由来のエネルギーが欠乏すると、成体になったときにどのようなフェノタイプが認められるかは、ノックアウトマウスなどの解析がまたれる。現在、ノックアウトマウスを導入予定である。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、京都府立医科大学大学院医学研究科神経発生生物学の小野勝彦教授、野村 真准教授である。本研究にご支援賜りました上原生命科学財団に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Buchakjian, M. R. & Kornbluth, S. : The engine driving the ship : Metabolic steering of cell proliferation and death. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **11** : 715-727, 2010.