

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790147

研究課題名（和文） 核膜内膜蛋白 Man1 による心臓の左右非対称性制御メカニズム

研究課題名（英文） A role of Man1, an inner nuclear membrane protein, in left-right axis formation

研究代表者

石村 昭彦（ISHIMURA AKIHIKO）

金沢大学・がん研究所・助教

研究者番号：80375261

研究成果の概要：

Man1 は核膜内膜に局在する蛋白質である。本研究では *Man1* 欠損マウスを作製し、その異常を観察した結果、欠損マウスは心奇形を高頻度に発症し、妊娠中期に死亡した。この心奇形は、心臓発生に必須な左右軸形成メカニズムの異常、つまり *Nodal* シグナル制御の異常に起因した。以上の研究成果は、*Developmental Dynamics* 誌（2008）に掲載、そして同雑誌の Highlight で紹介された（2009）。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：発生学, 形態形成学, 左右非対称性

1. 研究開始当初の背景

核膜は、外膜と内膜から構成される二重膜、両者を貫く核膜孔複合体、そして内膜を裏打ちする核ラミナからなり、一般には核と細胞質を仕切る「隔膜」と考えられていた。ところが最近の知見から、核膜は細胞分裂、細胞死、核や中心体の細胞内でのポジショニング、転写制御、クロマチンの動態制御など、多様な細胞機能に深く関わることが分かり、従来の

核膜に対する認識が大きく変わりつつある。また、核膜内膜蛋白やラミン A の異常により筋ジストロフィー症、拡張型心筋症、早老症などが引き起こされる、という報告がなされ、ヒトの病気とも密接に関わることが分かった。しかし核膜中には機能の不明な膜貫通型蛋白が 60 種類以上も存在すると考えられており、核膜に関する研究は未開拓な分野である。このような研究の流れの中、私たちは

内膜蛋白の1つMan1に注目し、アフリカツメガエル胚を用いた解析から、Man1がBMP (bone morphogenetic protein) シグナルを仲介するSmad1と直接結合することでBMPシグナルを阻害する、つまり「核膜蛋白はシグナル経路を制御する」という新たな核膜蛋白像を世界に先駆けて報告した。その後、少なくとも培養細胞レベルでは、Man1はActivin/TGF- β シグナルを仲介するSmad2/3とも結合しTGF- β シグナルも阻害していることが分かり、Man1は、広い意味でTGF- β スーパーファミリー・シグナル経路の抑制因子であると考えられている。

私は最近、哺乳動物でのMan1の機能を解析するために、*Man1*欠損マウス (*Man1^{ΔΔ}*) を作製した。*Man1^{ΔΔ}*胚は胎生11日目後に胚性致死となり、このとき心臓浮腫や出血、そして卵黄膜上を走行する血管分布パターンに明らかな異常を観察した。血管内皮マーカーPECAM-1を認識する抗体を用いた免疫染色実験の結果、*Man1^{ΔΔ}*胚では原始血管叢 (primary capillary plexus) は形成されるが成熟した血管網は観察されなかった。Man1はTGF- β シグナル制御因子と考えられているので、*Man1^{ΔΔ}*胚の組織について内在性TGF- β シグナルの活性を、抗リン酸化Smad抗体を用いた免疫染色を行って調べた。その結果、核内に蓄積しているリン酸化Smad2/3の量が上昇していた。また、TGF- β シグナル下流因子、フィブロネクチンの過剰な沈着が細胞外で観察された。以上の結果から、*Man1^{ΔΔ}*胚では、内在性TGF- β シグナルが亢進し、細胞外マトリックスが異常に沈着することによって血管内皮細胞の移動が抑制され、正常な血管網の形成が阻害されると考えられた (Ishimura et al., 2006)。その後詳細な表現型解析を行った結果、*Man1^{ΔΔ}*胚では、血管発生の異常のみならず、様々な心奇形が引き起こされていることを見出した。従って、本研究では、Man1

の形態形成制御における新たな機能を解明するために、*Man1^{ΔΔ}*胚のより詳細な表現型解析を行う。

2. 研究の目的

私はツメガエル胚を用いた解析からMan1がActivin/Nodalシグナルも負に制御することを既に報告している (Ishimura et al., 2006)。この*Nodal*は、マウス胎生8日目以降の左側板中胚葉 (lateral plate mesoderm) で発現し、種を越えて身体の左右非対称性の獲得に関わっている重要な因子である。そして、左右非対称性の異常は心奇形と密接に関わっていることが知られている。そこで「*Man1^{ΔΔ}*胚ではNodalが制御する左右非対称性シグナルが異常になり心奇形を引き起こす」と仮定し、*Nodal*の発現を全胚 *in situ*ハイブリダイゼーション法で調べた。その結果、*Man1^{ΔΔ}*胚の右側板中胚葉で異所的な*Nodal*の発現が観察され、このことから*Man1^{ΔΔ}*胚では、身体の左右非対称性が確立されていない可能性が強く示唆された。本研究では、Man1と左右軸形成の関係を、*Man1^{ΔΔ}*マウスを用いて検証し、核膜内膜蛋白Man1の新しい機能=左右非対称シグナルの制御メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) **Man1とNodalシグナルの関係**：*Man1^{ΔΔ}*胚における*Nodal*および*Nodal*下流因子の空間的・時間的発現パターンを、全胚 *in situ*ハイブリダイゼーション法によって詳細に調べる。

(2) **Man1と他の左右軸マーカーの関係**：*Man1^{ΔΔ}*胚における*Nodal*以外の左右軸マーカーの発現パターンを、全胚 *in situ*ハイブリダイゼーション法によって網羅的に調べる。

(3) **内在性Man1の発現パターン**：Man1が、左右軸形成に関わる組織 (node や側板中胚葉) で実際に発現しているかを、

全胚 *in situ* ハイブリダイゼーション法によって調べる。

(4) **Man1^{ΔA} 胚由来 nodal cilia の形態観察**: 正常な左右軸形成に必須な node 上に存在する繊毛 (nodal cilia) の形態を、走査電子顕微鏡下で観察する。

(5) **Man1/Nodal ダブル変異マウスの作製**: 左側側板中胚葉における *Nodal* の発現は、初期体節期胚の node より分泌される *Nodal* 自身によって誘導されることが報告されている。そこで *Man1^{ΔA}* 胚で観察された異所的な *Nodal* の発現が、これまで考えられてきた「node 由来 *Nodal* シグナル」に起因するかを調べるために、*Man1* 欠損マウス (*Man1^{ΔA}*) と *Nodal* hypomorphic 変異マウス (*Nodal^{neo/+}*) を交配させ、得られたダブル変異胚 (*Man1^{ΔA};Nodal^{neo/neo}*) に関して *Nodal* の発現パターンを調べる。

4. 研究成果

(1) *Man1^{ΔA}* 胚における *Nodal* の発現を詳細に調べた結果、4 体節期、左右両側の側板中胚葉で発現が認められた (図 1)。

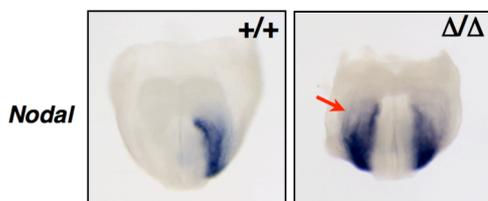


図1. 胎生8.25日目胚。 *Man1^{ΔA}*胚では、*Nodal*が右側 (矢印) でも発現する。

通常、側板中胚葉における *Nodal* の発現は、2 体節期の node 近傍、左後方側板中胚葉で初めて認められ、その後、*Nodal* の自己誘導活性によって前方へとその発現領域が広がっていく。興味深いことに、2 体節期の *Man1^{ΔA}* 胚では、本来の発現領域である左後方側板中胚葉のみならず、前方の側板中胚葉でも異所的な *Nodal* の発現が認められた (図 2)。次に、*Man1^{ΔA}* 胚における *Nodal* 下流因子、*Lefty1/2*、*Pitx2* の発現パターンを調べた。その結

果、*Nodal* の発現異常と一致して、*Lefty2* と *Pitx2* は、両側の側板中胚葉で強く発現していた。また、正常胚において主に左側の神経底板で発現している *Lefty1* の発現もまた、左右両側で観察された。以上より、*Nodal* および *Nodal* 下流因子が関与する左右非対称性が、*Man1^{ΔA}* 胚では失われていることが示された。

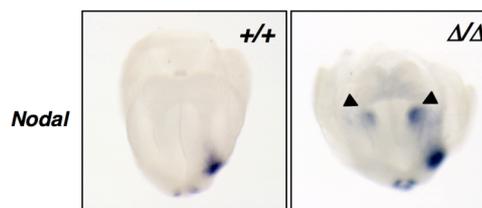


図2. 2体節期胚。 *Man1^{ΔA}*胚では、前方側板中胚葉で異所的な *Nodal* の発現 (矢頭) が観察された。

(2) *Man1^{ΔA}* 胚における *Nodal* 以外の左右軸マーカー (*Foxh1*, *Cryptic*, *Cripto*, *Cer12*, *Gdf1*, *Wnt3a*, *Fgf8*, *Bmp2/4*, *Foxa2*) に関して、その発現パターンを網羅的に調べた。その結果、*Nodal* coreceptor である *Cryptic* と *Cripto*、そして *Bmp2* の発現が、*Man1^{ΔA}* 胚で著しく上昇していた。マウス胚において、*Cryptic* と *Cripto* の発現は、BMP シグナルに依存することが報告されている。よって *Man1^{ΔA}* 胚で観察された *Cryptic* と *Cripto* の発現増加は、*Bmp2* の発現上昇に伴う内在性 BMP シグナルの活性化によると考えられた。以上より、マウスにおいて、BMP シグナルは、*Nodal* および *Nodal* シグナル関連因子の発現制御に深く関わっている可能性が示唆された。

(3) *Man1* 特異的アンチセンス・プローブを用いて、内在性 *Man1* の発現パターンを全胚 *in situ* ハイブリダイゼーション法によって調べた。同時に、*Man1* 変異 allele に組み込まれている、ターゲティング・ベクター由来 *β-geo* 遺伝子を利用した LacZ 染色によっても調べた (図 3)。その結果、*Man1* は、左右軸形成に関わる組織、node、側板中胚葉、神経底板で発現していた。

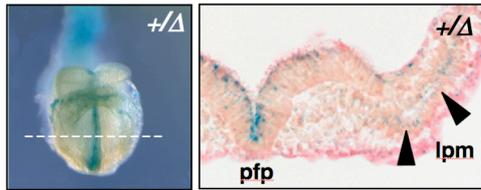


図3. LacZ染色解析
pfp: 神経底板; lpm: 側板中胚葉 (矢頭)

(4) マウス胚における最初の左右軸形成シグナルは、後期円筒胚期から初期体節期の node に存在すると考えられている。そして、node 上の繊毛 (nodal cilia) の旋回運動が左右軸決定に重要な役目を担っている。*Man1* は node でも強く発現していることから、*Man1^{ΔΔ}* 胚で nodal cilia の発生過程に異常が生じているか、走査電子顕微鏡下で観察した。その結果、少なくとも nodal cilia の形態的な異常は認められなかった。このことから、*Man1* は nodal cilia 形成以後の左右軸決定シグナル制御に関わっていることが示唆された。

(5) 図2で示された結果は、現行の左右軸形成モデル、つまり「側板中胚葉における *Nodal* の発現は、node 由来の *Nodal* 誘導シグナルによって誘導された、左後方側板中胚葉内の *Nodal* 自己誘導活性に依存する」というモデルだけでは説明が難しい。*Man1^{ΔΔ}* 胚の前方側板中胚葉で観察された異所的な *Nodal* の発現が、現行モデルで説明される「node 由来の *Nodal* 誘導シグナル」に依存しているか調べるために、node での *Nodal* の発現が欠失した *Nodal* hypomorphic マウス (*Nodal^{neo/+}*; Saijoh et al., 2003) と *Man1* 欠損マウス (*Man1^{ΔΔ}*) を交配させ、ダブルホモ変異マウス (*Man1^{ΔΔ}; Nodal^{neo/neo}*) の作製を試みた。その結果、ダブル変異胚において、node で *Nodal* の発現が観察されないのにも関わらず、前方側板中胚葉で異所的な *Nodal* の発現が観察された (図4)。このことから、*Man1^{ΔΔ}* 胚で観察された前方領域の *Nodal* は、node 由来の誘導シグナルに起因しないことが示された。従っ

て、マウス胚前方には、*Man1* によって制御される「*Nodal* 誘導シグナル X」が存在し、このシグナル X の制御は、正常な左右軸決定に重要であることが示唆された。

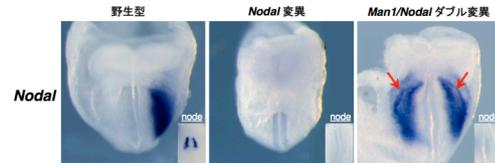


図4. *Man1/Nodal* ダブル変異胚 (右) における *Nodal* の発現は、node で *Nodal* が発現していないのに、前方側板中胚葉で異所的な発現 (矢印) が観察された。

これまで、マウスにおける左右軸形成メカニズムは、主に *Nodal* (および *Nodal* 下流因子) による左右非対称性モデルによって説明されてきた。しかし *Man1^{ΔΔ}* マウスの表現型解析の結果、現行のモデルだけでは全ての左右軸形成メカニズムを説明することが出来なかった。今後、本研究で想定されたシグナル X (BMP?) の正体を明らかにすることにより、左右軸形成メカニズムの全容解明に貢献できることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Ishimura A., Chida S. and Osada S., *Man1*, an inner nuclear membrane protein, regulates left-right axis formation by controlling *Nodal* signaling in a node-independent manner. *Developmental Dynamics* 誌, 2008年, 237巻 3565-3576, 査読有り

[学会発表] (計2件)

- ① 石村昭彦, 千田進介, 長田真一, A role of *Man1*, an inner nuclear membrane protein, in left-right axis

formation, 第 30 回分子生物学会年会・
第 80 回日本生化学会大会 合同大会,
2007.12.13, 横浜市

② 石村昭彦、千田進介、長田真一,
Man1, an inner nuclear membrane
protein, regulates left-right axis
formation by modulating Nodal
signaling., 第 40 回発生生物学会・第
59 回日本細胞生物学会 合同大会,
2007.5.28, 福岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石村 昭彦 (ISHIMURA AKIHIKO)
金沢大学・がん研究所・助教
研究者番号 : 80375261

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し