

機関番号 : 35303

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008 年度～2010 年度

課題番号 : 20570143

研究課題名 (和文) プロセシング酵素 PC6 による形態形成の制御

研究課題名 (英文) Axial patterning by a prohormone converting enzyme, PC6

研究代表者

西松 伸一郎 (NISHIMATSU SHIN-ICHIRO)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 20222185

研究成果の概要 (和文) :

PC6 は、Furin ファミリーに属するプロテアーゼで、骨形成タンパク質 (BMP) などの前駆体を切断し成熟型タンパク質に変換する。我々は、この反応が、胚の頭尾軸にそった形態形成、なかでも我々のからだの基本構造となる骨格筋や椎骨の形態形成に関与している可能性を見出した。本研究では、両生類胚に加え、マウスを使って脊椎動物に普遍的な反応であるのか検討した。両生類胚で PC6 の機能をモルフォリノオリゴにより阻害したところ、尾部形成が抑制されたばかりでなく、各体節も前方化していることがわかった。PC6 前駆体ペプチドを利用した阻害タンパク質の開発に成功した。この阻害タンパク質をコードする遺伝子を用いてコンディショナル TG マウスを作成した。またコンディショナル KO マウスも作成した。戻し交配ともに Mox1-Cre などのマウスとの交配を行っている。TG マウスの解析と併せて解析を進めている。

研究成果の概要 (英文) :

PC6 is a member of the Furin protease family and cleaves prepro-hormones and growth factors into mature proteins. Here we show that PC6 cleaves preproBMP-3b and that it is involved in the axial patterning of vertebrate embryos. *Xenopus* BMP-3b is expressed in the posterior neural and prechordal plates. However, injected BMP-3b induces anterior markers, and leads to secondary head formation. Since the anteriorizing activity is due to incomplete processing of the BMP-3b precursor, we anticipated that *Xenopus* BMP-3b protein is cleaved in the posterior neural plate. To address this notion, we examined a protease that can cleave the BMP-3b precursor, and which is expressed in the posterior-neural plate. Like many peptide hormones and growth factors, the BMP-3b-processing enzyme appeared to be tolloid-related or a furin. When injected in combination with BMP-3b, PC6 suppressed secondary head formation triggered by BMP-3b. Western blotting showed that PC6 effectively cleaved the BMP-3b precursor. An inactive PC6 that converted the amino acid of the active center into Phe from Ser, lost these activities. We also confirmed that *Xenopus* PC6 expression is similar to xBMP-3b, and graded from posterior to anterior. At present, we have been investigating whether the reaction of PC6 and BMP-3b is also conserved in mouse embryos. Our results suggest that the biosynthesis of BMP proteins is related to posterior-ventral patterning and tail formation, whereas abolishing BMP signaling is key to anterior-dorsal patterning and head formation.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：形態形成、発生・分化制御、酵素の調節、胚葉形成・原腸形成・体節形成、発生遺伝、進化発生

## 1. 研究開始当初の背景

ただ一つの細胞である受精卵(胚)から、我々のからだを構成する 200 種類 60 兆個の細胞が生じる。この細胞分化の過程で、最初に中心的な役割を担う細胞集団が、オーガナイザー(背側中胚葉)である。

オーガナイザーによる形態形成の研究は、古くから生物学の中心的な課題の一つである。1950年代にフィンランドの Saxen は、背側から勾配を作る「神経誘導因子(N因子)」と尾側から勾配を作る中胚葉誘導因子(M因子)の2つの因子の相互作用により胚の未分化細胞の位置が決まり器官形成が進行すると考えた。オランダの Nieuwkoop は「活性化因子」と「変換因子」、日本の山田常雄は「背方化因子」と「尾方化因子」の呼称で同様のモデルを発表している。

近年の目覚ましい研究成果により背腹軸や左右軸決定のメカニズムを化学反応式で説明できるようになった。オーガナイザーは、Chordin などの神経誘導因子を分泌し、周囲の未分化細胞を背側化する一方で、オーガナイザー自身も頭尾軸にそって自律分化し脊索となる。また自律分化と並行して、胚の頭尾軸にそって Hox 遺伝子群が発現し、骨格筋形成や椎骨形成の基礎となる胚の基本体制(ボディープラン)が確立することがわかっている。オーガナイザーによる背腹軸形成と神経誘導のメカニズムについては詳細に解明されているが、オーガナイザー自身の分化がどのようなメカニズムで制御されているのか、不明のまま残されている。また胚の形態と Hox 遺伝子群の染色体上の前後関係が一致して発現するのだが、Hox 遺伝子群の遺伝子発現がどのようなメカニズムで調節されているのか全くわかっていない。

代表者は、両生類胚のオーガナイザーを解析していた過程で、Furin ファミリーのプロセシング酵素 PC6 が、オーガナイザー領域に発現し、背側中胚葉の尾部側に強く勾配を形成するように発現することを見つけた。またモルフオリノオリゴにより両生類胚に内在の PC6 の機能を抑制したところ、頭部背側構造の形成(とくに体節形成)に異常が認められた。PC6 遺伝子は、ニワトリ胚やマウス胚においても両生類胚と同様に尾部側から頭部側に勾配を形成して発現している。さらに PC6 遺伝子を破壊した単純ノックアウト(KO)マウスは基本体制を確立するまでに致死となることが明らかにされた。これらの事実は、PC6 を介

する酵素反応が、脊椎動物の基本体制の確立においてきわめて重要な鍵を握っていると示唆している。

## 2. 研究の目的

PC6 は、Furin ファミリーに属するプロテアーゼで、骨形成タンパク質(BMP)などのサイトカイン前駆体を切断し成熟型に変換する。研究代表者は、PC6 が両生類胚のオーガナイザー領域に発現していることを見つけ、PC6 による酵素反応が、胚の頭尾軸にそった基本体制の確立に重要な役割を担っている可能性を見出した。本研究では、この仮説をさらに検証するために、次の3つの具体的な課題を設定した。

### ① PC6 阻害による両生類胚の尾部形成および体節形成の影響

頭尾軸にそった形態形成に Wnt と FGF シグナル経路が協調して働いていること、体節形成では Notch シグナルが中心的な働きをしていることが明らかにされている。PC6 機能阻害胚を利用して、これらのシグナル経路を構成する分子と PC6 との関係を解析する。

### ② PC6 の優性欠損型変異体の作製

野生型 PC6 を過剰発現しても胚発生は正常に進むことから、遺伝子発現とは別に、酵素活性も厳密に調節されていると示唆される。PC6 の活性を抑制した変異型 PC6 を両生類胚に発現することで、酵素の活性調節に乱れを起こし、それによる形態変化を解析する。

### ③ PC6 コンディショナル変異マウスの作成

PC6 の単純ノックアウトマウスは発生過程のきわめて初期に胚性致死となることから、PC6 遺伝子のエクソンの両端に *loxP* 配列を挿入したコンディショナル変異マウスを作成する。*Mesp1-Cre* や *Meox1-Cre* マウスと交配し、胚の領域特異的に PC6 の機能を阻害したマウスを作成する。体節形成や脊椎骨形成を指標にして、PC6 の基本体制の確立における役割を解析し、脊椎動物胚において普遍的な反応であるのか明らかにすることを最終目標とした。

## 3. 研究の方法

### ① PC6 阻害による両生類胚の尾部形成および体節形成の影響

PC6 機能抑制胚の遺伝子の発現を *in situ* hybridization により解析した。また PC6 の基質を探索するとともに、PC6 機能抑制胚を救助できるかどうか検討した。

## ② PC6 の優性欠損型変異体の作製

野生型 PC6 を過剰発現しても胚発生は正常に進む。酵素活性を亢進または抑制した変異型 PC6 を両生類胚に発現することで、PC6 の分子構造と活性ならびに形態変化との相関を解析した。形態の指標は、頭部化や腹側化などの基本体制の異常、各体節の大きさや数の変化により評価した。また変異型 PC6 を発現する TG マウスを作成した。

## ③ PC6 コンディショナル変異マウスの作成

PC6 遺伝子の第 1 エクソンの両端に *loxP* 配列を挿入したマウスを作成した。*Mox1-Cre* マウスや *Mesp1-Cre* などと交配し、胚の領域特異的に PC6 の機能を阻害した。体節形成や脊椎骨形成を指標にして、PC6 の役割を解析した。

## 4. 研究成果

### ① PC6 阻害による両生類胚の尾部形成および体節形成の影響

PC6 の機能をモルフォリノオリゴにより阻害したところ、尾部側のマーカーである *Xcdx1* の発現が前方に拡大しているだけではなく、背側中軸中胚葉のマーカーである *myoD* の発現が抑制され体節が萎縮していたことがわかった。そこで、体節形成過程の詳細なマーカーの発現について、*in situ hybridization* により解析した。体節前駆細胞と分化した細胞の境界 (*FGF8* と *RALDH2*)、分節時計 (*xHairy2*)、体節の上皮化 (*paraxis*)、各体節内の前後軸にそった部域化 (*Uncx4.1*) について、PC6 阻害胚と野生胚の遺伝子発現を比較した結果、*RALDH2* の発現が頭部側に強く発現する一方で、体幹部での *FGF8* と *Uncx4.1* の発現が減衰していた。*xHairy2* と *paraxis* の発現に影響はなかった。胚全体の尾部形成が抑制され前方化するだけではなく、個々の体節においても前後軸形成も抑制されていることがわかった。

PC6 の基質の一つが骨形成タンパク質 (*BMP*) ファミリーの *BMP-3b* であることを明らかにした。*BMP-3b* を過剰発現すると二次頭部を形成するが、PC6 と共発現すると二次頭部形成が抑制された。また活性中心のアミノ酸をセリンからフェニルアラニンに変換した不活性型 PC6 では抑制されないこと、ウエスタン法により PC6 が *BMP-3b* 前駆体の切断を促進することを明らかにした。さらに、モルフォリノオリゴによる PC6 阻害胚に、PC6 とは無関係に成熟型になるよ

うに改変した *BMP-3b* を投与したところ、背側構造および萎縮した体節を救助することができた (論文投稿中)。

## ② PC6 の優性欠損型変異体の作製

PC6 が属する *Furin* ファミリーのプロテアーゼは、構造活性相関の解析が進んでおり、活性が阻害されるアミノ酸の変異が多数報告されている。また線虫やショウジョウバエにはこのファミリーの優性欠損型変異体がある。こうしたデータを参考に、前駆体領域や活性中心に変異を導入した PC6 変異体を作成し、両生類胚を使って形態形成に及ぼす効果を検討した。その結果、活性中心のアミノ酸をセリンからフェニルアラニンに変更した PC6 S382F では形態変化は認められなかったのに対し、PC6 前駆体領域の自己触媒に関わる 78 番目のアミノ酸をアルギニンからアラニンに変更すると尾部形成が抑制され異所性にセメント腺が形成された。また PC6 の活性中心に結合し抑制する前駆体領域 115 アミノ酸を緑色蛍光タンパク質 (*EGFP*) と融合したタンパク質を作製し両生類胚に過剰発現したところ、50pg の低濃度で尾部形成を完全に阻害した。モルフォリノオリゴよりも強力に胚を前方化した。切断された前駆体領域のペプチドが、内在の PC6 の阻害ペプチドとして働くことが示唆された。

この PC6 阻害タンパク質をマウス胚の発生の時期や領域特異的に発現するために TG マウスの作製を行った。PC6 阻害タンパク質をコードする遺伝子を *CAGS* プロモーターと *loxP* 配列で挟まれた *CAT* 遺伝子の下流に挿入したコンストラクトを作製した。コピー数の異なる 2 系統の TG マウスを得ることができた。このマウスを、受精卵中で *Cre* を発現する *CAG-Cre* マウスと交配したところ、PC6 単純ノックアウトマウスと同様に咽頭胚期までに胚性致死となることがわかった。体節中胚葉系譜特異的に *Cre* を発現するマウスとの交配では、10.5 日で胚を回収し解析したが、形態変化は認められなかった。中軸中胚葉系譜の細胞で *Cre* を発現する *Mox1-Cre* などの他の *Cre* マウスとの交配を行っている。

## ③ PC6 コンディショナル変異マウスの作成

PC6 阻害タンパク質を *Cre* 酵素依存的に発現するトランスジェニックマウスと同様に、最終的な結論が得られていないが、これまでの進捗状況を以下にまとめた。コンディショナル KO マウスの作成するために、PC6

遺伝子の開始コドンを含む第1エクソンの前後に loxP 配列を挿入された ES 細胞を4系統得られた。キメラマウス、F1 マウスが得られ、Rosa26-FLP マウスとの交配により neo カセットの除去を行った。C57BL/6 に戻し交配 (N2) を行うとともに、並行して CAG-Cre および Mox1-Cre マウスとの交配を行っている。また CAG-Cre との交配により、PC6 遺伝子を欠損したヘテロ産仔が得られ兄妹交配によりホモ個体を作成している。さらに PC6 コンディショナル KO マウスとともに、別件で作成した Furin のコンディショナル KO マウスを Mox1-Cre マウスと交配した。胚に顕著な変化は観察されず、また胚性致死となることなく産仔が得られることも判明した。Furin 阻害を PC6 が補完している可能性があり、PC6 マウスの解析と併せて解析を進めている。

本研究により頭尾軸にそった形態形成のメカニズムを分子レベルで説明できれば、背腹軸決定から椎骨形成へと続く一連のメカニズムがつながり、胚性幹細胞を3次元空間に配置する初期発生のシナリオが完成する。このシナリオをもとに、胚性幹細胞や組織幹細胞の増殖と分化を調節し特定の器官や組織を再生させることも可能になるものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Fujii H, Sakai M, Nishimatsu S, Nohno T, Mochii M, Orii H, and Watanabe K : VegT, eFGF and Xbra cause overall posteriorization while Xwnt8 causes eye-level restricted posteriorization in synergy with chordin in early *Xenopus* development. *Dev Growth Differ* 50, 169-180 (2008). 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 西松伸一郎、田中伸吾、大澤裕、砂田芳秀、濃野勉：マイオスタチン作用に拮抗する因子による筋疾患治療法の開発、厚生労働省精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」平成22年度「砂田班」班会議、東京、12. 3. 2010
- ② Ohsawa Y, Okada T, Nishimatsu S, Fujii I, Hayashi S, Rikimaru M, Murakami T, Nohno T, Sunada Y. Reprogrammed fibroblasts are a feasible source of cell therapy for caveolin-3-deficient and laminin a-2-deficient

muscular dystrophy. 2010 FASEB Summer Research Conferences: Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells, Carefree, Arizona, USA, 7 18-23, 2010

- ③ 西松伸一郎：胴尾部オーガナイザーは存在するの？；JT 生命誌研究館ワークショップ「かたちまつり 2009 -オーガナイザーの本態を探る-」、大阪、11. 18. 2009
- ④ Nishimatsu S, Tanaka S, Kiyonari H, Hayashibara Y, Aizawa S, Ohsawa Y, Sunada Y, Nohno T: Muscle mass regulation by myostatin-signaling related molecules. : 8th French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophies, Paris, France, 7.4.2009
- ⑤ 西松伸一郎、田中伸吾、大澤裕、砂田芳秀、濃野勉：マイオスタチン・シグナル調節因子と骨格筋形成、厚生労働省精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」平成20年度「砂田班」班会議、東京、12. 14. 2008
- ⑥ 西松伸一郎、日野純、寒川賢治、松尾壽之、濃野勉：誘導と自律分化によるセメント腺形成、第41回日本発生物学会大会 サテライトシンポジウム「ツメガエルが拓く胚発生・形態形成研究の新展開」、徳島、5. 27. 2008

[その他]

ホームページ

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/molbiol/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

西松伸一郎 (NISHIMATSU SHIN-ICHIRO)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：20222185

(2) 研究分担者

濃野勉 (NOHNO TSUTOMU)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：20098619

相賀 裕美子 (SAGA YUMIKO)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・

教授

研究者番号：50221271

(3) 連携研究者

日野 純 (HINO JUN)

国立循環器病センター(研究所)・生化学部・

室長

研究者番号：40260351