

平成 23 年 6 月 3 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2009～2010
課題番号：21770249
研究課題名（和文） BMP 結合因子 Cv2 の腎発生過程における BMP シグナル活性化メカニズムの解明
研究課題名（英文） Functional analysis of BMP binding protein, Cv2, in nephrogenesis
研究代表者
池谷 真 (IKEYA MAKOTO)
京都大学・再生医科学研究所・研究員
研究者番号：20442923

研究成果の概要（和文）：

BMP 結合因子 Cv2(Crossveinless 2)が腎発生においてどのような分子作用機序で BMP シグナルを活性化するかを解明するため、同様に BMP 結合因子として知られている Tsg との分子間相互作用に着目し、研究を行った。本研究により Cv2 の BMP 活性化機構は Tsg 存在下でのみ発揮される事が、Tsg および Cv2 の変異マウスの交配により明らかとなった。本研究成果は Developmental Biology(海外査読論文雑誌)に発表した。

研究成果の概要（英文）：

The fine-tuning of BMP signals is critical for many aspects of complex organogenesis. We show that the augmentation of BMP signaling by a BMP-binding secreted factor, Crossveinless2 (Cv2), is essential for the early embryonic development of mammalian nephrons and also that Cv2 exerts its pro-BMP nephrogenic function Tsg- dependently. We published these findings in the journal “Developmental Biology”.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物学・発生生物学

キーワード：遺伝学、発生・分化、細胞・組織、シグナル伝達、循環器・高血圧

1. 研究開始当初の背景

発生過程において、BMP は中胚葉誘導・神経誘導・臓器形成など、様々な局面で作用している重要な因子である。なかでも、臓器形成のような複雑な「かたちづくり」を行うためには、BMP シグナルの強度が非常に微

細に調節される必要がある。申請者は、細胞外で BMP タンパク質に結合して BMP の活性を調節する因子である Cv2(Crossveinless2)の BMP シグナル活性化機構に興味を持って研究を進めてきた。

2. 研究の目的

本研究課題は、申請者らが解析を進めてきた BMP 結合因子 Cv2 (crossveinless2) が腎発生においてどのような分子作用機序で BMP シグナルを活性化するのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

Cv2 が BMP の正の制御因子として機能するためには、コファクターの存在が重要であるとの仮説のもと、in vitro および in vivo で Cv2 と協調的に機能する分子のスクリーニングを行った。得られた候補分子について、ノックアウトマウスの供与を受けて Cv2 ノックアウトマウスとの二重変異マウスを作製し、その表現型を詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) Cv2 と Tsg の二重変異体を作製し、腎臓の表現型を解析した。胎生 18.5 日胚の Cv2 変異体は、腎臓が小さくなり、構成単位であるネフロン数も少なくなっていた。これに対し、Cv2 と Tsg の二重変異体は野生型とほぼ同じ大きさであった (図 1. A-K)。

発生期をさかのぼり、胎生 14.5 日胚で BMP シグナル強度の指標となる Smad1 のリン酸化の強度を調べたところ、Cv2 変異体で減少していたシグナル強度が、Cv2 と Tsg の二重変異体では野生型と同程度にまで回復していた (図 1. M-P)。また、Cv2 変異体で確認された NCAM 抗体染色の異常なパターンは、Cv2 と Tsg の二重変異体では野生型同様に回復していた。

これらの結果から、腎発生における Cv2 の BMP 活性化メカニズムには、Tsg の存在が必須である事が示唆された。

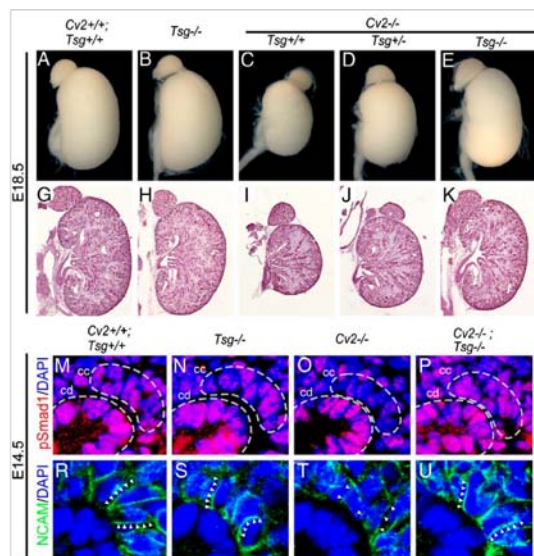


図 1. Cv2 の腎臓における機能は Tsg 依存的である

(2) (1)の結果から、Cv2 の機能は Tsg 依存的である事が示唆されたため、次に Cv2 と Tsg の相互作用が直接的なものを調べるために、免疫沈降法による Cv2-Tsg タンパク間相互作用を調べた。しかし、予備的な実験から、市販されている抗体は免疫沈降に適用できないという結果を得たため、生化学的なアッセイによる Cv2 と Tsg のタンパクタンパク間相互作用を調べる実験は断念した。

(3) 次に、培養細胞を用いて Cv2 と Tsg の相互作用を調べた。用いた細胞はヒトの腎臓由来の細胞株である HEK293T である。

まず HEK293T 細胞において、Cv2 が濃度依存的に BMP シグナルを増強するかを調べる目的で、Cv2 の cDNA を HEK293T 細胞にトランスフェクションし、BMP シグナル反応性のルシフェラーゼレポーターコンストラクト (BRE-luc) により検出した。すると、cDNA 量依存的に BMP シグナルが増強される事が分かった (図 2)。この BMP シグナルの増強は、細胞外における BMP 阻害分子 Noggin によって完全に抑えられることから、この現象は細胞外で起こったイベントであると考えられた (図 2)。

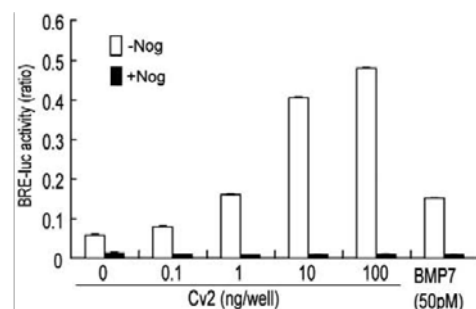


図 2. Cv2 量に依存的に BMP シグナルは増強する

次に、HEK293T 細胞で発現する Tsg を siRNA により減少させることに成功した (図 3)。

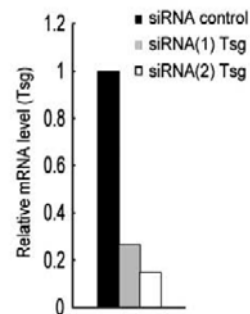


図 3. Tsg siRNA により、Tsg の mRNA 量は有為に減少した。siRNA(1)と siRNA(2)は、Tsg の違う領域を標的とした siRNA 分子である。

最後に、Tsg を siRNA でノックダウンした状態で、Cv2 の cDNA 量依存的な BMP シグナルの活性化がどのように変化するかを観察した。すると、Tsg をノックダウンした条件では、Cv2 の cDNA 量依存的な BMP シグナルの活性化が観察されなかった (図 4)。

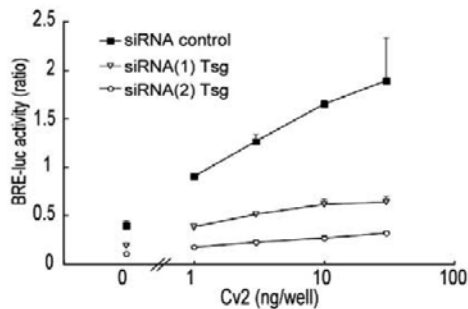


図 4. HEK293T における Cv2 の量依存的な BMP シグナル活性化機構は、Tsg 依存的である。

以上の結果から、培養細胞においても Cv2 の BMP シグナル活性化機構は Tsg 依存的である事が示された。

(4) BMP シグナル検出系の確立

Cv2 による BMP シグナル活性化機構を詳細に検討する為、BMP シグナルの高感度検出系の開発を行った。

BMP シグナルが活性化すると細胞内で Smad1/5/8 がリン酸化され、Smad4 と結合して核内に移行する事が分かっている。そこで、Smad1 と Smad4 の分子間相互作用を利用した SplitGFP 分子の開発を行った。

しかし、これらの分子を培養細胞に導入したところ、高発現した細胞が選択的に死んでいくという現象が観察され、作製したコンストラクトでは生細胞の BMP レベルを検出する事ができないと判断した。

(5) Cv2 と相互作用する分子の探索

(3) で確立した HEK293T 細胞の系を利用し、Tsg 以外の Cv2 と相互作用する分子の探索を in vitro で行った。

候補分子として Chordin, CHL1, CHL2 の siRNA を作製し、HEK293T 細胞に導入して効果の検討を行った。

しかし、Tsg の siRNA を導入した場合に観察されたような Cv2 の機能阻害効果は、Chordin, CHL1, CHL2 の siRNA を導入した場合には観察されず、これらの分子が Cv2 の BMP シグナル活性化機構に関与しているという結果は得られなかった。

(6) Cv2 遺伝子の制御領域の解析

Cv2 変異体の解析から、Cv2 遺伝子の発現が BMP シグナルによって制御されていることを示唆する結果を得ていた。そこで、Cv2 ゲノムの 5' 上流領域とルシフェラーゼ遺伝子を結合したコンストラクトを作製し、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより Cv2 の発現が BMP によって制御されているかどうかを調べたところ、このコンストラクトは BMP に反応してルシフェラーゼ活性が上昇することが分かった。このことから、Cv2 の 5' 上流には BMP 反応領域が存在する事が示唆された。

現在引き続き、Cv2 のゲノム領域内に存在すると考えられる BMP 反応領域の絞り込みを行っている。

(7) 腎発生における Cv2 の pro-BMP4 活性についての解析

Cv2 の BMP シグナル活性化機構を解析する目的で、Cv2 と BMP4 変異マウスの二重変異体を作製し、表現型を観察した。結果として、BMP7 と Cv2 の二重変異体の場合とは異なり、BMP4 と Cv2 の二重変異体では、水腎症が高頻度に観察された (図 5)。このことから、Cv2 は水腎症の表現型に関して BMP4 と遺伝的に相関がある事が判明した。

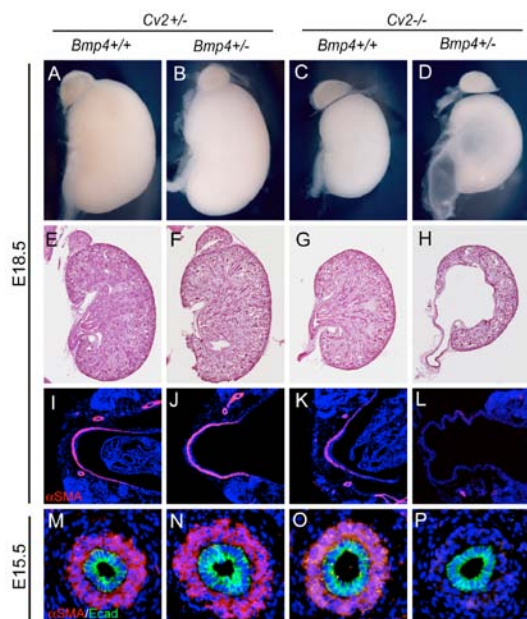


図 5. BMP4 と Cv2 の二重変異体は高頻度に水腎症を発症する。

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 Ikeya M, et al., Cv2, functioning as

a pro-BMP factor via twisted gastrulation, is required for early development of nephron precursors. *Developmental Biology*, 査読有, Vol 337, 2010, pp405-414

〔学会発表〕(計2件)

① 池谷真、他、Cv2 is required for early nephron development as a pro-BMP factor functioning via Twisted gastrulation, 日本分子生物学会第9回春期シンポジウム、2009年5月11日、宮崎

② 池谷真、他、Tsg依存的BMP促進因子Cv2は、ネフロン前駆体の凝集を制御する, 第42回日本発生生物学会大会、2009年5月30日、新潟

〔図書〕(計1件)

① 池谷真、他、シュプリンガー・ジャパン株式会社、Gatewayを用いた遺伝子導入マニュアル、第6章、2009年12月、pp75-86

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池谷 真 (IKEYA MAKOTO)
京都大学・再生医科学研究所・研究員
研究者番号：20442923

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし