

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591618

研究課題名(和文)カルポニン3の生理機能の解明

研究課題名(英文)Calponin 3, an actin binding protein, regulates body wall closure

研究代表者

渋川 幸直 (Shibukawa, Yukinao)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：90393264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：CNN3ホモノックアウトマウスの表現型として34%の個体に神経管閉鎖障害と眼瞼閉鎖障害が認められた。我々はCNN3のリン酸化特異的に会合する分子としてMHC11Aを同定、変異体を用いた解析からCNN3はF-アクチンとMHC11Aで形成されるアクトミオシンケーブルの安定化に寄与する事で神経上皮細胞アピカル部の収縮力や眼瞼上皮細胞の移動を制御していると考えられる。またCNN3によるアクトミオシンケーブルの安定化は神経上皮細胞アピカル部へのShroom3とROCK1/2の局在や眼瞼閉鎖過程で生じる遊走性ケラチノサイトにおけるROCK1/2の集積を安定化させることにも寄与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To explore the physiological role of CNN3, we generated CNN3 null mice and reveals that 34% of homozygous exhibits neural tube and eyelid closure defects. During neural tube closure (NTC), CNN3 is apically localized in neuroepithelial (NE) cells and well co-localized with F-actin. CNN3-mutant NE cell show a reduction in apically not only F-actin accumulation but MLC phosphorylation. We identified that MHC11A is a key binding partner of CNN3 and Ser293/296 phosphorylation of CNN3 is critical for this association. Moreover, ROCK1/2 and Shroom3 localization is also disrupted in homozygous embryo. During eyelid development, CNN3 mutant mice shows impaired or delayed extension of the eyelid epithelial sheet with disorganized actin bundles at the peridermal cells in the leading edge of the sheet. These results demonstrate that CNN3 is required for stabilization of actomyosin cable and apically localized ROCKs during normal progression of body wall closure.

研究分野：細胞生物学

キーワード：体腔閉鎖 神経管閉鎖 眼瞼閉鎖 細胞骨格 細胞移動 収縮

1. 研究開始当初の背景

細胞融合は DNA の複製を伴わない細胞質の融合を細胞間で起こす現象であり、生理的条件下で細胞融合を伴う分化が観察される細胞は胎盤の栄養膜細胞 (トロホプラスト) や筋芽細胞 (マイオプラスト)、破骨細胞の三種類のみである。細胞融合に障害が生じることによって不妊や早産・流産だけでなくミオパチーや筋ジストロフィー、大理石骨症などを引き起こすことが知られている。また近年になって初期癌細胞が悪性化するステップや細胞が多能性を獲得するための核のリプログラミングにも細胞融合が重要な役割を果たすことが報告されており、細胞融合機構の解明と制御法の確立は高効率でより安全な多能性幹細胞の誘導法の確立や組織の再生、臨床応用に貢献するものと考えられる。

これまでに我々はトロホプラストの細胞融合過程で発現・翻訳後修飾に変化のある分子群のプロテオーム解析を行いカルポニン 3 (CNN3) がトロホプラストの細胞骨格系の再編成に中心的な役割を果たし、結果として細胞融合を負に制御することを見いだした。また細胞融合過程で CNN3 が脱リン酸化されること、質量分析によるリン酸化部位の同定と抗リン酸化抗体の作成や変異体を用いた一連の解析によりトロホプラストにおいて CNN3 のリン酸化状態の変化が細胞骨格の再編成と細胞膜の fusion competency に影響を与えることを報告した。更に CNN3 による細胞融合の制御がトロホプラストのみならずマイオプラストにおいてもそのリン酸化を介していることを明らかにし、CNN3 のリン酸化キナーゼとして ROCK を同定している。また CNN3 の発現が着床期の子宮上皮細胞で一過性に上昇することも見いだしており、胎盤発生や筋管形成のみならず妊娠子宮の胚受容と内腔閉鎖機構にも関与していると考えられている。

CNN ファミリーはアクチン結合タンパクであり細胞骨格や細胞の移動・収縮に関与し、遺伝子の異なる 3 つのアイソフォームが知られている。最も研究が進められてきた CNN1 は平滑筋の分化マーカーで細胞の収縮、移動等に関与するが、KO マウスの解析では予想外に骨形成を負に制御する因子であることが明かにされている。CNN2 も近年になって遺伝子改変動物の解析が行われ血管内皮細胞やマクロファージの分化、運動性を制御することが報告されてきた。

2. 研究の目的

細胞融合は胎盤形成・受精・筋形成やマクロファージの成熟過程に必須であるだけでなく、癌化や幹細胞による組織再生とも関連することから、これからの医療にとって重要な細胞生物学研究課題である。我々は細胞融合を制御する分子として細胞骨格系のタンパクであるカルポニン 3 (CNN3) を同定し、機能が明らかでなかったこの分子を中心とした

解析を行ってきた。本研究では CNN3 の生理機能を解明するために作成したノックアウトマウスを用いて、胎盤、筋肉を始めとする関連組織の発生や組織再生に関する生理機能の解明、さらには CNN3 を起点とした細胞融合機構の詳細を明らかにすることで高効率の細胞融合を可能にし、ひいては再生医療を始めとした臨床応用に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

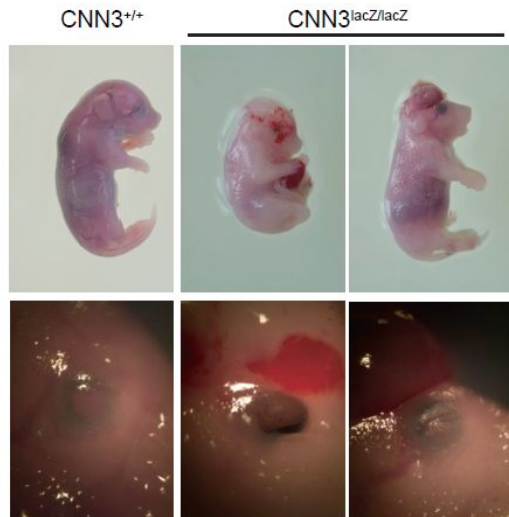
CNN3 の生理機能を個体レベルで解析するために、すでに作成を完了し表現型解析が進みつつある CNN3 遺伝子欠損マウスを用いて研究を展開する。CNN3 がアクチン細胞骨格系の再編成によってトロホプラストとマイオプラストの細胞融合を調節するという我々の知見から、CNN3 ホモ (あるいはヘテロ) マウスでまず筋発生や胎盤発生に着目した解析を行う。生存する場合: 着床や妊娠の継続、あるいは筋再生や創傷治癒能力に着目した解析を行う。また CNN2 遺伝子とのダブル変異マウスを作成することにより CNN ファミリー全体としての生理的役割の解明を目指す。胎生致死となった場合: マーカー遺伝子である β ガラクトシダーゼの活性を指標に表現型が現れる組織を特定する。次に標的組織の組織培養や単離した細胞の初代培養を行い細胞融合能や細胞の移動・収縮、あるいは細胞周期や分化能について *in vitro* での詳細な解析を行う。

4. 研究成果

CNN3 はファミリー間で最もユビキタな発現パターンを持っており特に膀胱や胃など収縮の大きな組織ではリン酸化レベルも高い事が明らかとなった。ノックアウトマウスの作成は *Cnn3* 遺伝子の第 2 エクソンに in-frame で pgkNeo と LacZ 遺伝子のカセットを挿入し、第 2-7 エクソンを置換する形で作成した。作成したキメラマウスから Cre-loxP システムを用いて pgkNeo 遺伝子の除去と LacZ 遺伝子の発現を確認した。マウス尾部から抽出した DNA を用いた PCR genotyping と全胚抽出液のウエスタンブロットにより *Cnn3* 遺伝子の除去とタンパクの発現が消失している事を確認した。

Cnn3^{lacZ/lacZ} 新生仔の割合はメンデルの法則に従っておらず、約 3 分の 1 の胎生 18.5 日胚 (E18.5) で頭部の神経管閉鎖不全 (NTD) である脳ヘルニアの表現型が出現しており、また NTD 胚では眼瞼閉鎖不全も併発していた (図 1)。生存する *Cnn3^{lacZ/lacZ}* 胚は野生型に比べてわずかに小さいが、離乳後は同程度にまで成長する。雌雄共に *Cnn3^{lacZ/lacZ}* も妊孕性は認められたが雌マウスの一回の妊娠あたりの出産胎仔数で 2 割低下 (WT 10.77, KO 8.84 average pups/litter)、一月あたりの妊娠回数 (WT 1.15, KO 0.69 pregnancy rate/month) で 4 割低下しており雌の妊孕性低下を確認した。雌

の妊孕性低下メカニズムは着床、排卵、卵成熟やホルモ分泌と多岐に渡るため雄の妊孕性に差があるかを確認すると共に現在解析中である。次に全胚を用いた LacZ 染色により CNN3 の発現部位を確認したところ E8.5 日胚では弱い発現しか認められなかったが E9.5 胚以降では神経管や体節、肢芽などをはじめ広範な領域で発現している事を確認した。

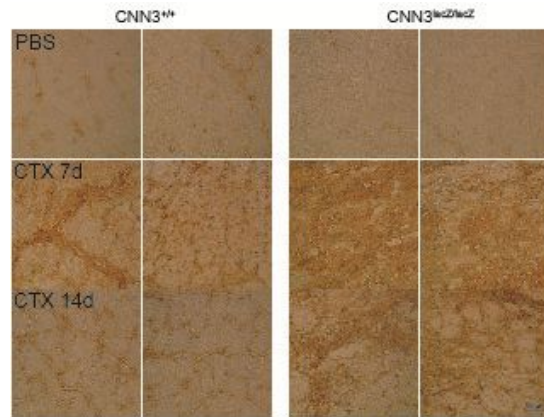


(図1) E18.5 日胚の表現型。脳ヘルニア(上段)と眼閉鎖障害(下段)

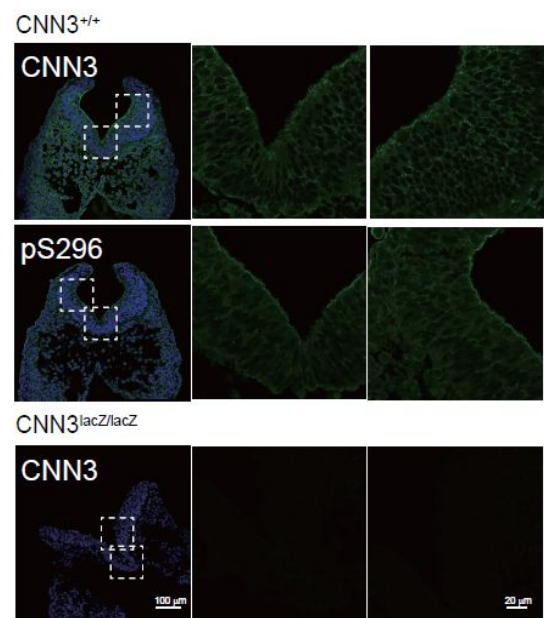
我々は CNN3 がマイオブラストの細胞融合を制御していることを報告しているため筋再生過程において CNN3 が機能するかどうかについて次に検討を行った。筋繊維が損傷を受けると筋衛生細胞(STC)が活性化、増殖しマイオブラストへの分化と融合を促進することによって筋再生が誘導されることが知られている。そこでカルディオトキシン (CTX) による筋損傷からの再生をモニターしたところ、*Cnn3^{lacZ/lacZ}* マウスの腓腹筋の再生は野生型に比べて遅延していることが明らかとなった。また STC のマーカーである Pax7 抗体を用いた組織染色からも野生型由来の腓腹筋では CTX 処理後 14 日では Pax7 陽性細胞が減少しているのに対し *Cnn3^{lacZ/lacZ}* 由来の腓腹筋では Pax7 陽性細胞が多数確認出来、再生した筋繊維も未熟で細いものが多かった(図2)。これらの事から CNN3 は筋再生過程においては正に制御する分子であることが示唆される。

神経管閉鎖 (NTC) は E8.5 から始まり E10.5 で完了する。頭部の神経管閉鎖は最も初期に始まるが、この過程では神経上皮が正中線 (median hinge point: MTP) で折れ曲がった後に更に dorsolateral hinge point (DLHP) で折れ曲がる事で管状構造が形成される。*Cnn3^{lacZ/lacZ}* の頭部神経管閉鎖障害 (NTD) は E8.75 日胚から認められ、この DLHP での内側への湾曲が誘導されず外側に反り返った状態になっていた。また E8.5 日胚では野生型との差は認められなかった。次に神経上皮細胞での

CNN3 の発現を E8.75 日胚で確認したところ、神経上皮細胞の細胞膜に局在が認められたが特にアピカル領域で強い発現が認められた。また 296 番目のセリン残基がリン酸化した CNN3 (phospho-S296CNN3) は特に神経上皮アピカル領域に顕著に局在していることが明らかとなった(図3)。これらのことから CNN3 は神経管閉鎖過程で神経上皮アピカル領域のアクトミオシンケーブルの収縮に関与していることが示唆された。



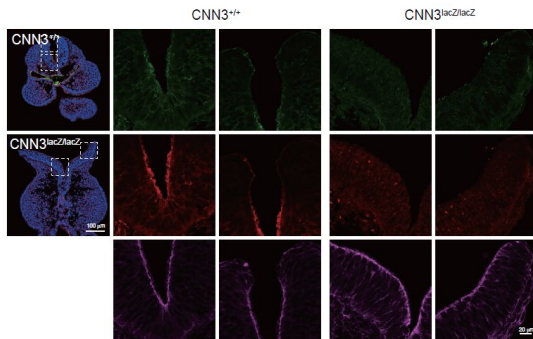
(図2) CTX による筋損傷誘導後の再生筋(日)の抗 pax7 抗体染色



(図3) E8.75 日胚の神経上皮細胞における抗 CNN3 抗体(上段)および抗リン酸化 CNN3 (中段、pS296) 抗体による染色

NTC は細胞の増殖、アポトーシス、移動や細胞骨格の再編成などが協調して機能することで正常に完了する。これまでに NTD に関与する 200 を越える遺伝子が同定されているがその多くはこれらに分類されている。しかしながら、E8.75 日胚において細胞増殖、E10.5 日胚におけるアポトーシスと神経細胞への分化に対して野生型胚と *Cnn3^{lacZ/lacZ}* 胚の間では殆ど差は認められなかった。そこで *Cnn3^{lacZ/lacZ}* 胚のアクトミオシンケーブルの収

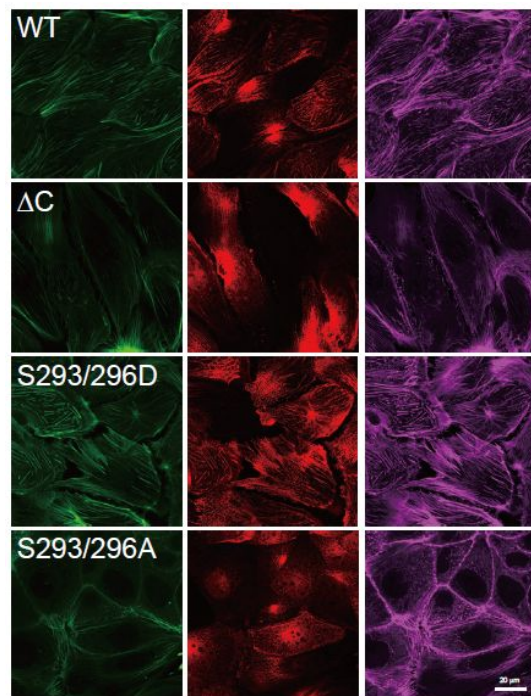
縮度をミオシン軽鎖のリン酸化レベルと比較したところ、野生型に比べ *Cnn3^{lacZ/lacZ}* 胚では神経上皮アピカル領域のリン酸化レベルが低下しており、F-アクチンの集積も弱くなっていることが明らかとなった。ROCK はミオシン軽鎖のリン酸化を通してアクチン細胞骨格の再編成を制御することが知られており、また我々は生体内の CNN3 キナーゼとして ROCK を同定している。そこで次に ROCK が CNN3 キナーゼとして NTC に関与しているかどうかを検討した。E8.75 日胚での ROCK の局在を確認したところ ROCK1 および ROCK2 の神経上皮アピカル領域への局在も抑制されていた (図4)。ROCK の神経上皮アピカル部への局在は Shroom3 によって制御されているという報告がある。そこで次に shroom3 の局在を確認したところ ROCK1/2 と同様に Shroom3 の神経上皮アピカル部への集積も *Cnn3^{lacZ/lacZ}* 胚では弱くなっていた。これらの事から CNN3 は Shroom3-ROCK を神経上皮アピカル領域にアンカーさせるのに必要な分子として機能する事が示唆される。



(図4) E8.75 日胚神経上皮細胞における CNN3 (緑) と ROCK2 (赤) およびファロイジン (紫) 染色像

CNN ファミリーはアクチン結合タンパク質でありアクチンの他トロポミオシンなどアクトミオシンケーブル構成分子と会合する事が知られているが CNN3 のパートナーとなり得る分子の報告例は他のファミリー分子に比べて報告例は多くない。そこでイヌ腎臓由来上皮細胞の MDCK やマウス筋芽細胞の C2C12 に Flag タグを付加した CNN3 を過剰発現させ CNN3 会合分子の検索とペプチドマスフィンガー法による分子同定を行った所、ミオシン重鎖(MHCIIA)、トロポミオシンなどが同定された。次に CNN3 と MHCIIA の会合がどのように制御されているかを確認するために Flag タグを付加した野生型と変異型 CNN3 を発現させ co-IP 実験を行った。野生型 Flag-CNN3 や主なリン酸化部位2箇所をアスパラギン酸に置換した CNN3(Ser293/296Asp)は MHCIIA と複合体を形成していたのに対し、同リン酸化部位をアラニンに置換した変異体 (Ser293/296Ala) や C 末領域の全てのリン酸化部位を欠失した変異体(delta-C)ではこの会合が顕著に抑制されていた。さらに細胞内での共局在を確認するために MDCK 細胞に YFP タグを付加した

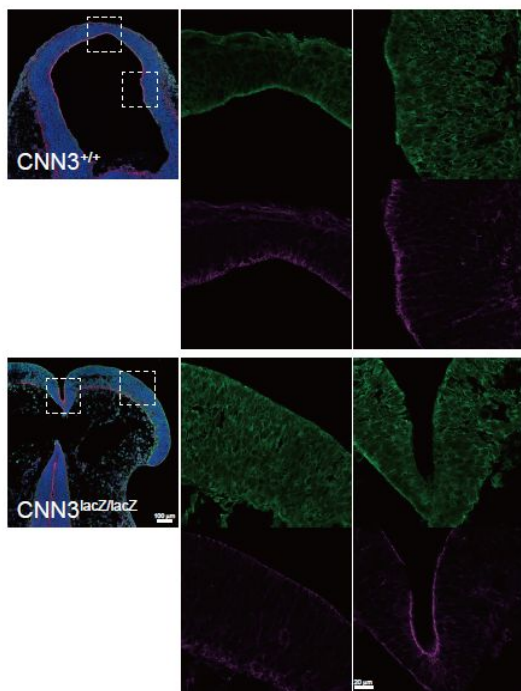
CNN3 を発現させて MHCIIA や F-アクチンとの共局在を確認したところ、野生型と Ser293/296Asp 変異体では CNN3 と MHCIIA の局在が重なっていたのに対し、Ser293/296Ala や delta-C では共局在が認められなかった (図5)。さらにこれらの変異体では F-アクチンとの共局在も阻害されていた。これらの事から CNN3 と MHCIIA の会合は CNN3 のリン酸化を介して制御されているだけでなく CNN3 はリン酸化される事によって F-アクチンとミオシンを繋ぐ事が示唆される。次に NTC 過程でも CNN3 が神経上皮細胞アピカル領域のアクトミオシンケーブル形成に寄与するかどうかを検討したところ、E8.75 日胚の野生型神経上皮アピカル領域に局在していた MHCIIA は *Cnn3^{lacZ/lacZ}* 胚ではその局在が弱くなっており F-アクチンの集積も弱い事を確認した (図6)。これらの事から神経管閉鎖過程で CNN3 は神経上皮アピカル領域でのアクトミオシンケーブルの形成に寄与する事によって神経管の閉鎖に必要な収縮力を生み出す事に寄与していると考えられた。以上の事から CNN3 は NTC 過程において安定したアクトミオシンケーブルを形成することによって ROCK と Shroom3 を神経上皮アピカル領域にアンカーするための足場を形成し管形成に必要な収縮力を生み出す事に寄与していると考えられた。



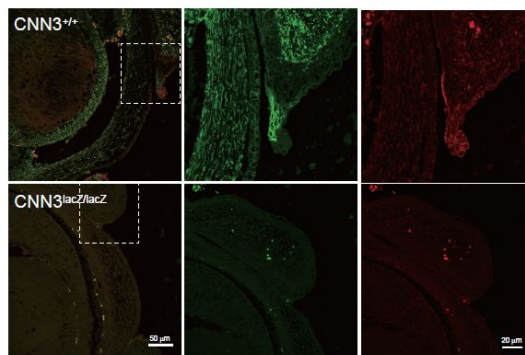
(図5) YFP-CNN3 を発現させた MDCK 細胞の抗 MHCIIA 染色 (赤) とファロイジン (紫) 染色像

眼瞼閉鎖は E15.75 日胚の眼瞼上皮から遊走性ケラチノサイト(peridermal cell)が発生し上下眼瞼の伸張を先導、E16.5 で完了することが報告されている。野生型の E15.75 日胚ではこの peridermal cell の発生を HE 染色で確認

しておりそのマーカーである Kelatin6 の発現も誘導していた。この時期の CNN3 の発現は peridermal cell と mesenchyme で認められており、眼瞼上皮先端部では kelatin6 陽性細胞根幹部の上皮細胞で発現していた(図7)。同時期の *Cnn3^{lacZ/lacZ}* 胚では peridermal cell の発生が認められず閉鎖が完了する E16.5 日胚でその出現が確認される個体もあった。この事から *Cnn3^{lacZ/lacZ}* 胚の眼瞼閉鎖過程では peridermal cell の発生が阻害されている、又は遅延することによって眼瞼閉鎖不全となっている事が示唆された。peridermal cell における F-アクチンの集積は眼瞼閉鎖に重要なステップであり ROCK によって制御されていることが ROCK 1 あるいは ROCK2 ノックアウトマウスの解析により証明されている。そこで peridermal cell での ROCK の発現と F-アクチンの集積を確認したところ、野生型胚の peridermal cell では CNN3 の発現と ROCK1/2 の局在が重なっており F-アクチンの集積が認められたが peridermal cell の発生に障害が生じている *Cnn3^{lacZ/lacZ}* 胚では ROCK の発現や F-アクチンの集積が誘導されていなかった。これらの事から眼瞼閉鎖過程において CNN3 は peridermal cell の発生に必須な ROCK の発現と F-アクチンの集積に必要な分子であると考えられた。これらの事から CNN3 は神経管閉鎖や眼瞼閉鎖過程といった上皮の形態変化において安定したアクトミオシンケーブルの形成に寄与するだけでなく ROCK や Shroom3 といった閉鎖過程に決定的に機能する分子が局在する足場を提供する事にも寄与していると考えられた。



(図6) E9.5 日胚の神経上皮細胞アピカル領域における MHCIIA (緑) の局在と F-アクチン (紫) の集積



(図7) E15.75 胚の眼瞼上皮 peridermal cell における抗 CNN3 染色 (緑) と抗 kelatin6 染色 (赤)

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6件)

Okuda, H., Tatsumi, K., Morita, S., Shibukawa, Y., Korekane, H., Horii-Hayashi, N., Wada, Y., Taniguchi, N. and Wanaka, A. (2014). Chondroitin sulfate proteoglycan tenascin-R regulates glutamate uptake by adult brain astrocytes. *The Journal of biological chemistry* 289, 2620-2631.

Iwai, K., Shibukawa, Y., Yamazaki, N. and Wada, Y. (2014). Transglutaminase 2-dependent deamidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes trophoblastic cell fusion. *The Journal of biological chemistry* 289, 4989-4999.

Shibukawa, Y., Yamazaki, N., Daimon, E. and Wada, Y. (2013). Rock-dependent calponin 3 phosphorylation regulates myoblast fusion. *Experimental cell research* 319, 633-648.

Daimon, E., Shibukawa, Y. and Wada, Y. (2013). Calponin 3 regulates stress fiber formation in dermal fibroblasts during wound healing. *Archives of dermatological research* 305, 571-584.

Tsume, M., Kimura-Yoshida, C., Mochida, K., Shibukawa, Y., Amazaki, S., Wada, Y., Hiramatsu, R., Shimokawa, K. and Matsuo, I. (2012). Brd2 is required for cell cycle exit and neuronal differentiation through the E2F1 pathway in mouse neuroepithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 425, 762-768.

Sano, M., Korekane, H., Ohtsubo, K., Yamaguchi, Y., Kato, M., Shibukawa, Y., Tajiri, M., Adachi, H., Wada, Y., Asahi, M., et al. (2012). N-glycans of SREC-I (scavenger receptor expressed by endothelial cells): essential role for

ligand binding, trafficking and stability.
Glycobiology 22, 714-724.

〔学会発表〕(計7件)

岩井香織、渋川幸直、山崎奈津子、和田芳直.
質量分析が明らかにしたトロホプラスト細胞融合における GAPDH の酵素的脱アミドとその機能. 第62回質量分析総合討論会 2014.9.14 (吹田)

渋川幸直、山崎奈津子、大門江津子、木村-吉田千春、持田京子、松尾勲、和田芳直. アクチン結合分子カルポニン3の生理的役割の解明. 第87回生化学会. 2014.10.16 京都

渋川幸直、山崎奈津子、大門江津子、木村・吉田千春、持田京子、松尾勲、和田芳直. 細胞融合制御因子カルポニン3の生理的役割の解明. 第86回日本生化学会大会. 2013.9.11 横浜

渋川幸直、山崎奈津子、大門江津子、木村-吉田千春、持田京子、松尾勲、和田芳直. 細胞融合制御因子カルポニン3の生理的役割の解明. 第85回日本生化学会大会. 2012.12.15: 福岡

岩井香織、渋川幸直、山崎奈津子、角谷真智子、和田芳直. GAPDH の Transglutaminase 2 依存的脱アミド化による BeWo 細胞の細胞融合. 第85回日本生化学会大会. 2012.12.15: 福岡

渋川幸直、山崎奈津子、大門江津子、木村-吉田千春、持田京子、松尾勲、和田芳直. アクチン結合蛋白質カルポニン3の生理機能. 大阪大学 GCOE オルガネラネットワーク医学創成プログラム 成果報告会. 2012.12.25: 淡路

岩井香織、渋川幸直、山崎奈津子、角谷真智子、和田芳直. BeWo 細胞融合における GAPDH 翻訳後修飾. 大阪大学 GCOE オルガネラネットワーク医学創成プログラム 成果報告会. 2012.12.25: 淡路

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
大阪府立母子保健総合医療センター
<http://www.mch.pref.osaka.jp/>
研究所代謝部門
<http://www.mch.pref.osaka.jp/research/molecular/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
渋川 幸直 (Shibukawa Yukinao)
母子センター研究所代謝部門主任研究員
研究者番号: 90393264

(2)研究分担者
大門 江津子 (Daimon Etsuko)
母子センター研究所代謝部門研究技術員
研究者番号: 90581314

(3)研究協力者
山崎 奈津子 (Yamazaki Natsuko)
母子センター研究所代謝部門研究補助員

(4)研究協力者
岩井 香織 (Iawai Kaori)
母子センター研究所代謝部門 大学院生