

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月23日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570067

研究課題名（和文）細胞外基質アリールスルファターゼの組織特異的な分子環境と形態形成制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the tissue-specific molecular structure and the regulatory mechanism in morphogenesis by extracellular arylsulfatase

研究代表者

中坪 敬子(光永 敬子)(MITSUNAGA-NAKATSUBO KEIKO)

広島大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：40192760

研究成果の概要（和文）：メダカアリールスルファターゼ(Ars)の分子環境と機能抑制の影響解析から、ArsA と ArsB はユビキタスに合成されるが、細胞表層での局在や細胞外基質との共局在は血管内腔(ArsA)や脳室(ArsB)等の限られた領域であること、ArsB は形態形成に欠かせないことが示された。硫酸化基質の代謝酵素と考えられてきた Ars は、発生過程で循環系を介して細胞外基質としての分子環境を築き、機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Immunohistochemical analysis using medaka arylsulfatase (Ars) antibodies revealed that extracellular distribution and colocalization with extracellular matrices of ArsA and ArsB were observed only in the restricted regions, such as on the luminal side of blood vessels, and in the cerebral ventricle, though they were ubiquitously synthesized. Knockdown analysis of Arses by using morpholino antisense oligonucleotides showed that ArsB is involved in morphogenesis during medaka development. These results suggest the possibility that the Arses function as novel components of extracellular matrices by constructing extracellular environment through circulatory systems during development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
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：基礎生物学・形態・構造

キーワード：細胞外基質、アリールスルファターゼ、分子環境、形態形成、発生

1. 研究開始当初の背景

アリールスルファターゼ(Ars)は、芳香族硫酸エステル(アリール硫酸)の加水分解酵素として解釈されてきた。Ars 遺伝子の変異・欠損の多くは、特定疾患：ライソゾーム病を起こし、酵素活性の欠如が硫酸化基質のライソゾーム内への蓄積を招くことに由来する

と考えられている(Parenti *et al.*, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7:386-391, 1997)。このため、疾患に伴う Ars の活性量と活性局在の変化に注目した研究が主流であった。

研究代表者らは、我々脊索動物と同じ新口動物に属する棘皮動物のウニ胚では、Ars の大部分が酵素活性を持たずに細胞表層に局

在すること (Mitsunaga-Nakatsubo *et al.*, *J. Exp. Zool.*, 280:220-230, 1998)、非酵素型 Ars は形態形成運動に関与する細胞外基質であることを明らかにした (Mitsunaga-Nakatsubo *et al.*, *Dev. Genes Evol.*, 219:281-288, 2009)。更に哺乳類のマウスやラットでも、細胞外基質を固定し、特異的な抗体を用いた免疫染色法を確立することにより、肝類洞の血管内皮細胞や実質細胞等の表層で細胞外基質のヘパラン硫酸プロテオグリカンと共局在する ArsA と ArsB の検出に体細胞で初めて成功し、哺乳類でも Ars は細胞外基質の構成因子である可能性が高いことを報告した (Mitsunaga-Nakatsubo *et al.*, *Med. Mol. Morphol.*, 42:63-69, 2009)。また組換え Ars タンパク質を用いた *in vitro* の系で Ars が細胞形態を制御する可能性を示唆する結果を得た。ArsA の疾患 (異染色性白質ジストロフィー:MLD) では、神経細胞の形態異常、ミエリン鞘の脱髄、ArsB の疾患 (ムコ多糖症 VI 型) では、組織の空胞化、肥大、骨格形成異常、成長遅延等の重篤な形態異常を招くことが報告されている。以上より、研究代表者らは、正常な形態形成には、発生過程における Ars を核とした細胞外基質の組織特異的な分子環境の形成が必要であるという考えに至った。

Ars の研究には、従来患者由来の培養細胞やノックアウトマウス等の哺乳類の疾患モデル動物が用いられ、Ars 活性の変化と疾患との関係の解析に研究の重点がおかれていた。しかし、哺乳類は胎生であるため、Ars の変異 (原因) と疾患 (結果) との因果関係は示せても、変異が発生過程のいつ、どこで、どのように影響を及ぼしているのかを解析するのは困難であった。哺乳類と共通する発生機構を示しながら、発生が速く、胚が透明で初期発生から器官形成に至る細胞運動と形態変化の観察が容易なメダカを用いるならば、Ars の欠損、変異の影響をリアルタイムで解析できるので、細胞外基質としての Ars の機能解析には最適であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、メダカを主なモデル動物として、Ars を既存の解釈である硫酸化基質を加水分解する酵素としてではなく、硫酸化基質と複合体をなす新奇の細胞外基質であるという視点に立ち、細胞外基質 Ars がどのような機構で形態形成を制御しているのかを解明することを目的とした。そのために、Ars を核とした組織特異的な分子環境と、Ars の機能抑制がもたらす細胞外基質環境の破綻が細胞の形態・構造、移動、器官形成に及ぼす影響を解析した。また、これらの結果を統合して細胞外基質 Ars による形態形成制御モデルの作製を目指した。

Ars は、哺乳類では A-K まで報告されているが、研究報告が多く、研究代表者らが哺乳類で細胞外に検出した ArsA と ArsB に注目した。本研究では、人工基質を用いた活性染色ではなく、細胞外基質を保持した免疫組織化学的手法により従来見逃されてきた細胞外基質としての Ars を検出して解析を行った。

3. 研究の方法

実験には、メダカ OK-Cab 系統を主に使用し、細胞外基質の分子環境に関しては、比較対象としてマウスを併用した。

(1) 細胞外基質 Ars の分子環境を以下の方法で解析した。

① mRNA の発現解析

ゲノム情報を元に、他のスルファターゼと相同性のない領域を用いて RT-PCR を行い、*in situ* ハイブリダイゼーションにより発現領域を調べた。

② 蛍光抗体染色、免疫電顕

ArsA、ArsB に特異的で、修飾のないアミノ酸配列を抗原として、メダカ抗体を作成した。

メダカ胚及び成体組織の固定と免疫染色は、石川の方法 (Ishikawa *et al.*, *Brain Behav. Evol.*, 58:173-184, 2001; *J. Comp. Neurol.*, 476:240-253, 2004; *Brain Behav. Evol.*, 75:88-103, 2010) を改変して行った。固定した試料は、OCT コンパウンド又はゼラチンに包埋後、 -60°C で凍結し、クリオスタットで切片を作製し、蛍光抗体染色、免疫電顕を行った。この固定と免疫染色の過程で常にメダカ生体内と同じ濃度の 2 価イオンを添加することにより、細胞外基質の遊離を防いだ。マウスの組織を用いた免疫染色は、研究代表者らが既に報告した方法で行った (Mitsunaga-Nakatsubo *et al.*, *Med. Mol. Morphol.*, 42:63-69, 2009)。

(2) Ars の機能抑制の影響を下記の方法で解析した。

① Ars の翻訳抑制の影響

ArsA 及び ArsB のモルフォリノアンチセンスオリゴを受精卵に顕微注入し、Ars の翻訳抑制が形態形成に及ぼす影響を解析した。

② Ars 変異メダカの形態形成における影響

NBRP メダカに寄託されている TILLING ライブラリー (Taniguchi *et al.*, *Genome Biol.*, 7:R116.1-R116.13, 2006) よりスルファターゼドメイン内に変異がある候補を選び、人工授精を行って ArsA、ArsB 変異メダカを得て、形態形成への影響を解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞外基質 Ars の分子環境の解析

Ars の細胞外基質としての分子環境を調べるためには、細胞外基質を合成、供給する経路を明らかにする必要があった。加えて、Ars

遺伝子疾患:ライソゾーム病は進行性の疾患であるにも関わらず、Ars の発生過程における発現の報告が脊椎動物ではなかったため、メダカ胚発生過程における *ArsA*, *ArsB* の mRNA の発現変化を RT-PCR により調べた。*ArsA*, *ArsB* は共にマターナルに発現があり、囊胚期に減少した後、神経胚期から体節期にかけて発現量が増加し、発生過程をとおりて発現が検出された。*ArsB* は体節期に発現量が高く、その後低下することが示された。*in situ* ハイブリダイゼーションにより、両 *Ars* が孵化期までは胚全体のユビキタスな低い発現を示し、局在しないことを明らかにした。この傾向は、我々の研究開始と同時に発表されたマウス胚の解析結果 (Ratzka *et al.*, *Dev. Dyn.* 239:1779-1788, 2010) と共通していたが、メダカ胚を用いることにより発生過程におけるより詳細な発現パターンを明らかにできた。

メダカ細胞外基質の分子環境は、我々が確立した細胞外基質を保持した免疫組織化学的方法により検討した。*ArsA* に関しては、蛍光抗体染色法と免疫電顕により、多様な組織で合成されていること、細胞外としては血管内皮細胞の内腔に面した細胞表面に局在していることを確認した。マウスでも *ArsA* が肝類洞のコラーゲン繊維上や血管内皮細胞表面で主要な細胞外基質と共局在していることを確認し、従来見逃されてきた基底膜以外における *Ars* を含む細胞外基質環境の存在を明らかにした。*ArsB* に関しては、プロセッシングにより低分子化した細胞内型とプロセッシングを受けない細胞外分泌型が存在する (Steckel *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 258: 14322-14326, 1983; Bond *et al.*, *Structure* 5:277-289, 1997) ことに注目し、解析した。胚発生期には細胞内型が主で細胞外分泌型は少なく、成体では両者の割合は組織ごとに異なり、細胞外分泌型は脳に顕著に多いことが判明した。脳に注目した解析により、*ArsB* は脳室に面した上皮細胞と考えられる細胞で主に合成され、脳室内に豊富で、*ArsB* とコンドロイチン硫酸プロテオグリカン、コラーゲン I 抗体で認識される分子とが共局在していることが示された。細胞外 *ArsB* に関しては、研究代表者らがラットで発表して以来他の研究者からも報告が続いているが、培養細胞を用いた解析が主流で成体組織における細胞外基質環境の解析には至っていない。

(2) *Ars* の形態形成における機能の解析
モルフォリノオリゴによる *Ars* の短期的発現抑制が形態形成に及ぼす影響を調べた。*ArsA* モルフォリノオリゴ処理胚では、翻訳抑制は確認されたが、遺伝子疾患 MLD と同様、発生初期の形態形成への影響は認められなかった。

他方、*ArsB* モルフォリノオリゴによる翻訳抑制胚では、胚全体で *ArsB* の発現が低下し、エピボリーの抑制、前後軸の退縮、頭部形成不全、血管・骨格形成異常等の体全体での発育遅延が認められ、形態形成に欠かせないことが示された。モルフォリノ胚は組織の強度が低下していたが、コラーゲン I 等の細胞外基質の局在と発現の変化は認められなかった。細胞外分泌型と細胞内型 *ArsB* を区別した機能解析が今後必要である。*Ars* の継続的な欠損が及ぼす影響を調べるために、TILLING 法によりスルファターゼドメインのコアとその近傍のアミノ酸に変異を持つ *ArsA*, *ArsB* 変異メダカを得たが、これまで調べた変異体では形態形成への影響は確認できていない。

(3) 細胞外基質 *Ars* による形態形成制御モデルの検討

ArsA, *ArsB* 共に種々の組織で合成されていたが、細胞外での分布や細胞外基質との共局在は血管の内腔や脳室等の循環系に面した領域に限られていた。*ArsB* に関しては胚発生期には細胞内型の割合が多く、*Ars* モルフォリノオリゴ処理が細胞外基質の局在に及ぼす影響は低かった。*Ars* は循環系を介して発生後期に細胞外基質としての分子環境を築き、機能している可能性が示唆される。*Ars* を合成、分泌し、細胞外基質環境を構築する経路及び、ヒト疾患型 *Ars* メダカを作製し、分子環境の破綻と形態異常との関係に関するより詳細な解析を行う必要がある。

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 2 件)

- ① Keiko Mitsunaga-Nakatsubo, Yoshihiro Akimoto, Shinichiro Kusunoki and Hayato Kawakami, Novel structure of hepatic extracellular matrices containing arylsulfatase A, *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 査読有, 90(1), 2013, 印刷中。
- ② Kazumasa Fujita, Naoko Teramura, Shunji Hattori, Shinkichi Irie, Keiko Mitsunaga-Nakatsubo, Yoshihiro Akimoto, Naoaki Sakamoto, Takashi Yamamoto, and Koji Akasaka, Mammalian arylsulfatase A functions as a novel component of the extracellular matrix, *Connective Tissue Research*, 査読有, 51(5), 2010, 388-396。

[学会発表] (計 6 件)

- ① 中坪敬子(光永敬子)、秋元義弘、安井金

也、楠慎一郎、山下一郎、川上速人、安増茂樹、メダカアリアルスルファターゼ B(ArsB)の免疫組織化学的解析、日本動物学会第83回大会、2012年9月13日、大阪府

- ② 中坪敬子(光永敬子)、秋元義弘、楠慎一郎、山下一郎、川上速人、赤坂甲治、安増茂樹、細胞外基質アリアルスルファターゼ B(ArsB)の発現と機能解析、2011年度日本動物学会中国四国支部広島県例会、2012年3月3日、東広島市
- ③ 中坪敬子(光永敬子)、秋元義弘、楠慎一郎、山下一郎、川上速人、安増茂樹、アリアルスルファターゼ B(ArsB)のメダカ胚形態形成における機能の解析、日本動物学会第82回大会、2011年9月22日、旭川市
- ④ 中坪敬子(光永敬子)、アリアルスルファターゼの形態形成における機能の解析、水腔動物(Ambulacraria)の発生生物学、2010年11月20日、三浦市
- ⑤ 中坪敬子(光永敬子)、安増茂樹、山下一郎、赤坂甲治、メダカ胚形態形成におけるアリアルスルファターゼ(Ars)の機能解析、日本動物学会第81回大会、2010年9月23日、東京都
- ⑥ 中坪敬子(光永敬子)、秋元義弘、福田稔、松原幸枝、楠慎一郎、川上速人、赤坂甲治、肝臓の細胞表面に局在するアリアルスルファターゼ(ArsA、ArsB)、日本顕微鏡学会第66回学術講演会、2010年5月24日、名古屋市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中坪 敬子 (光永 敬子)
(MITSUNAGA-NAKATSUBO KEIKO)
広島大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：40192760

(2) 研究分担者

安増 茂樹 (YASUMASU SHIGEKI)
上智大学・理工学部・教授
研究者番号：00222357

(3) 連携研究者

秋元 義弘 (AKIMOTO YOSHIHIRO)
杏林大学・医学部・准教授
研究者番号：60184115