

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 29 日現在

機関番号：34311

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21494

研究課題名(和文) 初期発生胚をモデルとした細胞内膜ダイナミクスによるシグナル伝達制御機構の解明

研究課題名(英文) The analysis of signal regulatory mechanism by intracellular membrane dynamics at early stage embryogenesis.

研究代表者

川村 暢幸 (Kawamura, Nobuyuki)

同志社女子大学・薬学部・助教

研究者番号：30411086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞の細胞内では、細胞内外での物質の輸送のために、複雑な膜動態システムが構築されている。この膜動態は物質の輸送だけではなく、細胞外からのシグナル伝達の制御にも関与する。Rab7タンパク質はこの細胞内膜動態を制御する因子の一つである。研究代表者はRab7遺伝子欠損マウスを用いて解析を行った結果、Rab7遺伝子の欠損により、発生段階における細胞増殖分化シグナル伝達異常を引き起こし、胚発生が停止することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the eukaryotic cells, complex membrane dynamics systems are constructed for the transport of various substances between inside and outside the cells. This membrane dynamics is involved not only in the transport of substances but also in the control of signal transduction from outside the cell. Rab7 protein is one of factors that regulates the intracellular membrane dynamics. As a result of analyzing using Rab7 gene-deficient mice, disruption of the Rab7 gene causes signaling defect of cell proliferation and differentiation at the developmental stage and embryogenesis stops.

研究分野：細胞生物学

キーワード：初期胚発生 Rab7 膜動態 micro autophagy wntシグナル

1. 研究開始当初の背景

生体は様々な周囲の環境に適応する必要性から、分泌性因子によって担われるシグナル伝達機構を発達させており、それらへの応答として細胞の運命や行動が決定される。シグナルの生成・受容・消去のプロセスには、細胞内膜輸送が関与している。とりわけ、エンドサイトーシス経路がシグナルを制御するというメカニズムは古くから提唱されているが、これらの研究のほとんどが、培養細胞での観察を基に行われてきた。

シグナル伝達の制御と細胞運命の決定が特にダイナミックに行われるのが多細胞生物の胚発生期であることから、初期胚は、シグナル生成・受容・応答を研究するのに大変適している。

マウス6日胚において、栄養やシグナル因子の吸収に重要な臓側内胚葉 (Visceral endoderm, VE) とよばれる細胞グループでは極めて活発にエンドサイトーシスが起きており、細胞内小器官が発達している。細胞表層、細胞内の膜小器官同士は互いに物質と情報をやりとりしてダイナミックなネットワークを形成しており、エンドサイトーシス経路 (特に初期エンドソーム) は細胞の増殖や分化、さらには細胞同士の位置関係を支配するシグナル伝達システムにも深く関わることが報告されている。

研究代表者は、蛍光色素を結合させた高分子物質を初期発生胚に取り込ませ、経時的に観察する系を新たに確立し、哺乳類初期胚の VE 細胞におけるエンドサイトーシス経路の終着点が高頂端液胞 (Apical vacuole) という巨大な液胞であることを見いだした。また、通常、小胞同士がひとつの空胞になる場合、小胞同士が接着し、互いの膜が融合して一つの連続した膜をつくる Canonical fusion 様式を経るが、初期発生胚の液胞では、大きな液胞が小さな前駆体を飲み込んだ後、液胞内で膜を分解してひとつの小器官になる、Microautophagy like fusion で示した独特な様式を取ることを新たに見いだした (Kawamura *et al. Nat. Commun.* 2012) 報告した。

研究代表者のグループでは後期エンドソーム～リソソームの形成に必要な *mVam2* (*VPS41*) 遺伝子欠損マウス胚において、(i) VE における断片化した小胞の蓄積が観察され頂端液胞が形成されない、(ii) 胚体中胚葉の形成が阻害される、(iii) BMP シグナル伝達が亢進している、ことを見いだしている (Aoyama *et al. Dev cell.* 2012)。また、同じく後期エンドソーム～リソソームの形成に必要な *rab7* 遺伝子欠損マウス胚において、(i) *mVam2* 遺伝子欠損マウスと同様に断片化した小胞が蓄積し、巨大な頂端液胞は形成されない、(ii) 胚体中胚葉組織が低形成となる、ことを明らかにした。これらの結果は、マイクロオートファジーを含めた細胞内の物質輸送が、初期胚発生にきわめて重要であることを示している (Kawamura *et al. Nat. Commun.* 2012)。しかし、*rab7* 欠損胚では、*mVam2* 欠損胚でみられた BMP シグナル伝達の亢進は見られず、両者は同様の膜動態異常表現型 (断片化した小胞の蓄積) を示すのにもかかわらず、シグナル伝達に関しては、異なる異常が生じていることが明らかになった。

2. 研究の目的

哺乳類初期胚では、胎盤が形成される以前の時期において、Visceral endoderm (VE) と呼ばれる細胞グループできわめて活発にエンドサイトーシスが起きており、かつ、様々なシグナルが行き交い細胞の分化がダイナミックに行われる。

近年、細胞外からの膜を通じたシグナル伝達経路の調節において Rab タンパク質等の関与する膜動態制御機構の関与が指摘されている。私は、*rab7* 遺伝子ノックアウトマウス胚において、いくつかのシグナル伝達経路の異常が、中胚葉の形成異常を引き起こしている可能性を見いだしている。そこで、マウス初期胚を用いて解析を行い、マイクロオートファジー等の膜動態制御による、細胞内シグナル伝達経路の制御について明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) *rab7* 遺伝子ノックアウトマウス (*rab7^{ko/ko}*) の whole mount *in situ* hybridization 法や蛍光抗体法による正常発生に必要なシグナル伝達経路の解析: *rab7^{ko/ko}* マウスが胎生致死となる胎生 6~7 日近辺で重要な働きをしていることが報告されている因子についてその発現量や発現パターンを whole mount *in situ* hybridization 法、蛍光抗体法により解析した。

(2) *rab7* 遺伝子欠損細胞での解析: *rab7* 遺伝子の必須エキソンを *loxP* 配列で挟むようにデザインした組み替えアレルを持つマウス (*rab7^{lox/lox}*) 胚から、胚性線維芽細胞を樹立し、刺激因子で刺激した際のシグナル伝達について Western blot 法を用いて解析した。

(3) 部分特異的 *rab7* 遺伝子ノックアウトマウスを用いた胚発生過程の解析: *rab7* 遺伝子の必須エキソンを *loxP* 配列で挟むようにデザインした組み替えアレルを持つマウス (*rab7^{lox/lox}*) に、さらに、VE 細胞特異的に *Cre* 遺伝子を発現する組み替えアレル (*Ttr::cre*)、Epiblast 細胞特異的に *Cre* 遺伝子を発現する組み替えアレル (*Sox2::cre*) を導入し、各々の細胞群で特異的に *rab7* 遺伝子をノックアウトさせた場合に胚発生過程にどのような変化が見られるか whole mount *in situ* hybridization 法、蛍光抗体法により解析した。

4. 研究成果

(1) *rab7* 遺伝子ノックアウトマウスの whole mount *in situ* hybridization 法や蛍光抗体法による正常発生に必要なシグナル伝達経路の解析

rab7^{ko/ko} マウス胚では、原腸陥入期に発生が停止するため、原腸陥入が起こる際に必要となる EMT (上皮間葉転移) 現象が起こっているか否かについて検討したところ、原腸陥入の起こる primitive streak 領域の細胞の E-cadherin 発現量が低下せず、EMT を阻害していることが明らかとなった。EMT は FGF8、BMP4、Wnt3、Nodal といった因子により誘導されるが、whole mount *in situ* hybridization 法

により検証したところ、これらの因子の発現量には変化が見られなかったのに対し、Wnt3 と Nodal の下流の因子の発現量が低下していることを見だし、Wnt3 と Nodal のシグナル伝達に異常を来していることが明らかになった。

(2) *rab7* 遺伝子欠損細胞での解析

rab7^{lox/lox} 胚から、胚性線維芽細胞を樹立し、*Cre* 発現アデノウイルスを感染させることにより、*rab7* 遺伝子ノックアウト細胞を作製した。ウイルス感染後 48 時間でほぼ完全に Rab7 タンパク質の発現が消失することを Western blot 法により確認した。この細胞に対して、BMP、TGF、EGF 刺激を行い、そのシグナル伝達を下流因子のリン酸化フォームを検出することにより解析したところ、細胞レベルでは BMP、TGF、EGF 刺激によるシグナル伝達には、野生型と *rab7* 遺伝子ノックアウト細胞間で変化が見られなかった。

(3) 部分特異的 *rab7* 遺伝子ノックアウトマウスを用いた胚発生過程の解析

rab7 遺伝子の必須エキソンを *loxP* 配列で挟むようにデザインした組み替えアレルを持つマウスに、さらに、VE 細胞特異的に *Cre* 遺伝子を発現する組み替えアレル (*Ttr::cre*)、Epiblast 細胞特異的に *Cre* 遺伝子を発現する組み替えアレル (*Sox2::cre*) を導入した。VE 細胞特異的に *rab7* 遺伝子を欠損したマウス胚は、*rab7^{ko/ko}* 胚と良く似た表現型を示したのに対し、Epiblast 細胞で *rab7* 遺伝子をノックアウトしたマウス胚は、胎生 6~7 日より後の段階で発生が停止することが明らかになった。この結果から、胎生 6~7 日における原腸陥入の停止という表現型は、VE 細胞における *rab7* 遺伝子機能が欠損したことにより引き起こされたことが示唆され、発生初期の VE 細胞における Rab7 によるマイクロオートファジー制御の重要性が示唆された。また、今回新たに、Epiblast 細胞で *rab7* 遺伝子をノックアウトした場合は、発生中

期程度まで発生が進行し胎生致死となること
が明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) マウス脳における液胞型プロトンポンプ
V-ATPase G1 サブユニット遺伝子の発現量は転
写後調節によって制御される

G1 subunit of vacuolar-type H⁺ pump
(V-ATPase) expression level was controlled by a
post transcriptional regulatory mechanism in the
mouse brain.

川村暢幸, 茸谷麻帆、和田戈虹

同志社女子大学総合文化研究所紀要 27 巻
209-215 2017 年

(2) Membrane Dynamics in Mammalian
Embryogenesis: Implication in Signal Regulation.
Wada Y, Sun-Wada GH, Kawamura N, Yasukawa
J.

Birth Defects Res C Embryo Today. 2016
Mar;108(1):33-44. doi: 10.1002/bdrc.21124.
PMID: 26992153

(3) Loss of G2 subunit of vacuolar-type proton
transporting ATPase leads to G1 subunit
upregulation in the brain.

Kawamura N, Sun-Wada GH, Wada Y.

Sci. Rep. 5, 14027; doi: 10.1038/srep14027
(2015). PMID: 26353914

[学会発表] (計 8 件)

(1) 2017 年 12 月 2017 年度生命科学系学会合
同年次大会 (神戸ポートピアホテル・神戸国際
展示場・神戸)

A 分泌機構における Rab7 およびその結合分
子群の機能解析

小座間大翔、川村暢幸、和田戈虹、和田洋、富

田泰輔

(2) 2017 年 05 月 The 8th International
Symposium on Autophagy, The 15th JBS
Bio-Frontier Symposium (春日野国際フォーラム
麓・奈良)

Regulation of canonical Wnt pathway via
microautophagy in the early mouse embryo.

Yoh Wada, Nobuyuki Kawamura and Ge-Hong
Sun-Wada

(3) 2016 年 10 月 第 66 回 日本薬学会近畿支
部総会・大会 (大阪薬科大学・高槻市)

液胞型プロトンポンプ (V-ATPase) 遺伝子欠損
変異マウスの解析

島田侑実、樋渡 舞、安川淳一郎、川村暢幸、
和田洋、和田戈虹

(4) 2016 年 10 月 第 66 回 日本薬学会近畿支
部総会・大会 (大阪薬科大学・高槻市)

小腸吸収上皮細胞における Rab7 遺伝子の機能
瀧本亜耶、川村暢幸、安川淳一郎、和田洋、和
田戈虹

(5) 2016 年 06 月 3rd NovAliX Conference:
Biophysics in Drug Discovery (Strasbourg,
France)

Neurons without G2 subunit of vacuolar-type
proton transporting ATPase: A better source for
enzyme structure and Functional studies.

Nobuyuki Kawamura, Ge-Hong Sun-Wada, and
Yoh Wada

(6) 2016 年 05 月 18th International
Cyclodextrin Symposium 2016 (Gainesville,
Florida USA)

Reversible control of DNA binding of GAL4
transcription factor by a cyclodextrin-porphyrin
supramolecular complex.

Shigeru Negi, Takuya Ogasawara, Haruka Iede,

Chie Nakayama, Nobuyuki Kawamura, Hiroaki Kitagishi, Koji Kano, Yukio Sugiura

(7) 2015年10月 第65回 日本薬学会近畿支部総会・大会 (大阪大谷大・大阪)

液胞型 H⁺-ATPase G2 サブユニット遺伝子欠損変異マウスの解析

茸谷麻帆、殿村真優、川村暢幸、和田洋、和田戈虹

(8) 2015年10月 第65回 日本薬学会近畿支部総会・大会 (大阪大谷大・大阪)

液胞型 H⁺-ATPase c サブユニット遺伝子欠損変異マウスの解析

中根美穂、山中加也、小杉味菜子、大和真希子、川村暢幸、安川淳一朗、和田洋、和田戈虹

〔図書〕(計 1 件)

哺乳類初期胚におけるマイクロオートファジーによるシグナル制御

Microautophagic modulation of morphogenetic signaling in mammalian early embryogenesis.

和田洋、孫-和田戈虹、川村暢幸

実験医学増刊号 The オートファジー 研究者達の集大成が見える最新ビジュアルテキスト 35 巻 15号 136-143 2017年

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://research-db.dwc.doshisha.ac.jp/rd/html/japanese/researchersHtml/2710/2710_Researcher.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

川村 暢幸(KAWAMURA, Nobuyuki)

同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・特別
任用助教

研究者番号: 30411086