

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570199

研究課題名（和文） 核膜内膜蛋白質によって制御される新規因子群とその機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of novel factors regulated by inner nuclear membrane proteins

研究代表者：長田真一 (Shin-Ichi Osada)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：00244484

研究成果の概要：

本研究では、核膜内膜蛋白質の一つ MAN1 の機能を「シグナルの制御因子」という観点から解析した。*Man1* 欠損胚において心臓の形態異常が現れるメカニズムを調べる過程で、*Man1* 欠損胚では、体軸の左右非対称性の決定に関わる Nodal 経路が異常に活性化するために、左右軸の形成が異常になることを見出した。本研究により、MAN1 が Nodal 経路の制御を介して左右軸の決定に関わることが世界で初めて明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：発生・分化、シグナル伝達、核膜蛋白質、左右非対称性、発現調節

1. 研究開始当初の背景

核膜 (nuclear envelope) は、外膜と内膜から構成される二重膜、両者を貫く核膜孔複合体、そして内膜を裏打ちする核ラミナから構成される (図1)。核膜孔複合体を構成する蛋白質に比べ、核膜自体に存在する蛋白質は、これまで研究対象として関心を払われることは少なかった。しかし、最近になり、核ラミナの構成成分であるラミンや核膜内膜蛋白質が、細胞増殖、細胞死、転写、クロマチンの動態制御など非常に多様な細胞機能に深くかかわること[1]、その異常が筋ジストロフィー症、拡張

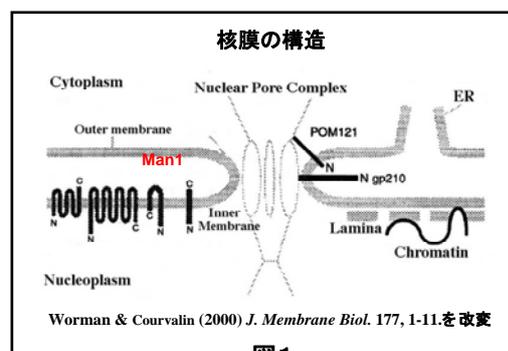


図1

型心筋症、ニューロパシー、早老症といった疾患の原因となること（ラミノパシー [Laminopathy] と総称される）[2]、さらにはレトロウイルスの感染成立にも関与していること [3] などが明らかになってきた。また、肝臓の核膜プロテオミクスの解析から、67 種類におよぶ機能未知の膜貫通ドメインをもつ蛋白が存在することが報告され [4]、核膜蛋白は研究のフロンティアとして大きな可能性を秘めている。

こうした中で、私たちは発現クローニング法を用いて、アフリカツメガエルの外胚葉組織（アニマル・キャップ）を神経化する因子のスクリーニングを行い、強力な神経化因子としてヒトの核膜内膜蛋白質 MAN1 のオースログ XMAN1 を単離した。XMAN1 による神経化のメカニズムを明らかにする過程で、XMAN1 は骨形成因子（bone morphogenetic protein, BMP）経路のメディエーターである Smad1 と直接結合することにより BMP の標的遺伝子の転写を抑制し、神経化を引き起こすことを明らかにした [5]。私たちのこの発見は、ヒト *MAN1* (*LEMD3*) 遺伝子のハプロ不全により起こる、骨斑紋症と皮膚の母斑を主徴とする Busck-Ollendorf 症候群の発症メカニズムの解明に役立ち [6]、核膜内膜蛋白が直接シグナルの制御因子として働いていることを初めて示した報告であると評価されている [1]。その後、少なくとも培養細胞レベルでは、MAN1 は Smad1 ばかりでなく Smad2/3 にも結合して、TGF- β /activin シグナル経路も阻害していることがわかり、MAN1 は、広い意味で TGF- β スーパーファミリー経路の抑制因子であると考えられている [7]。

Man1 (マウス MAN1) の *in vivo* での機能をさらに詳しく調べるため、私たちは Smad 結合ドメインを欠いた *Man1* 欠損マウスを作製し、その解析を行った。その結果、*Man1* 欠損胚は、原始毛細血管叢（primary capillary plexus）がリモデリングにより成熟した血管になる、血管新生過程の異常により胎生致死となることがわかった。また、その原因が、*Man1* 欠損胚では TGF- β 経路に対する抑制が外れた結果、TGF- β 依存的な細胞外マトリックスの産生が亢進して胚体内に異常に蓄積し、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の移動を阻害したためであることを明らかにした [8]。

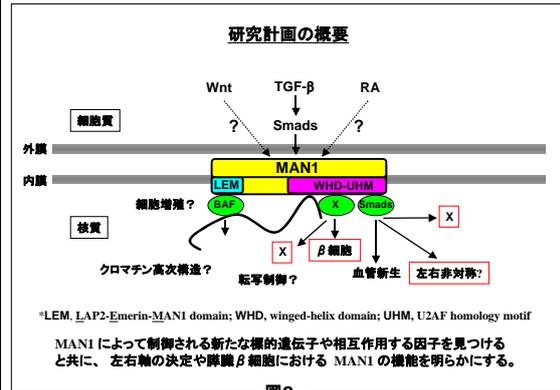
以上を総合すると、「*Man1* 欠損状態 = TGF- β 経路が恒常的に活性化している状態」と考えることができる。そこで、この「*Man1* 欠損状態」を利用することによって、核膜内膜蛋白の新しい機能のみならず、形態形成において種を超えて重要な役割を果たしている TGF- β 経路の新たな制御機構を解明することができるのではないかと考えた。

参考文献

- [1] *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 21-31, 2005.
- [2] *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 575-585, 2002.
- [3] *Nature*, 441, 641-645, 2006.
- [4] *Science* 301, 1380-1382, 2003.
- [5] *Development* 130, 1783-1794, 2003.
- [6] *Nat. Genet.* 36, 1213-1218, 2004.
- [7] *J. Cell. Biochem.* 96, 1185-1192, 1005.
- [8] *Development* 133, 3919-3928, 2006.

2. 研究の目的

図 2 に本研究の概要を示す。



(1) TGF- β 経路の新しい標的因子の探索

MAN1 を TGF- β 経路の制御因子と考えると、野生型胚に比べ *Man1* 欠損胚で発現が増減する遺伝子の中に、新たな TGF- β 経路の標的遺伝子が含まれる可能性が高い。そこで、私たちはジーンチップを用いて、胎生 8.5 日の野生型胚と *Man1* 欠損胚の遺伝子発現パターンを比較した。その結果、*Man1* 欠損胚で発現が 2 倍以上増加した遺伝子を 169 種、2 倍以上減少した遺伝子を 97 種見出した。この中から TGF- β 経路の直接的な標的遺伝子を見つけ、その機能を細胞レベル、および個体レベルで解析する。

(2) 膵臓β細胞における MAN1 の機能解析

Man1 の発現パターンを調べる過程で、*Man1* は膵臓ではランゲルハンス島に発現していることがわかった。この局在の生理学的な意義を、インシュリンの転写、分泌との関係の中で調べる。

(3) MAN1 が関与する新たなシグナル経路

Man1 欠損胚では、高頻度に心臓の形態異常が認められた。心臓の形態異常は、左右非対称性の異常を伴うことが多い。そこで、TGF- β ファミリーに属し、左右非対称性の形成に関わっている重要な因子である *Nodal*、*Lefty1*、*Lefty2* の発現を *Man1* 欠損胚で調べる。

一方、予備的なデータながら、*Man1* 欠損胚でみられた *Nodal*、*Lefty1/2* の発現パターンは、レチノイン酸 (RA) 処理した胚のそれと

非常に類似しており、RA シグナルと *Man1* に何らかの相互作用が存在することが示唆された。また、*Man1* 欠損胚で発現が低下した遺伝子の中に *Wnt3a* を見出した。*Wnt3a* 欠損胚でも左右軸の形成異常が報告されている。そこで、*Man1* 欠損胚における左右非対称性の異常の解析を通して、*Man1* と RA 経路、Wnt 経路との関係についても検討する。

3. 研究の方法

(1) TGF β 経路の新しい標的遺伝子の探索

ジーンチップ解析で、*Man1* 欠損胚で野生型胚に比べ発現が2倍以上増減した遺伝子のうち、まず5倍以上(最大45.3倍)増加した遺伝子53種、5倍以上(最大29.8倍)減少した遺伝子を45種について TGF β 経路の直接的な標的であるか否かを以下の方法で調べる。

- ①発現の増減を RT-PCR で再確認する。
- ②蛋白合成阻害剤存在下でも TGF β 1 または BMP で誘導される遺伝子を探す。
- ③ゲノム配列を調べ、Smad 結合のコンセンサス配列があるかどうかを調べる。

(2) 膵臓 β 細胞における MAN1 の機能解析

グルコース応答性のインシュリノーマ由来のマウス MIN-6 細胞に、MAN1 を高発現させた時、または siRNA を用いて MAN1 の機能をノックダウンした時のインシュリン遺伝子の転写活性化をリポーターアッセイで、インシュリン分泌顆粒の存在を免疫染色で、培地中へのインシュリンの分泌を ELISA 法で調べる。

(3) MAN1 が関与する新たなシグナル経路の探索

① MAN1 と Nodal 下流のシグナル

Man1 欠損胚で左右非対称性の形成に関わる *Nodal*、*Lefty1*、*Lefty2* の発現を、全胚 *in situ* ハイブリダイゼーション法によって調べる。また同時に、左右非対称性に関わることが知られている他の遺伝子 (*Wnt3a*、*FGF8*、*BMP4*、*cryptic*、*GDF* など) についても発現パターンを詳細に調べる。

② MAN1 と Wnt シグナル

Wnt3a 欠損マウスは左右非対称性の異常を示すが (*Development* 132, 5425-5436, 2005)、ジーンチップ解析の結果、*Man1* 欠損胚で *Wnt3a* の発現減少がみられた。そこで、*Man1* と Wnt シグナルの関係を以下の方法で検討する。

- (a) *Man1* 欠損胚および MEF 細胞内で、内在性 β -catenin の細胞内局在が変化しているか、抗 β -catenin 抗体を用いた免疫染色実験で調べる。
- (b) *Wnt3a* 欠損胚では、結節 (node) で内在性 β -catenin の細胞内局在の変化や

機械感覚性繊毛 (mechanosensory cilia) のマーカー、*polycystin1 (PC1)* の発現減少が観察された。*Man1* 欠損胚におけるこの繊毛の異常の有無を、抗 PC1 抗体を用いた免疫染色や走査電子顕微鏡観察で調べる。さらに繊毛運動に関わる *left-right dynein (Lrd)* の発現パターンを全胚 *in situ* ハイブリダイゼーション法で調べる

- (c) 胎生 8.5 日目前後の *Man1* 欠損胚から樹立した mouse embryonic fibroblast (MEF) を用い、野生型胚由来の MEF との間で Wnt 応答性に差があるかを、レポーターアッセイで調べる。

③ MAN1 と レチノイン酸 (RA) シグナル

予備的な実験ながら、これまでに *Lefty1/2* の発現が *Man1* 欠損胚で増強していることが観察され、その発現パターンは、RA 処理した胚のパターンに類似していることがわかった (*Development* 126, 2589-2596, 1999)。 *Lefty1/2* は RA によって誘導される因子としても知られる (*Dev. Biol.* 215, 332-342, 1999)。したがって、「*Man1* 欠損胚では内在性 RA シグナルが亢進し、その結果、左右非対称性の異常が生じた」と仮定し、*Man1* と RA シグナルの関係を調べる。

- (a) RA シグナル阻害剤 (LE540) 存在下で *Man1* 欠損胚を *in vitro* で培養し、異所的な *Nodal* の発現が消失するか調べる。
- (b) F9 細胞を RA 酸で処理すると、*Lefty1/2* が誘導される。この系を利用して、F9 細胞で *Man1* を過剰発現またはノックダウンさせたとき、*Lefty1/2* の発現を調べる

4. 研究成果

研究の進展場、研究目的(3)の「MAN1 が関与する新たなシグナル経路」に本研究期間の大部分の時間を割くことになった。研究目的(1)、(2)については現在も進行中である。以下、研究目的(3)で得られた結果について詳述する。

Man1 欠損胚 (*Man1^{-/-}*) において心臓の形態異常、および左右非対称性の異常が現れるメカニズムを調べた。その結果、以下のことが判明した。

- (1) *Man1* 欠損胚では、左側特異的に発現する *Nodal*、*Lefty1*、*Lefty2*、*Pitx2* が、その左右非対称な発現パターンを失い、左右両側で強く発現する。
- (2) これまでに報告された左右非対称性の異常を示すマウス変異体の多くは、midline barrier として働く *Lefty1* の発現の消失が

見られるのに対し、*Man1* 欠損胚では *Lefty1* の発現をはじめ、正中部 (midline) の構造は保たれているのにもかかわらず、左右非対称性の異常を示す。

(3) *Nodal* が左側板中胚葉 (lateral plate mesoderm) に発現するためには、*Nodal* がまず結節 (node) に発現することが必要であり、*Nodal* の結節での発現を失くした変異体 (*Nodal^{neo/neo}*) では、左側板中胚葉での *Nodal* の発現は消失する。しかし、*Nodal^{neo/neo}* と *Man1^{-/-}* のダブル変異胚 (*Man1^{-/-};Nodal^{neo/neo}*) では *Nodal* の左側板中胚葉での発現は消失しなかった。以上の結果から、MAN1 が結節からのシグナルとは独立に、*Nodal* 経路のシグナル制御因子として左右非対称性の形成に関わることが明らかになった。

(4) *Man1* 欠損胚において *Nodal* が左右両側に、特に前方で強く発現する理由について調べた。*Nodal* の異所性の発現を誘導する因子として X 因子を想定して研究を進め、左右軸の決定、あるいは *Nodal* 経路の制御に関わっていると考えられる様々な遺伝子の *Man1* 欠損胚における発現パターンを解析した。その結果、*Bmp2* が X 因子の有力な候補のひとつである可能性を示唆する結果を得た。

なお、Wnt、RA 経路と MAN1 の間に明確な関連は今回の研究では認められなかった。

以上の結果は、核膜内膜蛋白質が左右軸の決定の制御にも関わることを明らかにした世界で初めての報告であり、「MAN1 が関与する新しいシグナル経路を見出す」という本研究の目的を達成することができた。今後は、本研究の課題の一つであったジーンチップ解析の中で見つかった、*Man1* 欠損胚で野性型胚に比べ発現が2倍以上増減した遺伝子の解析を進め、核膜とシグナル伝達の関係についてさらに研究を進めていく予定である。

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) Shin-Ichi Osada. Integral nuclear membrane proteins in vertebrate development. *Func. Dev. Embryol.* 査読有, 1, 14-25, 2007.
- (2) Akihiko Ishimura, Shinsuke Chida, Shin-Ichi Osada. *Man1*, an inner nuclear membrane protein, regulates left-right axis formation by controlling Nodal signaling in a node-independent manner. *Dev. Dyn.* 査読有, 237, 3565-3576, 2008.

[学会発表] (計 2件)

- (1) 石村昭彦、千田進介、長田真一、*Man1*, an inner nuclear membrane protein, regulates left-right axis formation by modulating Nodal signaling. 第40回日本発生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会、2007年5月29日、福岡市、福岡国際会議場
- (2) 石村昭彦、千田進介、長田真一、A role for MAN1, an inner nuclear membrane protein, in left-right axis formation. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、2007年12月13日、横浜市、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 真一 (SHIN-ICHI OSADA)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：00244484

(2) 研究分担者

石村 昭彦 (AKIHIKO ISHIMURA)
金沢大学・がん研究所・助教
研究者番号：80375261

(3) 連携研究者 なし