

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 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390020

研究課題名（和文） 新規な Bmp アンタゴニストの脳神経組織形成における役割とその分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Roles of novel Bmp antagonists in brain formation and their action mechanisms

研究代表者

伊藤 信行（ITO NOBUYUKI）

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：10110610

研究成果の概要（和文）：

2 種類の新規な分泌性 BMP antagonist 遺伝子を発見し、Brorin, Brorin-like と名付けた。これら分泌性因子はその構造は類似していることから、その機能的類似性が予想された。また、これらの遺伝子はヒト、マウス、ゼブラフィッシュなどで見出され、脊椎動物に共通した遺伝子である。

Zebrafish Brorin と Brorin-like はいずれも受精後 16 時間から腹側視床において発現が認められた。その発現様式はいずれも類似していた。受精後 24 時間では前交連や、後脳の神経節、松果体、下垂体など脳神経系特異的に発現していた。その発現は受精後 36 時間胚においても持続していた。Brorin と Brorin-like 機能阻害胚の形態観察を行った。いずれの機能阻害胚も前脳の萎縮および脳室の膨張などの脳の形成異常が認められた。

Brorin, Brorin-like はいずれも脳・神経系で高発現発現していた。マウスにおける、Brorin, Brorin-like の生理的役割を明らかにするため、Brorin/Brorin-like 二重遺伝子欠損マウスも野生型マウスと外見上に大きな差はなかった。しかし、その脳を詳しく解析したところ、アストロサイトの過形成が確認された。これらの結果から、Brorin, Brorin-like はアストロサイトの形成を抑制していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We identified genes encoding novel secreted proteins, Brorin and Brorin-like, in mice, humans and zebrafish. Positions of ten cysteine residues in the domains of Brorin and Brorin-like are similar to those in the cysteine-rich domains of members of the Chordin family. However, the amino acid sequences of Brorin and Brorin-like are not significantly similar to that of any other member of the Chordin family, indicating that Brorin and Brorin-like are unique members of the family. Mouse Brorin and Brorin-like proteins produced in cultured cells were efficiently secreted into the culture medium. The proteins inhibited the activity of BMP in mouse preosteoblastic cells. Mouse Brorin and Brorin-like were predominantly expressed in neural tissues in embryos, and also predominantly expressed in the adult brain. In the brain, the expression was detected in neurons but not glial cells. The neural tissue-specific expression profile of Brorin and Brorin-like are quite distinct from that of any other member of the Chordin family. The inhibition of Brorin and Brorin-like functions in zebrafish resulted in the impairment of neural development. Brorin and Brorin-like potentially plays roles in neural development and functions. Brorin/Brorin-like double knockout mice showed astrocyte hyperplasia in their brain, indicating that Brorin and Brorin-like regulate astrocyte generation in the brain.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 5,300,000 | 1,590,000 | 6,890,000 |

| | | | |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 4,400,000 | 1,320,000 | 5,720,000 |
| 2011年度 | 4,400,000 | 1,320,000 | 5,720,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,100,000 | 4,230,000 | 18,330,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：分子生物学

1. 研究開始当初の背景

「組織形成のしくみ」の解明は発生生物学の発展に貢献するのみならず、再生医療などの医学・薬学の発展に大きく貢献するものと期待される。「組織形成のしくみ」の解明は多くの場合、特定の組織形成に着目し、それに関わる遺伝子、タンパク質の探索により組織形成の分子メカニズムが明らかにされてきた(Forward genetics)。しかし、このような方法のみでは特定の組織形成に関わる全ての遺伝子、タンパク質を見出すことは困難である。一方、新規な遺伝子を探索し、それが関わる組織形成を見出し、その分子メカニズムを解明することも「組織形成のしくみ」の解明には重要な試み(Reverse genetics)となると期待される。また、新しい組織形成因子の発見は再生医療などに応用可能な医薬品開発に貢献するものと期待される。

申請者は新規な分泌性 BMP antagonist 遺伝子 Ectodin を発見し、その歯芽形成因子としての役割を明らかにした。さらに、最近、申請者らは 2 種類の新規な分泌性 BMP antagonist 遺伝子 を発見し、Brorin, Brorin-like と名付けた。Brorin, Brorin-like はヒト、マウス、ゼブラフィッシュなどで見出され、脊椎動物に共通した遺伝子である。

2. 研究目的

本研究では(1)ゼブラフィッシュ Brorin, Brorin-like の発現様式の詳細な解析、(2) Brorin, Brorin-like 機能抑制あるいは機能過剰ゼブラフィッシュ胎児の脳神経組織の表現型の詳細な解析、(3)その表現形質の分子的基盤と分子メカニズムの解明を試みる。さらに、マウスでの役割を明らかにするため、(1) Brorin, Brorin-like 遺伝子欠損マウスの作成とその表現形質の詳細な解析、(2)その表現形質の分子的基盤の解明を試みる。一方、培養神経前駆細胞、神経細胞を用いて Brorin, Brorin-like の作用の分子メカニズムも明らかにする。

3. 研究の方法

【RT-PCR による発現解析】マウスの各組織より total RNA を抽出した。逆転写酵素で逆転写し得られた cDNA を鋳型として、*Taq* DNA

ポリメラーゼと特異的なプライマーを用いて PCR を行った。

【in situ hybridization による発現解析】胎児または成体の脳を摘出して凍結させた後、クリオスタットによって厚さ 16 μ m の切片を作製してスライドガラスに貼り付けた。*Brorin* の cDNA を組み込んだ *pBluescript II SK(+)* ベクターを鋳型とし、 $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]$ UTP の存在下で T7 または T3 ポリメラーゼで転写し、 ^{35}S 標識センス及びアンチセンスプローブを作製した。切片にプローブをハイブリダイゼーションさせた。切片を乳剤に浸し、3 週間露光させた。現像後の切片について、対比染色としてヘマトキシリン・エオジン染色またはニッスル染色を行った。

【分泌性の検討】*Brorin* の cDNA の 3' 末端に Myc タグと His₆ タグを付加して、*pcDNA3.1(+)* ベクターに組み込んだ。作製したコンストラクトを Lipofectamine 2000 を用いて COS-7 細胞にトランスフェクションした。72 時間培養した後、培養上清と細胞画分を回収し、還元下 SDS-PAGE を行った。ウェスタンブロッティングにより、バンドを検出した。

【組換えタンパクの作製】*Brorin* あるいは *Brorin-like* の cDNA を *pAcGP67A* ベクターに組み込み、組換えバキュロウイルスを作製した。High Five 細胞に感染させ、27°C で 3 日間培養した後、Ni-NTA Agarose を用いて組換え Brorin を精製した。

【AP 活性の測定】MC3T3-E1 細胞に組換えヒト BMP2 または BMP6、組換えマウス Noggin、組換え Brorin あるいは Brorin-like を添加し、72 時間培養した。細胞溶解液を *p*-ニトロフェニルリン酸を含むと 37°C で反応させた後、吸光度を測定することによって AP 活性を評価した。

【神経系前駆細胞に対する活性】胎生 13.5 日齢の間脳を摘出し、その解離した細胞に組換え Brorin あるいは Brorin-like を添加し、72 時間培養した。その神経細胞およびアストロサイを検出した。細胞核は DAPI を用いて染色した。

【whole-mount in situ hybridization による発現解析】*pGEM-T* ベクターに組み込んだゼ

ブラフィッシュ *brorin* または *brorin-like* の cDNA を鋳型とし、DIG NTP Mix の存在下、アンチセンスプローブを作製した。受精後 36 時間胚の卵膜を剥がして 4% PFA/PBS で一晩固定した。作製したプローブを 16 時間ハイブリダイゼーションさせた。ブロッキングを施した後に、AP 標識された抗 DIG 抗体による抗体反応を 18 時間行った。洗浄後、BM purple AP substrate を用いて反応させることで発色させた。

【MO の作製及び受精卵への導入】各 MO は委託して合成した。MO を溶解し、受精直後のゼブラフィッシュ受精卵にマイクロインジェクションした。

MO 導入後、正常胚及び MO 導入胚より total RNA を抽出して RT-PCR を行い、成熟 *brorin* または *brorin-like* mRNA の発現を比較した。

【遺伝子欠損マウスの作成】遺伝子欠損マウスは ES 細胞を用いて、常法に従い、gene targeting 法により作成した。

4. 研究成果

(1) *Brorin* の発現解析

Brorin の生体における機能を解析するために、その発現パターンを検討した。マウスの各組織より抽出した total RNA を用いて RT-PCR を行うことによって、成体における *Brorin* の発現分布を検討した結果、*Brorin* は成体において脳特異的に発現していることが分かった。同様にして、各発達段階のマウスの脳における *Brorin* の発現を RT-PCR により検討したところ、その発現は発達が進むにつれて上昇していることが明らかになった。

Brorin の発現を in situ hybridization により検討した。*Brorin* mRNA に特異的に結合する ³⁵S 標識 cRNA プローブを作製し、胎生 12.5 日齢、胎生 16.5 日齢、胎生 18.5 日齢の sagittal 切片に対して in situ hybridization を行った結果、*Brorin* は脳・神経系特異的に発現していることが分かった。成体の脳の coronal 切片についても in situ hybridization を行ったところ、*Brorin* は間脳や延髄において特に強く発現していることが明らかになった。さらにマイクロオートラジオグラフィと対比染色としてニッスル染色を行ったところ、*Brorin* はニッスル染色により濃く染まったグリア細胞には発現しておらず、薄く染まった神経細胞特異的に発現していることが明らかになった。

Brorin が実際に細胞外へ分泌されるかどうかについて検討するために、*Brorin* の C 末端側に Myc タグと His₆ タグを付加した組換え *Brorin* をサル腎臓由来の COS-7 細胞で強制発現させた。その後、培養上清と細胞画分をそれぞれ回収し、SDS-PAGE により展開した後、抗 Myc タグ抗体を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、培養上清中から組換

え *Brorin* が検出された。この結果から、*Brorin* は細胞外分泌性因子であることが明らかになった。付加されたタグを含めた組換え *Brorin* の計算上の分子量は約 38.1 kDa であったが、実際に検出された分子量は約 49 kDa であったことから、*Brorin* は翻訳後に何らかの修飾を受けると考えられる。一方、バキュロウイルス発現系によって昆虫細胞の High Five 細胞で C 末端側に Myc タグと His₆ タグを付加した組換え *Brorin* を強制発現させた。回収した培養上清を Ni-NTA アガロースを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製し、組換え *Brorin* を得た。精製後の組換え *Brorin* は CBB 染色及び抗 Myc タグ抗体を用いたウエスタンブロッティングにより約 48 kDa に検出された。先述したように、*Brorin* はその C 末端側に BMP 調節因子の Chordin ファミリーに共通の cysteine-rich ドメインを 2 つ有している。このことから、*Brorin* も BMP の活性に影響を与えると考え、骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞を用いて実験を行った。骨芽細胞は BMP により分化が促進され、細胞内の AP (アルカリホスファターゼ) が増大する。作製した組換え *Brorin* を BMP と同時に添加し、AP 活性を測定することによって、*Brorin* の BMP に対する活性を検討した。BMP としては、dpp サブグループに属する BMP2 と 60A サブグループに属する BMP6 を用いた。その結果、組換え *Brorin* は BMP による AP 活性の上昇を用量依存的に抑制することが明らかになった。なお、コントロールとして BMP アンタゴニストである Noggin を用いた。

Brorin が胎児期の脳・神経系に発現していたことから、神経系前駆細胞に組換え *Brorin* を添加して活性を検討した。胎生 13.5 日齢の間脳より神経系前駆細胞を採取し、組換え *Brorin* を添加して 3 日間培養した。その後、ニューロンのマーカーである MAP2 に対する抗体とアストロサイトのマーカーである GFAP に対する抗体で免疫染色を行い、*Brorin* の活性を評価した。細胞核は DAPI で標識し、ポジティブコントロールとして FBS を用いた。組換え *Brorin* によって全細胞数、MAP2 陽性細胞数ともに有意に増加し、ニューロンの神経突起も伸長していたが、GFAP 陽性細胞であるアストロサイトの数には差が見られなかった。これらの結果より、*Brorin* によって神経系前駆細胞のニューロンへの分化が促進されることが明らかになった。

(2) *Brorin-like* の同定及び機能・発現解析

新規分泌性因子 *Brorin* は、Chordin ファミリーに共通の cysteine-rich ドメインを 2 つ有する BMP アンタゴニストであった。また、胎児から成体にかけて脳・神経系に特異的に発現しており、神経系前駆細胞のニューロンへの分化を促進した。*Brorin* と同様にして、

機能未知の新規分泌性因子を探索したところ、Brorin と高い相同性を有する Brorin-like を同定した。Brorin-like も胎児及び成体で脳・神経系特異的に発現していたが、その発現部位は Brorin と若干の違いがあった。また、Brorin-like は Brorin と同様に BMP 阻害活性を持ち、神経系前駆細胞のニューロンへの分化を促進した。

Brorin と同様にして、GeneBank 及び PSORT を利用することで、分泌性因子をコードすると思われる新規マウス遺伝子 Brorin-like を同定した。Brorin-like の全塩基配列を決定した結果、Brorin-like は 222 アミノ酸からなり、Brorin と同じく予想分泌性シグナル配列と 2 つの cysteine-rich ドメインを有しており、Brorin と 48.6% の相同性を持っていた。また、ヒト Brorin-like を同定したところ、マウス Brorin-like と 98.6% の相同性を持っていた。ヒトにおいて、他の Chordin ファミリーのメンバーと Brorin-like の構造を比較したところ、Brorin と Brorin-like だけが cysteine-rich ドメインを 2 つ有しており、その他のメンバーとは異なっていた。

Brorin-like の胎児期における発現パターンを in situ hybridization により検討した。胎生 12.5 日齢から胎生 18.5 日齢までの胎児に対して in situ hybridization を行った結果、Brorin-like も前脳、中脳、後脳、脊髄等、脳・神経系特異的に発現していた。なお、その発現パターンは Brorin と似ているが、違いも見られた。

次に、成体の各組織における発現を RT-PCR で検討した。Brorin-like は Brorin と同様に、成体においても脳特異的に発現していることが分かった。成体の脳についても in situ hybridization を行ったところ、Brorin-like は全体的に発現していたが、特に視床や視床下部、海馬等に強く発現しており、Brorin と若干の違いが見られた。

Brorin-like の分泌性について検討するために、Brorin と同様にして組換え Brorin-like を COS-7 細胞で強制発現させたところ、培養上清中から組換え Brorin-like が検出された。検出された組換え Brorin-like の分子量は約 40、39、36 kDa であり、C 末端側に付加された Myc タグと His₆ tag を含めた組換え Brorin-like の計算上の分子量は約 25 kDa であることから、Brorin-like も翻訳後に修飾を受けると考えられる。さらに、バキュロウイルス発現系により昆虫細胞で組換え Brorin-like を作製し、Ni-NTA アガロースを用いて精製を行った。CBB 染色及び抗 Myc タグ抗体を用いたウェスタンブロッティングで組換え Brorin-like (約 35 kDa) を検出した Brorin と同様に Brorin-like も BMP 阻害活性を有すると考え、MC3T3-E1 細胞を用いた AP 活性の

測定を行った。コントロールの Noggin は BMP2 及び BMP6 の活性を強力に阻害したのに対して、Brorin-like は弱いながらも有意に阻害した。また、Brorin-like を神経系前駆細胞に添加し、3 日間培養を行ったところ、MAP2 陽性細胞数が増加していた。この結果より、Brorin-like によってニューロンへの分化が促進されることが明らかになった。なお、アストロサイトへの分化には影響が見られなかった。

(3) ゼブラフィッシュを用いた brorin 及び brorin-like の生理的役割の検討

小型硬骨魚類であるゼブラフィッシュは、胚が透明であるために観察及び操作が容易である、哺乳動物と同等の器官・組織を有しておりその形成過程もよく類似している、MO (モルフォリノ修飾アンチセンスオリゴヌクレオチド) を受精卵に導入することにより容易に標的遺伝子の機能を阻害できる等、遺伝子の機能解析に適したモデル動物である。MO は標的遺伝子の mRNA に結合することで翻訳やスプライシングを阻害し、標的遺伝子の発現を抑制することができる。また、その効果は導入後約 5 日間持続する。そこで、ゼブラフィッシュを用いて brorin 及び brorin-like の in vivo における役割を検討することにした。まず、ゼブラフィッシュの brorin 及び brorin-like を同定し、その発現を解析したところ、ゼブラフィッシュにおいても brorin 及び brorin-like は脳・神経系特異的に発現していた。さらに brorin または brorin-like を特異的に阻害する MO をゼブラフィッシュの受精卵に導入し、その表現型の観察を行ったところ、脳・神経系の形成に異常が見られた。

マウスの Brorin 及び Brorin-like のアミノ酸配列をもとにして、ゼブラフィッシュゲノム配列に対して相同性検索を行い、ゼブラフィッシュ brorin 及びゼブラフィッシュ brorin-like を同定した。ゼブラフィッシュ胚から作製した cDNA を用いて PCR を行い、ゼブラフィッシュ brorin 及び brorin-like の全塩基配列を決定した。ゼブラフィッシュ brorin は 309 アミノ酸からなり、マウス Brorin との相同性は約 56%、ゼブラフィッシュ brorin-like は 223 アミノ酸からなり、マウス Brorin-like との相同性は約 78% であった。ゼブラフィッシュ brorin 及び brorin-like も N 末端の分泌性シグナル配列と 2 つの cysteine-rich ドメインを有していた。

ゼブラフィッシュ胚における brorin 及び brorin-like の発現パターンを解析するために、受精後 36 時間胚に対して whole-mount in situ hybridization を行った。その結果、ゼブラフィッシュ brorin 及び brorin-like はマウスと同様に前脳、中脳、後脳等の脳・神

経系に特異的に発現していた。なお、終脳における発現等、ゼブラフィッシュ *brorin* と *brorin-like* の発現には、若干の違いが見られた。

brorin の機能を阻害するために、*brorin* mRNA 前駆体の第一イントロンと第二エクソンの間に結合してスプライシングを阻害する *brorin* MO1 と、*brorin* mRNA の翻訳開始コードン付近に結合して *brorin* の翻訳を阻害する *brorin* MO2 を作製し、それぞれゼブラフィッシュ受精卵に導入した。その後、total RNA を抽出して RT-PCR を行った結果、*brorin* MO1 導入胚では mRNA の第二エクソンが欠失していることが分かった。MO 導入胚の形態を観察したところ、受精後 24 時間の *brorin* MO1 導入胚及び *brorin* MO2 導入胚においては、前脳の萎縮及び中脳後脳境界の不明瞭化、眼の形態異常等の脳・神経系の形成異常が見られた。

brorin-like についても、*brorin-like* mRNA 前駆体の第一イントロンと第二エクソンの間に結合する *brorin-like* MO1 と第一エクソンと第一イントロンの間に結合する *brorin-like* MO2 を作製し、それぞれゼブラフィッシュ受精卵に導入して *brorin-like* の発現を抑制した。受精後 25 時間の *brorin-like* MO1 導入胚及び *brorin-like* MO2 導入胚においても、*brorin* MO 導入胚と同様に脳・神経系の形成異常が見られた。

(4) Brorin, Brorin-like 遺伝子欠損マウスの作成とその表現形質の解析
Brorin, Brorin-like はいずれも脳・神経系で高発現発現していた。マウスにおける、Brorin, Brorin-like の生理的役割を明らかにするため、それらの遺伝子欠損マウスを作成した。いずれの遺伝子欠損マウスも野生型マウスと外見上に大きな差はなかった。また、Brorin, Brorin-like 遺伝子欠損マウス脳の形態に野生型マウスと大きな差はなかった。さらに、Brorin, Brorin-like 遺伝子欠損マウスに行動的異常は認められない。

Brorin, Brorin-like の構造が非常に類似しているため、その機能的代償性が予想された。従って、Brorin/Brorin-like 二重遺伝子欠損マウスを作成して、その生理的役割を検討した。Brorin/Brorin-like 二重遺伝子欠損マウスも野生型マウスと外見上に大きな差はなかった。しかし、その脳を詳しく解析したところ、線条体のサイズの減少が確認された。さらに、線条体のアストロサイトの形成を調べたところ、アストロサイトの過形成が確認された。これらの結果から、Brorin, Brorin-like は代償的に作用し、アストロサイトの形成を抑制していることが明らかになった。

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 9 件)

- ① A. Miyake, S. Nihno, Y. Murakoshi, A. Satsuka, Y. Nakayama, N. Itoh, Neucrin, a novel secreted antagonist of canonical Wnt signaling, plays roles in developing neural tissues in zebrafish, *Mechanisms of Development* 128, 577-590 (2012) (doi:10.1016/j.mod.2012.01.001) (査読有)
- ② K. Oishi, M. Konishi, Y. Murata, N. Itoh, Time-imposed daily restricted feeding induces rhythmic expression of Fgf21 in white adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412, 302-309 (2011) (doi:10.1016/j.bbrc.2011.07.125) (査読有)
- ③ H. Yamauchi, M. Goto, M. Katayama, A. Miyake, N. Itoh, Fgf20b is required for the ectomesenchymal fate establishment of cranial neural crest cells in zebrafish *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 705-710 (2011) (doi:10.1016/j.bbrc.2011.05.069) (査読有)
- ④ Y. Murata, M. Konishi, N. Itoh, FGF21 as an endocrine regulator in lipid metabolism: from molecular evolution to physiology and pathophysiology. *Journal of Nutrition and Metabolism* 2011:98 (2011) (doi:10.1155/2011/981315) (査読有)
- ⑤ N. Itoh, D.M. Ornitz, Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J. Biochem.* 149, 121-130 (2011) (doi: 10.1093/jb/mvq121) (査読有)
- ⑥ N. Itoh, H. Ohta, Secreted bone morphogenetic protein antagonists of the Chordin family. *BioMolecular Concepts* 1, 297-304 (2011) (doi:10.1155/2011/981315) (査読有)
- ⑦ I. Kimura, Y. Nakayama, M. Konishi, T. Kobayashi, M. Mori, M. Ito, A. Hirasawa, G. Tsujimoto, M. Ohta, N. Itoh, M. Fujimoto, Neuferricin, a novel extracellular heme-binding protein, promotes neurogenesis. *J. Neurochem.* 112, 1155-1167 (2010) (doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06522.x) (査読有)
- ⑧ A. Miyake, Y. Takahashi, H. Miwa, A. Shimada, M. Konishi, N. Itoh, Neucrin is a novel neural-specific secreted antagonist to canonical Wnt signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 1051-1055

(2009) (doi:10.1016/j.bbrc.2009.10.113)

(査読有)

⑨ H. Miwa, A. Miyake, Y. Kouta, A. Shimada, Y. Yamashita, Y. Nakayama, H. Yamauchi, M. Konishi, N. Itoh, A novel neural-specific BMP antagonist, Brorin-like, of the Chordin family. FEBS Lett. 583, 3643-3648 (2009) (doi:10.1016/j.febslet.2009.10.044) (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 信行 (ITOH NOBUYUKI)
京都大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：10110610

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

三宅 歩 (MIYAKE AYUMI)
京都大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号：40346044
小西 守周 (KONISHI MORICHIKA)
神戸薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：00322165