

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 27 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700515

研究課題名（和文） プロサポシタンパク質の構造解析とマウス胚発生における機能解明

研究課題名（英文） Role of prosaposin in the mouse embryogenesis

研究代表者

米重 あづさ (YONESHIGE AZUSA)

東海大学・糖鎖科学研究所・特定研究員

研究者番号：70586750

研究成果の概要（和文）：プロサポシン(PSAP)はライソゾームでのスフィンゴ脂質の加水分解に関わるサポシン(SAPs)の前駆体タンパク質であり、PSAP自体が体液中に分泌されることも知られているが、その生理機能はよく判っていない。本研究ではプロサポシン欠損マウス(*Psap*^{-/-})の出生率が低いことに着目し、PSAP/SAPsのマウス胚発生における生理機能の解明を目指した。野生型マウスの胚組織におけるPSAP/SAPsの時空間的発現解析を行った結果、PSAP/SAPsは時期特異的に高発現し、胎仔への栄養供給を担う胚体外組織で強く発現していることが判った。*Psap*^{-/-}胚の病態解析では、*Psap*^{-/-}は胎生早期から成長不良を呈し、胚体外組織の特定の細胞でライソゾームの形態異常が見られた。*Psap*^{-/-}とプロサポシン強発現マウス(*PSAPTg*)との交配実験により、*Psap*^{-/-}胚の胎生致死表現型は母体がプロサポシンを強発現することによってレスキューされることを明らかにした。以上の結果から、PSAP/SAPsはマウス胎生期において胚体外組織のライソゾーム機能に必須であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Prosaposin (PSAP) is the precursor protein of saposins (SAPs) which are required for the lysosomal hydrolysis of sphingolipids. Although PSAP itself is known to be secreted into several body fluids, its physiological function is not well understood. PSAP deficient mice (*Psap*^{-/-}) are born at the much lower frequency suggesting the function of PSAP during the mouse embryogenesis. In this study, we investigated the temporal and spatial expression of PSAP in the wild-type mouse embryo and the phenotype of *Psap*^{-/-} embryo. Protein levels of PSAP in the mouse embryonic tissues were low at embryonic day (E) 6.5 and increased at E7.5 to 9.5. Immunohistochemical analyses showed high expressions of PSAP in decidua at E7.5 to 9.5 and in spongiotrophoblastic layer of placenta at E10.5. SAPs were highly expressed in the large lysosomes of visceral endoderm of yolk sac. Histopathological examination of *Psap*^{-/-} embryos indicated the developmental abnormality as early as at around E7.5. Shrunken cells were observed in decidua. The number and the size of large lysosome in visceral endoderm of yolk sac were decreased. These lethal phenotypes of *Psap*^{-/-} embryos were rescued by maternal overexpression of PSAP. Our findings suggest that PSAP and SAPs play important roles during the early stage of mouse pregnancy, at the site of decidua, yolk sac and placenta.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：総合領域
科研費の分科・細目：実験動物学
キーワード：胚発生

1. 研究開始当初の背景

生体膜の主要構成脂質の一つであるスフィンゴ脂質は、ライソゾーム内において加水分解酵素により分解される。親水性の加水分解酵素と疎水性のスフィンゴ脂質との相互作用にはサポシンと呼ばれる疎水性の糖タンパク質が必須である。サポシンA, B, C, Dは共通の前駆体タンパク質であるプロサポシンがライソゾーム内でタンパク質分解を受けることにより生成される。大部分のプロサポシンタンパク質はライソゾームへと運ばれてサポシンA-Dの前駆体タンパク質として機能するが、一部のプロサポシンは細胞外に分泌され、脳脊髄液や精液、母乳などの体液中に認められる。これらの分泌型プロサポシンは独自の生物活性を持つことが示唆されているが、生体内での機能は未知である。一方、近年サポシンについても脂質抗原提示や小胞膜融合促進など脂質結合タンパク質としての新たな機能が提唱されつつある。

ヒトプロサポシン欠損症は、これまでに世界で4家系の報告がある。いずれの報告例も、出生直後あるいは新生児・乳児期早期から、全般性の痙攣発作を起こすなどの重篤な神経症状と著明な肝脾腫を呈し、ゴーシェ病II型（急性神経型）の症状に類似した臨床所見を示す。胎児死亡例も報告されている。1996年にFujitaらによって作製されたプロサポシン欠損マウス (*Psap*^{-/-}) は半数が胎生致死であり、出生したマウスも重篤な神経症状を呈して30日前後で死亡する。生後30日前後の*Psap*^{-/-}では全身組織に種々のスフィンゴ脂質が蓄積しており、早期死亡の一因はサポシンの全欠損によるスフィンゴ脂質の分解異常であると考えられた。しかし、残り半数の胎生致死の原因は、胎児期におけるスフィンゴ脂質の蓄積とは考えにくく、その原因究明は行われていなかった。

2. 研究の目的

Psap^{-/-}の出生率が極めて低いことから、プロサポシンおよびサポシンはマウスの胚発生に必須であり、新たな機能を見出せるのではないかと考えた。そこで、本研究において、野生型マウス胚におけるプロサポシンおよびサポシンの時空間的な発現解析と、*Psap*^{-/-}胚およびプロサポシン強発現マウス (*PSAP* Tg) 胚の表現型解析を行い、マウス胎生期におけるプロサポシンおよびサポシンの生物機能を検討した。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウス胚におけるプロサポシンおよびサポシンの時空間的発現解析

① 胚組織の採取

野生型妊娠マウスの子宮から胎齢毎に胚組織を採取した。胎生早期(胎齢(E)6.5-9.5日)では母体由来の脱落膜細胞を含む胚組織を、胎生中期(E10.5-15.5)では臍側卵黄嚢・胎盤・羊水・胎仔をそれぞれ採取した(図1)。

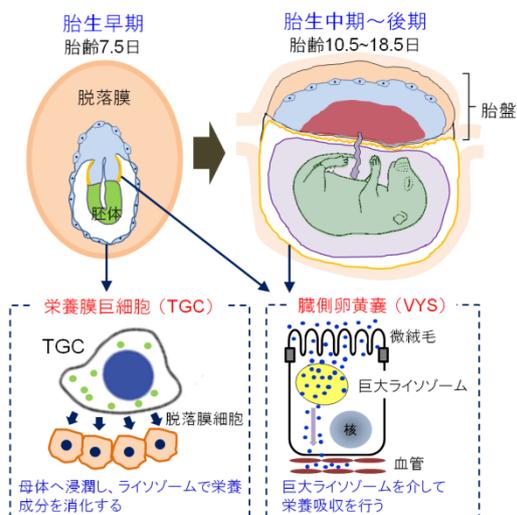


図1 マウス胚組織の模式図と胚体外組織の機能

② プロサポシンおよびサポシンの発現解析

プロサポシンおよびサポシンの時系列に沿った発現量解析は、抗マウスサポシン-B (マウス SAP-B) 抗体を用いてイムノブロットにより行った。マウス胚組織内における空間的発現解析は、マウス SAP-B 抗体による免疫染色と、プロサポシンのみを検出する抗マウスプロサポシン特異抗体を用いて行った。

(2) プロサポシン欠損マウス (*Psap*^{-/-}) 胚の病態解析

① 胚組織の採取と遺伝子型決定

*Psap*ヘテロマウス (*Psap*^{+/-}) 同士の交配により上記の野生型マウスと同様に各胎齢の組織を採取した。胎生早期 (E7.5-9.5) のマウス胚の遺伝子型決定は、薄切切片の胎仔部分のみを掻き出してゲノムDNAを抽出しPCRを行った。E10.5以降のマウス胚からは胎仔の一部を切除してゲノムDNAを得た。

② *Psap*^{-/-}胚の組織病理学的解析

Psap^{-/-}胚の薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色や免疫組織染色を行った。また、透過型電子顕微鏡により詳細な細胞構造を観察した。

(3) ヒトプロサポシン強発現マウス (*PSAP* Tg)

を用いたプロサポシン欠損マウス (*Psap*^{-/-}) 胚のレスキュー実験

ROSA26 遺伝子座に、CAG-ヒト *PSAP* cDNA-PolyA を挿入したヒトプロサポシン強発現マウス (*PSAP* Tg) を作製した。

PSAP Tgのヘテロ接合体 (*PSAP* Tg/w) と *Psap*^{-/-}の交配により、*PSAP* Tg/w, *Psap*^{-/-}を得た後に、これらのマウス同士を交配し、マウスプロサポシンが完全欠損し、ヒトプロサポシンを強発現するレスキューマウス (*PSAP* Tg/w, *Psap*^{-/-}または*PSAP* Tg/Tg, *Psap*^{-/-}) を作製した。次に、母体由来のプロサポシンの胎仔への影響を検討する目的で、*PSAP* Tg/w, *Psap*^{-/-}同士の交配から得られた*PSAP* w/w, *Psap*^{-/-}胚の組織病理変化を*Psap*^{-/-}交配での*Psap*^{-/-}と比較した。

4. 研究成果

(1) 野生型マウス胚におけるプロサポシンおよびサポシンの時空間的発現変化

① 各胎齢におけるプロサポシン・サポシンの発現量

胎生早期 (E6.5-9.5) の胚組織では、E7.5 においてプロサポシンは最も強く発現しており、E10.5 以降の胎盤では恒常的に発現していた。サポシンは E7.5-9.5 の間で発現が上昇していた (図 2A)。

胎生中期 (E10.5-15.5) の臓側卵黄嚢では、サポシンが多量に発現しており、プロサポシンはほとんど検出されなかった。また、*Psap*^{-/-}胚の臓側卵黄嚢でも野生型に比べ低いレベルでサポシンが検出された。この結果から、臓側卵黄嚢のサポシンは胎仔由来のものに加え、母体由来のものが発現していることがわかった (図 2B)。

胎生中期 (E10.5-15.5) の羊水ではプロサポシンが同定され、サポシンは検出されなかった。羊水中のプロサポシンは胎盤由来のプロサポシンに比べて分子量が大きく、Peptide-N-glycanase FでN結合型糖鎖を切断すると、同じ分子量のバンドへとシフトしたことから、付加されているN結合型糖鎖の構造または数が胎盤由来のプロサポシンとは異なることが示唆された。また*Psap*^{-/-}の羊水ではプロサポシンは検出されなかったことから、羊水中のプロサポシンは胎仔由来の分泌型プロサポシンであると考えられた (図 2C)。

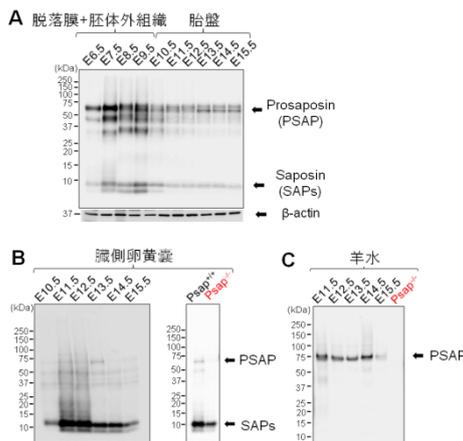


図2 各胎齢のプロサポシン・サポシンの発現量

② プロサポシン・サポシンの組織内分布

胎生早期 (E6.5-9.5) の野生型マウス胚組織では、胎仔由来の栄養膜巨細胞と、母体由来の脱落膜細胞にプロサポシン・サポシンの強い発現が認められた (図 3A)。 *Psap*^{-/-}胚の免疫組織染色では、母体由来の脱落膜細胞ではプロサポシン・サポシンの発現が認められたが、胎仔由来の栄養膜巨細胞では発現が認められなかった。

臓側卵黄嚢では、抗マウス SAP-B 抗体を用いた免疫組織染色で強い免疫反応が検出されたが、マウスプロサポシンのみを認識する抗体ではほとんど免疫反応は検出されなかった。このことから、臓側卵黄嚢にはサポシンが発現し、プロサポシンはほとんど発現しないことが確認できた。またライソゾームのマーカートンパク質である Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) とマウス SAP-B 抗体の共染色によって、サポシンは臓側卵黄嚢の上皮細胞に存在する巨大ライソゾームに発現していることがわかった (図 3B)。

胎盤では、プロサポシン・サポシンは母体由来の脱落膜細胞と胎仔由来の栄養膜巨細胞および海綿状栄養膜細胞に強く発現していることがわかった。

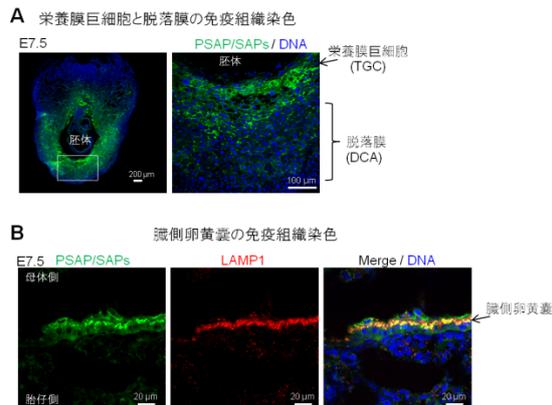


図3 プロサポシン・サポシンの組織内分布

(2) プロサポシン欠損マウス (*Psap*^{-/-}) 胚の形態

① *Psap*^{-/-}胚の存在率と形態変化

Psap^{-/-}同士の交配で得られた各遺伝子型の新生仔の数は *Psap*^{+/+} : *Psap*^{+/-} : *Psap*^{-/-} = 36 : 96 : 10 で、*Psap*^{-/-}の出生率は 8.7% と有意に低かった。各胎齢における *Psap*^{-/-}胚の存在率は、E7.5 では野生型と *Psap*^{-/-}がほぼ同数であったが、E8.5 以降、急激に減少することがわかった。また、*Psap*^{-/-}胚は E7.5 においてすでに小さく、胎生後期にかけて、胎盤と胎仔に形態異常が認められた。これらのことから、*Psap*^{-/-}胚は胎生早期から形態変化をきたし、大部分が胎生致死であることがわかった (図 4A)。

② *Psap*^{-/-} 胚の組織病変

E8.5 の *Psap*^{-/-} では、胎仔由来の栄養膜巨細胞と母体由来の脱落膜細胞の境界領域に空胞変性を示唆する形態変化が認められた。また、透過型電子顕微鏡による解析では、栄養膜巨細胞のライソゾームの数が減少し、オートファゴソーム様の構造が多数観察された(図 4B)。

Psap^{-/-} の臓側卵黄嚢では、巨大ライソゾームの大きさと数が減少し、微絨毛が短いなどの形態変化が観察された(図 4C)。

Psap^{-/-} の胎盤では、海綿状栄養膜細胞層が野生型に比べて低形成であった。

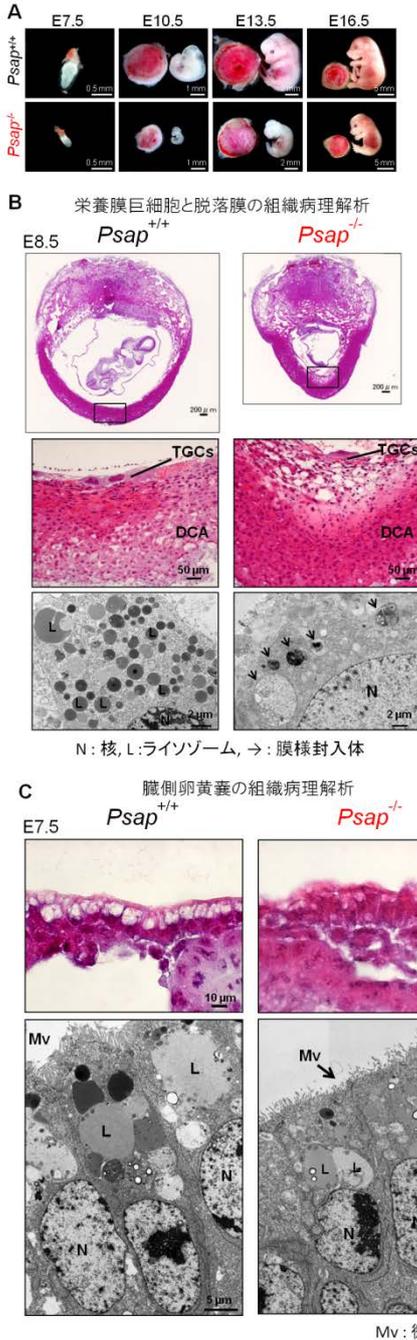


図4 プロサポシン欠損マウス(*Psap*^{-/-})胚の病態

(3) ヒトプロサポシン強発現マウス (*PSAP* Tg) との交配によるプロサポシン欠損マウス (*Psap*^{-/-}) のレスキュー

PSAP Tg の胚組織から臓側卵黄嚢と羊水を採取し、抗ヒト SAP-B 抗体を用いたイムノプロット解析を行った。その結果、臓側卵黄嚢ではヒトサポシンが、羊水中ではヒトプロサポシンが強く発現していた。これらの結果から、*PSAP* Tg の胚組織ではヒトプロサポシン・サポシンが内在性のマウスプロサポシン・サポシンと同様の発現パターンで強発現しており、*PSAP* Tg は胚発生におけるプロサポシン・サポシンの機能を検討する上で有用なモデル動物であることがわかった。

マウスプロサポシンを完全欠損し、ヒトプロサポシンを強発現するレスキューマウス (*PSAP* Tg/w, *Psap*^{-/-} または *PSAP* Tg/Tg, *Psap*^{-/-}) は、各臓器でスフィンゴ糖脂質の蓄積を認めず、一年以上生き延びた。このことからヒトプロサポシンを強発現させることで、*Psap*^{-/-} の致死性表現型がレスキューされ、ヒトプロサポシンはマウスにおいてサポシンにプロセスされ、マウスプロサポシン・サポシンと同様に機能することがわかった。

次に *PSAP* Tg/w, *Psap*^{-/-} 同士を交配し、得られた各遺伝子型の新生仔の数を調べた。その結果、*PSAP* Tg/Tg, *Psap*^{-/-} : *PSAP* Tg/w, *Psap*^{-/-} : *PSAP* w/w, *Psap*^{-/-} = 4 : 6 : 6 であり、*PSAP* w/w, *Psap*^{-/-} の出生率は 37.5% で、*Psap*^{+/-} 交配における *Psap*^{-/-} の出生率 (8.7%) に比べ有意に高いことがわかった。そこで、この交配によって得られる *PSAP* w/w, *Psap*^{-/-} 胚の組織病理変化を *Psap*^{+/-} 交配での *Psap*^{-/-} と比較した。E8.5 において、*PSAP* w/w, *Psap*^{-/-} 胚の胎仔部分や臓側卵黄嚢に *Psap*^{-/-} に認めた形態変化 (図 4) を認めず、レスキューマウス (*PSAP* Tg/Tg, *Psap*^{-/-}) と同様の所見が得られた (図 5)。一方、E18.5 の胎仔は *Psap*^{-/-} と同様に成熟遅延を呈し、胎盤では海綿状栄養膜細胞層の低形成が認められた。以上の結果から、母体側に強発現するヒトプロサポシンは胎生早期においては胎仔へ移行し、*Psap*^{-/-} の胎生致死の表現型をレスキューすると考えられた。

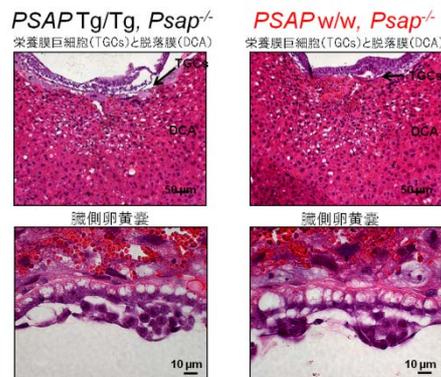


図5 *PSAP* Tg/w, *Psap*^{-/-} 同士の交配における胚

(4)総括

本研究は、マウス胎生期におけるプロサポシン・サポシンの役割を検討するために、野生型マウス胚における時空間的な発現解析と *Psap*^{-/-}胚および *PSAP* Tg 胚の表現型解析を行った。

野生型マウス胚においてプロサポシン・サポシンは胎生初期の E7.5 頃から母体由来組織である脱落膜、胎仔由来の細胞である栄養膜巨細胞、臍側卵黄嚢に発現すること、胎生中期以降に形成される胎盤では母体由来である脱落膜と胎仔由来である栄養膜巨細胞と海綿状栄養膜細胞に発現が見られること、羊水中には胎仔由来の分泌型プロサポシンが存在することを明らかにした。

Psap^{-/-}胚の組織病理学的解析の結果、*Psap*^{-/-}胚には、E7.5 頃から栄養膜巨細胞および臍側卵黄嚢におけるライソゾームの形態異常を呈して胎生致死となるものと、この時期を乗り越えて胎生中期から後期にかけて胎盤の海綿状栄養膜細胞層の低形成と胎仔の発育遅滞を呈するものの、大きく2つの表現型があることがわかった。胎生致死となる *Psap*^{-/-}胚ではサポシンの欠損によって栄養膜巨細胞のライソゾームや臍側卵黄嚢の巨大ライソゾームの機能低下によって細胞の機能障害が起こると考えられた。特に、臍側卵黄嚢は、胎盤が形成される以前において、母体由来の栄養素をエンドサイトーシスによって取り込み、巨大ライソゾーム内で分解したのち、胎仔側へ供給すると考えられていることから、サポシン欠損による巨大ライソゾームの機能障害が胎仔に発育障害をきたすと考えられた。また、*Psap*^{-/-}胚の臍側卵黄嚢にもサポシンが発現していたことから、臍側卵黄嚢では、胎仔由来に加えて、母体から輸送されてきたプロサポシンがサポシンにプロセスされて機能することが示唆された。*Psap*^{-/-}の胎盤では栄養膜巨細胞および海綿状栄養膜の機能異常により、胎仔への栄養供給がうまくいかず、胎仔の発育不全を引き起こすと考えられた。また、*Psap*^{-/-}の羊水ではプロサポシンの発現が全く見られず、胎仔由来の組織から分泌されることがわかった。プロサポシンは羊水において成長因子や栄養成分の輸送タンパク質として胎生期にも独自の機能を有している可能性がある。

ヒトプロサポシンを全身で強発現させた *PSAP* Tgマウスと *Psap*^{-/-}との交配実験によって母体由来のプロサポシン・サポシンの胎仔への影響を検討した。レスキューマウス (*PSAP* Tg/w, *Psap*^{-/-}) 同士の交配から得られた *PSAP* w/w, *Psap*^{-/-}はメンデルの法則に従って出生し、出生早期の死亡も観察されなかったことから、母体に強発現したプロサポシン・サポシンが *Psap*^{-/-}の胎生致死の表現型や、出生早期の皮膚のバリア形成障害による致

死性表現型をレスキューすることが示唆された。

本研究によって、プロサポシンおよびサポシンはマウスの胎生期において脱落膜や栄養膜巨細胞、海綿状栄養膜細胞、臍側卵黄嚢の機能維持に関わると考えられ、その欠損によって *Psap*^{-/-}の大部分はE7.5 頃から胎生致死となることが明らかになった。また、母体からプロサポシンを投与することによって、ヒトプロサポシン欠損症やサポシン欠損症胎児への治療効果があるのではないかと期待される。

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) Hojo H, Tanaka H, Hagiwara M, Asahina Y, Ueki A, Katayama H, Nakahara Y, Yoneshige A, Matsuda J, Ito Y, Nakahara Y. Chemoenzymatic synthesis of hydrophobic glycoprotein: synthesis of saposin C carrying complex-type carbohydrate. *Journal of Organic Chemistry*. 77, 9437-9446, 2012. 査読有
- (2) Hojo H, Katayama H, Tano C, Nakahara Y, Yoneshige A, Matsuda J, Sohma Y, Kiso Y, Nakahara Y. Synthesis of the sphingolipid activator protein, saposin C, using an azido-protected O-acyl isopeptide as an aggregation-disrupting element. *Tetrahedron Letters*. 52, 635-639, 2011. 査読有

[学会発表] (計14件)

- (1) 米重あづさ、北條裕信、武藤真長、松田純子：化学合成サポシンCのグルコシルセラミド□グルコシダーゼ活性への影響。第85回日本生化学会大会2012年12月14-16日 福岡国際会議場。
- (2) 武藤真長、米重あづさ、昼沢良介、吉村真一、松田純子：プロサポシン強発現マウス胚組織の表現型解析。第85回日本生化学会大会2012年12月14-16日 福岡国際会議場。
- (3) Yoneshige A, Hojo H, Mutou M, Matsuda J. The activity of chemically synthesized saposin C on glucosylceramide-□-glucosidase. 第4回国際ライソゾーム病フォーラム2012年10月4-6日 東京プリンスホテル。
- (4) Yoneshige A, Mutou M, Watanabe T, Tano C, Hojo H, Matsuda J. The effects of chemically synthesized saposin C on glucosylceramide-□-glucosidase. The 26th International Carbohydrate Symposium (ICS2012), July, 22-17, 2012, Hotel Melia

Castilla (Spain).

(5) Mutou M, Yoneshige A, Watanabe T, Matsuda J. Role of prosaposin in the embryogenesis of mouse. The 26th International Carbohydrate Symposium (ICS2012), July, 22-17, 2012, Hotel Melia Castilla (Spain).

(6) 武藤真長、米重あづさ、渡邊昂、松田純子：マウス胚発生におけるプロサポシンの役割。第84回日本生化学会大会 2011年9月22-24日 国立京都国際会館。

(7) Yoneshige A, Mutou M, Matsuda J. Prosaposin during the embryogenesis of mouse. The 31th Naito conference, September, 13-16, 2011, Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo.

〔図書〕(計4件)

(1) 松田純子、米重あづさ：サポシンA欠損症。先天代謝異常症候群 第2版(下)－病因・病態研究、診断・治療の進歩－。日本臨牀 別冊。2012年 p.508-512.

(2) 松田純子、米重あづさ：サポシンB欠損症。先天代謝異常症候群 第2版(下)－病因・病態研究、診断・治療の進歩－。日本臨牀 別冊。2012年 p.513-517.

(3) 松田純子、米重あづさ：サポシンC欠損症。先天代謝異常症候群 第2版(下)－病因・病態研究、診断・治療の進歩－。日本臨牀 別冊。2012年 p.518-522.

(4) 松田純子、米重あづさ：サポシン欠損症。ライソゾーム病－最新の病態、診断、治療の進歩。診断と治療社。2011年 p.180-183.

〔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：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米重 あづさ (YONESHIGE AZUSA)
東海大学・糖鎖科学研究所・特定研究員
研究者番号：70586750

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし