

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440156

研究課題名(和文)細胞外基質アリールスルファターゼの分子環境の構築と形態形成制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the construction of extracellular environment and regulation of morphogenesis by extracellular arylsulfatase

研究代表者

中坪 敬子(光永敬子)(MITSUNAGA-NAKATSUBO, Keiko)

広島大学・理学研究科・助教

研究者番号：40192760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アリールスルファターゼB(ArsB)を、硫酸化基質と複合体をなす細胞外基質であるという視点に立ち、ArsBを含む細胞外基質の分子環境が、どのような機構により構築され、形態形成が円滑に制御されているのかを解明することを目的とした。細胞外分泌型のArsBを主に発現しているメダカ脳のArsBを免疫組織化学的に検出し、ArsB局在域の微細構造を電顕により解析した。ArsB変異メダカの発生への影響も調べた。ArsBは、脳脊髄液循環を介して、脳室ごとの領域特異的な機構により分泌されて、細胞外環境が築かれている可能性が示唆されたが、ArsBの機能の確定には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of arylsulfatase B (ArsB) as a component of the extracellular matrix, distribution pattern of ArsB in medaka brain was examined immunohistochemically using light and electron microscopy. The fine morphology of the cells that express ArsB was also analyzed at the ultrastructural level. The ArsB mutants were generated to analyze the phenotypes. ArsB signals were observed both in the intracellular and extracellular spaces of the choroid plexus of the third ventricle. Weak signals were additionally detected in the restricted cells of ependyma constituting the floor of the fourth ventricle. It is possible that extracellular environment including ArsB is constructed depending on the cerebrospinal fluid circulation.

研究分野：発生生物学

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

1. 研究開始当初の背景

多細胞動物の形態形成は、細胞外基質が築く分子環境に依存して行われ、細胞外基質の変異は、分子環境の破綻を招き、形態異常(疾患)を起こすと考えられる。

アリールスルファターゼ(Ars)は、芳香族硫酸エステル(人工基質)を加水分解するライソゾームの酵素として発見され、Ars 遺伝子の変異は、酵素活性を欠如させ、硫酸化基質がライソゾーム内に蓄積し、特定疾患(難病)のライソゾーム病を起こすと考えられている。他方、Ars の生体内の基質に対する酵素活性は、人工基質と比較して1/100以下と非常に低いことからArsの酵素としての機能には、矛盾があった。研究代表者らは、細胞外基質を保持して固定した組織を用いて免疫染色を行ない、棘皮動物のウニArs、哺乳類ArsAとArsBには、酵素活性を持たずに、細胞外基質を構成しているものがあることと、組換えArsが培養細胞の接着と形態に影響を及ぼすことを示し、Arsに細胞外基質という新しい概念を導入した(引用文献)、

Arsの細胞外基質としての機能を理解するためには、細胞外基質としての分子環境とその構築システム及びArsの変異による細胞外基質環境の破綻が及ぼす影響を明らかにすることが必要である。Arsは、哺乳類では、A~Kまで報告されていたが、Arsの細胞外基質としての機能解析のために、ムコ多糖症VI型の原因遺伝子で、デルマトン硫酸、コンドロイチン硫酸の加水分解酵素として定義されているArsBに特に注目する。ArsBに関する研究報告が多いことに加えて、ArsBの変異による疾患では、全身組織でグリコサミノグリカンの蓄積と組織の空胞化が観察され、重篤な形態異常(頭部形成不全、肝脾腫、骨格異常等)と成長遅延が起こることから、ArsBが形態形成に不可欠であることによる。これまでに、研究代表者らが確立した免疫染色法により、ラットArsBが、疾患により顕著な影響を受ける肝臓の毛細血管類洞に沿った血管内皮細胞表面層とディッセ腔にて、ヘパラン硫酸プロテオグリカンと共局在することを報告した(引用文献)。ArsBは、プロセッシングを受けない前駆体が細胞外に分泌され(細胞外分泌型)、細胞内ではプロセッシングにより、3つのサブユニットに分かれる(細胞内型)。この点に注目した解析を行い、メダカの生体内では、ArsBの細胞外分泌型が、脳で最も豊富で、脳室に強い発現があることを示した。加えて、モルフォリンによるArsBの翻訳抑制が、成長遅延、特に脳の形成不全を起こす結果を得て、細胞外である脳室の脳脊髄液中におけるArsBの発現が、脳を含む頭部の形態形成において重要である可能性が示された。ラット肝臓とメダカ脳におけるArsBの発現領域の結果から、細胞外基質ArsBは、血管や脳室等の循環系を構成している細胞が合成、分泌し、生体内を循環して、それ

ぞれの組織に必要な細胞外基質環境を築いて機能している可能性が予測された。

Arsの研究は、患者由来の培養細胞や哺乳類の疾患モデル動物を用いた疾患に伴う活性量と活性局在の変化の解析が主流で、非酵素型のArsに注目した例は少ない。哺乳類や培養細胞を用いた系は、変異と疾患の因果関係は示せても、Arsを含む細胞外環境がいつどこで機能しているのかを示すのは、困難である。哺乳類と共通した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過程に至る細胞の運動と形態変化の観察が容易なメダカを用いるなら、循環系を介する細胞外基質環境の形成とその機能の解明に適していると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ArsBを硫酸化基質の加水分解酵素ではなく、硫酸化基質と複合体をなす細胞外基質であるという視点に立ち、ArsBを含む細胞外基質の分子環境が、どのような機構により構築され、形態形成が円滑に制御されているのかを明らかにすることを目的とした。そのために、メダカを主に用いて、ArsBの疾患や機能抑制実験により顕著な影響を受け、かつ、細胞外分泌型ArsBの発現量が多い脳に主眼をおき、比較対象として、ラットの肝臓にも注目し、(1)細胞外基質ArsBの分子環境を、ArsB特異的抗体を用いた免疫染色により解明する。(2)細胞外基質ArsBの分子環境構築システムを、脳脊髄液循環と肝血管系に注目して解明する。(3)ArsBの変異が、発生過程の細胞形態・運動、器官形成等に及ぼす影響を調べる。以上を統合して、細胞外基質ArsBによる形態形成制御機構モデルの構築をめざした。

3. 研究の方法

メダカ(OK-Cab)系統を主に使用し、細胞外基質の分子環境と構築機構の解析には、ラット(Wistar)も併用した。

(1) 細胞外基質ArsBの分子環境の解析

ArsBに特異的な抗体を用いて、ArsBの局在域を免疫組織化学的に検討した。メダカ脳は、パラフォルムアルデヒドで固定後、凍結切片またはアガロースに包埋後未凍結切片を作製し、蛍光抗体法又はHRP法にて局在部位を光顕的に観察した。電顕観察には、包埋前染色法(HRP標識法)を用いた。固定と免疫染色の過程では、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。ラット肝臓の免疫染色は、研究代表者らが既に報告した方法で行った(引用文献)。

(2) 細胞外基質ArsBの分子環境構築系の解析

ArsBを含む分子環境を構築する系を、メダカ脳とラット肝臓を用いて以下の方法で解析した。

メダカ脳内部構造の解析

メダカの脳を樹脂包埋し、前頭断と矢状断切片を作製し、トルイジンブルーで染色し、脳内部構造を解析した。

メダカ脳室壁構造の解析

免疫電顕で ArsB の反応を検出した領域の脳室壁を構成する細胞の形態、微細構造を調べるために、アルデヒドで前固定した脳を樹脂包埋し、超薄切片を作製して、透過型電子顕微鏡により観察した。

ラット ArsB mRNA の発現領域の解析

ラット肝臓における ArsB 合成細胞を特定するために、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

(3) ArsB 変異メダカの形態形成における影響

ArsB アミノ酸置換メダカの作製

NBRP メダカに寄託されている TILLING ライブラリー(引用文献)より ArsB のスルファターゼドメイン内に変異がある候補を選び、人工授精を行ない、ArsB 変異メダカを得て、形態形成への影響を解析した。

ArsB ゲノム編集メダカの作製

メダカ ArsB のスルファターゼドメインのコア領域に結合する TALEN の mRNA を受精卵に顕微注入し、スルファターゼドメインが破壊されたメダカを得て、形態形成への影響を解析した。

4. 研究成果

(1) ArsB の分子環境の解明

ArsB を含む細胞外基質の分子環境を解明するために、メダカ脳とラット肝臓を用いて、研究代表者らが確立した細胞外基質を保持した条件下で免疫染色を行った。メダカ脳に関しては、次項で述べる脳内部と脳室壁の構造解析の結果と対応させて、ArsB の局在を検討した。

メダカの ArsB は、稚魚までは細胞内型が主で、細胞外分泌型は成体の脳に豊富であったので、成体脳を用いた。蛍光抗体染色により、第三脳室脈絡叢の間質細胞に ArsB の強い発現を、脈絡叢上皮細胞頂端側にも弱い反応を検出した。細胞構造を保持するために、未凍結切片を用いた免疫電顕により ArsB の局在を精査した。第三脳室脈絡叢の ArsB の反応は、密着して存在する特定の細胞質内の顆粒状構造と細胞膜、上皮細胞のライソゾーム、小胞体、細胞膜、糖衣にあることを確認した。菱脳室にも、弱いながらも、菱外側角及び底表層の一部の特殊化した上衣細胞で、選択的な ArsB の反応を確認した。中脳室では、正中の脳室周囲の上衣細胞で、ArsB の強い反応を認めた。

ArsB の局在をメダカ脳と比較する目的で、ラット肝臓における ArsB の局在を再検討した。ArsB は、幼弱肝臓の時から既に類洞に沿った細胞外で、ヘパラン硫酸化プロテオグリカンと共局在していた。免疫電顕により、従来報告した類洞血管内皮細胞、肝実質細胞表

層に加えて、新たにディッセ腔のコラーゲン繊維上や肝実質細胞の密着結合にも ArsB が局在することを明らかにした。研究代表者らが細胞外 ArsB を発表後、培養細胞、哺乳類組織における細胞外 ArsB の報告が他の研究者らにより行われているが、免疫電顕による解像度の高い解析には、至っていない。

(2) ArsB の分子環境構築機構の解明

メダカ脳における ArsB の分子環境を築く系を明らかにするために、樹脂包埋したメダカ脳の前頭断と矢状断切片を作成し、脳内部構造をまず確認した。第三脳室では、単層の上衣細胞が軟膜由来の間質細胞を囲む発達した脈絡叢を認めた。菱脳室では、脈絡叢の発達は悪かったが、菱脳室底に細胞間をムコ多糖が占めている特殊化した上衣細胞を確認することができた。更に ArsB 合成細胞の特定とその輸送経路を調べるために、ArsB の局在を確認した領域の微細構造を透過型電顕により検討した。ArsB の顕著な発現は、第三脳室脈絡叢で密着して存在する種々の形態の間質細胞のうち、多数の顆粒状の構造を細胞質に持つ細胞であることを確認した。この顆粒は、小胞体と繋がるもの、細胞膜と融合して開放されているものがあり、内部には、繊維状の構造が認められた。上皮細胞には、発達した微絨毛と密着結合が認められ、電子密度が高い暗調細胞も含まれていた。ArsB の弱い反応が認められた菱脳室底には、分泌物が充満する細胞、細胞膜が破れ、内容物を分泌している様々な変性段階にある細胞が認められ、これらは全分泌の特徴を示す。以上の ArsB の局在と関連した領域の構造は、ArsB が、メダカ脳では、主に第三脳室脈絡叢の間質細胞で合成されて上皮細胞を経て脳室内に、菱脳室では、上衣細胞から選択的な全分泌により放出されて機能している可能性が高いことを示唆する。ArsB を発現する間質細胞の顆粒状構造のより詳細な立体配置と機能及び菱脳室における ArsB の選択的な分泌機構の解明は、今後の課題である。

ラット肝臓で ArsB を合成し、細胞外環境を築く細胞を、*in situ* ハイブリダイゼーションにより調べた。ArsB の mRNA の発現は、肝実質細胞で顕著であったが、血管内皮細胞等における発現は低く、主に肝実質細胞で合成され、分泌されていることが示された。脳室とは異なり、肝血管系では、ArsB の分子環境の形成に領域ごとの特異性は、検出されなかった。

(3) ArsB 発現異常の影響解析

TILLING 法により ArsB のスルファターゼドメインのアミノ酸が変異したメダカを作製したが、今回選択した変異体では、外部形態、運動能力に対する影響は殆どなかった。更に、TALEN により ArsB のスルファターゼドメインから C 末側を破壊したメダカを作製した。初期発生期の形態形成運動、幼魚期、成魚期の

発育速度や外部形態、ArsB 疾患で異常が報告されている組織に注目して解析したが、これまでの解析では、野生型との顕著な差は、認められなかった。

以上の研究により、メダカ脳では、脳脊髄液循環を介した領域特異的な ArsB の分泌経路により、ArsB を含む細胞外基質環境が築かれて機能している可能性が示唆された。今後は、ArsB ノックアウトメダカの形態形成への影響が低い原因を明らかにし、疾患で重篤な変異が生じる ArsB の機能部位のアミノ酸を変化させたメダカを作り、発生及び細胞外基質環境への影響を検討することで、細胞外基質 ArsB による形態形成制御モデルの完成に努めたい。

< 引用文献 >

- Mitsunaga-Nakatsubo K *et al.*, Arylsulfatase exists as non-enzymatic cell surface protein in sea urchin embryos. *J. Exp. Zool.*, 280: 220-230, 1998.
- Mitsunaga-Nakatsubo K *et al.*, Sea urchin arylsulfatase, an extracellular matrix component, is involved in gastrulation during embryogenesis. *Dev. Genes Evol.*, 219: 281-288, 2009.
- Mitsunaga-Nakatsubo K *et al.*, Cell-surface arylsulfatase A and B on sinusoidal endothelial cells, hepatocytes, and Kupffer cells in mammalian livers. *Med. Mol. Morphol.*, 42: 63-69, 2009.
- Fujita K *et al.*, Mammalian arylsulfatase A functions as a novel component of the extracellular matrix. *Connect. Tissue Res.*, 51: 388-396, 2010.
- Taniguchi Y *et al.*, Generation of medaka gene knockout models by target-selected mutagenesis. *Genome Biol.*, 7: R116, 2006.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計7件)

中坪敬子(光永敬子)、秋元義弘、安井金也、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)の菱脳室における発現と超微細構造、2017 年度 日本動物学会中国四国支部 広島県例会、2017 年 3 月 9 日、広島大学(広島県・東広島市)

中坪敬子(光永敬子)、秋元義弘、安井金也、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)を産生する

メダカ第三脳室脈絡叢の超微細構造、2016 年度 日本動物学会中国四国支部 広島県例会、2016 年 3 月 2 日、広島大学(広島県・東広島市)

中坪敬子(光永敬子)、秋元義弘、安井金也、山下一郎、川上速人、安増茂樹、メダカ脳におけるアリアルスルファターゼ B(ArsB)の発現領域とその構造、日本動物学会第 86 回大会、2015 年 9 月 19 日、朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター(新潟県・新潟市)

中坪敬子(光永敬子)、秋元義弘、安井金也、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)のメダカ脳における分子環境、2015 年度 日本動物学会中国四国支部 広島県例会、2015 年 3 月 3 日、広島大学(広島県・東広島市)

中坪敬子(光永敬子)、秋元義弘、安井金也、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)の脳における分子環境構築、日本動物学会第 85 回大会、2014 年 9 月 11 日、東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

中坪敬子(光永敬子)、秋元義弘、安井金也、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)のメダカ脳における分子環境の解析、2014 年度 日本動物学会中国四国支部 広島県例会、2014 年 3 月 27 日、広島大学(広島県・東広島市)

中坪敬子(光永敬子)、秋元義弘、安井金也、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)のメダカ脳における免疫組織化学的解析、日本動物学会第 84 回大会、2013 年 9 月 26 日、岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)

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

(3)連携研究者

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

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