

岩瀬 忠行, 水之江 義充
(東京慈恵会医科大学細菌学講座)

Microbe-microbe and host-microbes interactions
Tadayuki Iwase and Yoshimitsu Mizunoe (Department of
Bacteriology, The Jikei University School of Medicine, 3-
25-8, Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan)

マウス胚発生期における mVam2 依存性エンドサイトーシスによる BMP (bone morphogenetic protein) シグナルの制御

1. はじめに

われわれヒトに最も近いモデル生物であるマウスにおいて、受精卵は細胞の数を増やししながら8日目までに前後、左右、背腹の軸を確立し、「かたち」を獲得する。複数の細胞から組織が構築される際、細胞は互いに情報を交換して位置関係の把握や分化の方向付けを行う。組織構築では、情報がつくられること、消去されること、の二つが適切に組み合わせられて、時間的、空間的なパターンが形成される。初期発生では、多数の分泌性のシグナルタンパク質が位置情報、分化誘導情報を担うことが明らかにされている。しかし、シグナルの活性を制御するもう片方の役者、すなわち情報伝達のスイッチをオフにするメカニズムは未解明な点が多く残されている。

エンドサイトーシス経路は細胞表層のシグナル受容体を細胞内へ取り込み、リソソームなどの分解コンパートメントに送ることによってシグナルを負に制御する、いわゆるダウンレギュレーションに関与するとされている(図1)。しかしながら、組織レベル、個体レベルでのシグナル制御にエンドサイトーシス経路が機能していることを明らかにした研究はほとんどなされていない。哺乳動物の初期発生では、小さな胚がきわめて短時間の間に、様々なシグナル伝達経路を活性化、不活性化することによって進行する。このような発生様式では時間的・空間的な制御の厳密さが要求されると想像できる。私たちは初期発生の場で、エンドサイトーシス経路がもつ役割に興味を抱いた。本稿では、最近の研究について紹介したい。

2. 小胞輸送機能分子の遺伝子改変マウス

細胞内膜系のダイナミクスは大変活発に研究されてお

り、その分子機構の詳細が明らかにされている。また、細胞レベルでの機能研究も優性阻害分子の発現、遺伝子発現への介入、などの分子生物学の方法を駆使することにより、明らかにされつつある。しかし、このようなアプローチでは組織レベル、個体レベルでの機能に迫ることが難しく、遺伝子改変動物の作出が必要となる。しかしながら、細胞内小胞輸送のような、基本的細胞機能を担う分子をコンベンショナルな遺伝子ノックアウトによって機能を欠損させると、発生のごく初期段階で細胞が死んでしまい¹⁾、組織レベルでの解析ができないことが予想される。

近年、条件的遺伝子改変マウスを開発する方法論が確立されている。この方法を用いると、組織特異的あるいは発生段階特異的に遺伝子破壊を行うことができる。私たちはこのような条件的遺伝子破壊が可能な改変アレルを作製して、マウス個体に導入することを進めている。本方法²⁾の特徴は、出発材料として大腸菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome: BAC) をベクターとして構築されたマウスゲノムライブラリーを用いていることである。現在、複数のマウス系統のライブラリーが構築されており、各々のBACクローンの両端の配列が決定されている。興味のある遺伝子を含むBACクローンをコンピュータ上で検索することができ、簡単に入手することも可能である。私たちはエンドサイトーシスやオルガネラ機能に関わる遺伝子をもつBACクローンを得たのち、大腸菌内の相同組換えを利用し、長大な遺伝子断片の上にピンポイントに改変を加える^{2,3)}ことで条件的遺伝子破壊コンストラクトの作成を行っている。このようなゲノムプロジェクトの成果と微生物分子生物学のコラボレーションは、きわめて短時間のうちに、複雑な遺伝子改変をデザイン通りに施すことを可能としている。

3. HOPS 因子 mVam2 は初期発生に必須である

私たちは酵母の液胞形成に必須な分子、Vam2 や Ypt7/Vam4 の機能の研究を進めてきた^{4,5)}。Vam2 は homotypic fusion and vacuole protein sorting (HOPS) complex とよばれる膜融合に機能するタンパク質複合体のサブユニットで、低分子量 GTP 結合タンパク質 Ypt7 との相互作用によって、オルガネラ間の膜融合を担っている。Vam2, Ypt7 とともに、動物、植物、菌類と広く真核細胞で保存されている^{6,7)}。オルガネラダイナミクスがマウスの初期発生をはじめとする生理機能の実現に果たす役割を明らかにするため、mouse (or mammalian) Vam2 (mVam2) の条件的遺伝子破壊を進めた²⁾。当初の予想通り、mVam2 の破壊は胎

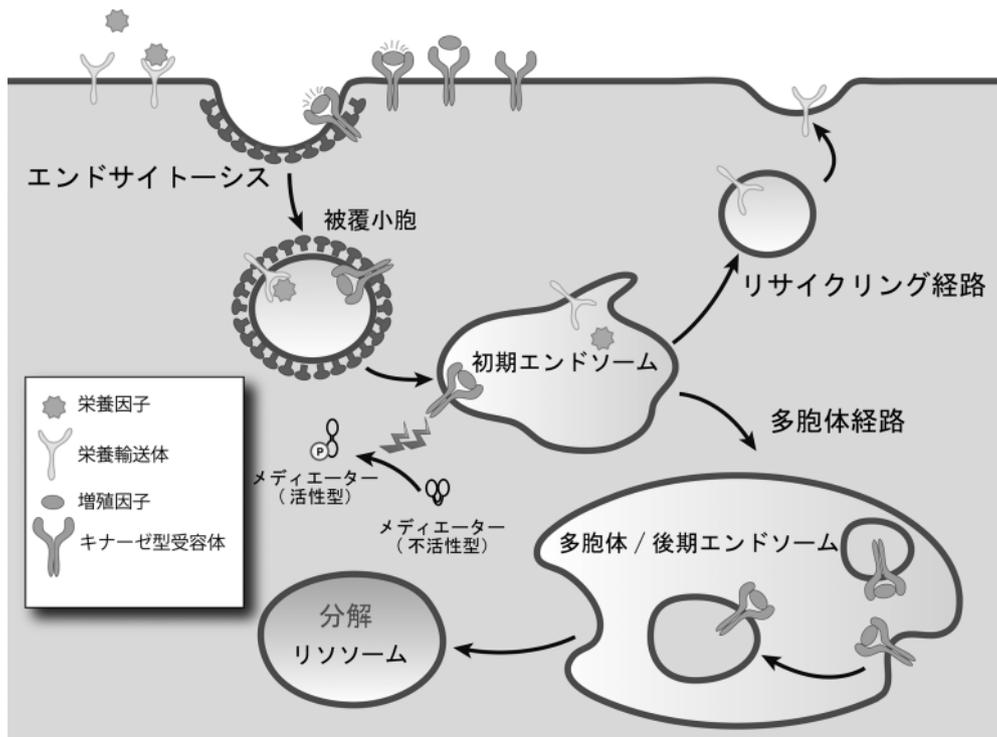


図1 シグナル伝達におけるエンドサイトーシス経路の役割

栄養因子や増殖因子が細胞表層の受容体と結合し、エンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれる。細胞内に移行した受容体は初期エンドソームへ運ばれる。初期エンドソームが、受容体から細胞内メディエーターにシグナルを渡す場であることが様々なシグナル伝達経路で明らかにされている。初期エンドソームは多胞体経路を経て、後期エンドソームへ、さらにはリソソームへと変わっていく。この過程で、オルガネラ膜がオルガネラ内腔側に落ち込み、エンドソーム膜にある受容体が細胞基質と物理的に隔離されるため、シグナルを細胞基質のメディエーターに伝えることができない。後期エンドソームが、リソソームなどの分解コンパートメントに変換することによって、シグナルを負に制御する。

性致死となり、 $mVam2^{-/-}$ の遺伝子型をもつマウスは誕生しなかった。条件的破壊変異 $mVam2^{lox}$ をもつマウスはメンデル遺伝の様式で期待される比率で誕生し、また、野生型と区別することはできない。すなわち、 $mVam2^{lox}$ は機能をもった遺伝子である。

4. $mVam2$ 欠損細胞における BMP シグナル伝達の異常亢進

$mVam2^{lox}$ をホモにもつ胎仔より、繊維芽細胞 (MEF) を得て、アデノウイルスを用いて Cre リコンビナーゼを発現させ、 $mVam2$ の遺伝子機能を破壊した。 $mVam2^{-/-}$ MEF では、リソソームが縮小し、後期エンドソームがやや増大している傾向が観察された。この MEF を用いて様々なシグナル伝達の活性を調べてみると、TGF- β 、EGF シグナルでは、活性化および不活性化のタイムコースは差がまった

くみられなかった。しかし、BMP (bone morphogenetic protein) シグナルでは、活性化の増大と、不活性化の顕著な遅延が観察され、BMP シグナルの不活性化には $mVam2$ 機能が重要であることが示された⁸⁾。

さて、 $mVam2$ 欠損マウスは誕生してこないわけだが、どの時期で、どのような状態で発生を停止しているのだろうか？ 受精後、発生段階ごとの胚を観察したところ、 $mVam2^{-/-}$ 胚は原腸陥入期に明らかに形態に異常を示した (図 2)。このことから $mVam2$ の機能が原腸陥入期の発生に必須であることが示された。受精卵が分裂を開始し、急速に細胞数を増やし、細胞の分化を伴いながら発生プログラムに沿って組織を形成し、内胚葉・外胚葉組織を確立して中胚葉を誘導していく、いわゆる受精から原腸陥入にいたる発生過程は、様々な分泌性サイトカインに制御されている。 $mVam2$ 変異胚では、Nodal, Fgf, Wnt の活性化パ

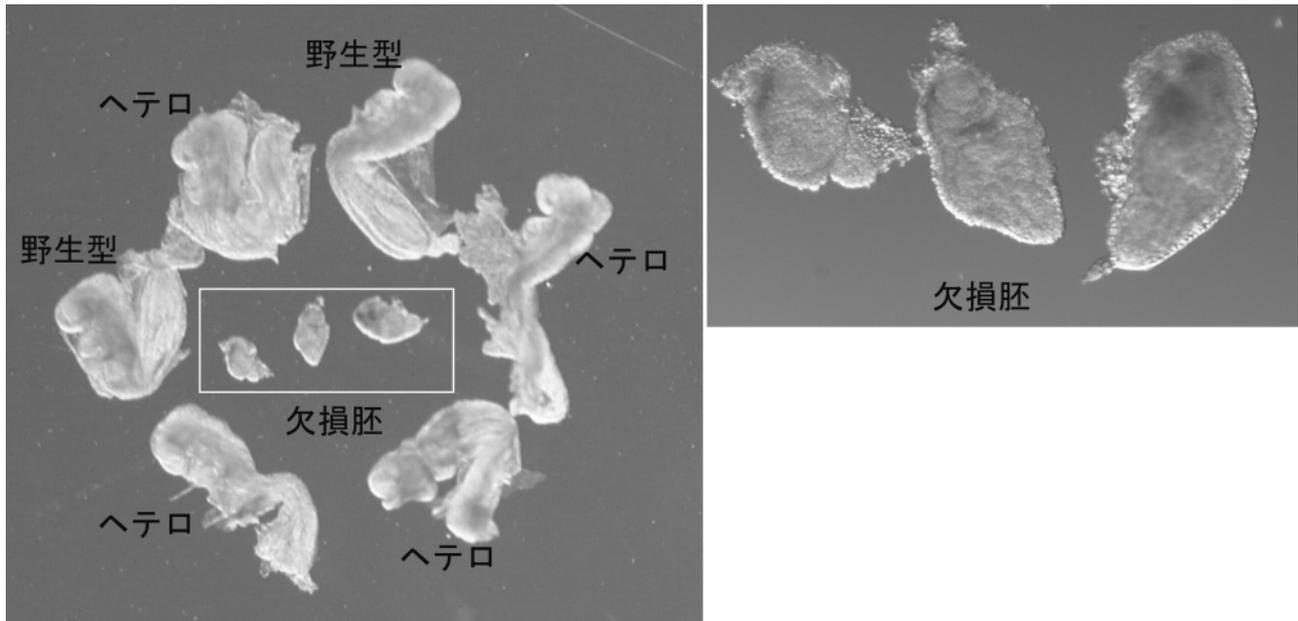


図2 マウス8.5日胚の形態

野生型胚,あるいは *mVam2* ヘテロ胚では胎生8日目までに頭尾,左右,背腹の軸が確立され,神経外胚葉,心臓原基,体節などの組織が形成される。しかし, *mVam2*^{-/-}胚は卵筒胚の形態以降の発生が停止してしまう。

ターンは,野生型のそれと本質的な差がみられなかった。一方, BMP シグナルの活性化状態を BMP 経路の細胞質メディエーターである Smad1/Smad5 のリン酸化状態で検討すると,本来, BMP シグナルが不活性化されていなければならない遠位部でも活性化されており,その結果として発生異常が起きることが予想された⁸⁾。

5. *mVam2* 欠損細胞のオルガネラ形態異常と胚発生・シグナル異常

mVam2^{-/-}胚は形態形成に異常を示すとともに,細胞内のオルガネラの構造にも大きな違いがある。マウスの初期胚の胚本体は臓側内胚葉 (visceral endoderm: VE) という単層上皮によって母体と仕切られており, VE を介して母体と栄養やシグナルをやりとりする。この機能を反映して VE は活発にエンドサイトーシスを行っており,細胞内に巨大な,頂端液胞 (apical vacuole: AV) を有している^{9,10)}。AV はリソソームタンパク質をもち,一般の細胞におけるリソソームと相同なオルガネラと考えられる。*mVam2* の機能を欠失した VE では巨大な AV が形成されず,断片化したオルガネラが多数蓄積している。*mVam2* の機能は,すなわち,大きな液胞を構築するのに必須であり,出芽酵母の *vam2* 変異株とマウスの変異 VE が良く対応する表現

型を示している¹¹⁾。

BMP シグナル不活性化の欠損は,胚組織,初代培養細胞の両方で共通してみられる表現型であった。細胞外から与えた BMP4 分子の細胞内輸送,あるいは BMP 受容体の輸送を検討したところ, *mVam2* 機能がこれらのシグナル分子をリソソームに送り,分解するのに必要であることがわかった。すなわち, *mVam2* は,原腸陥入に前後して BMP シグナルを細胞内分解コンパートメントに送り込んで不活性化するのに機能しており, BMP シグナルの時間的・空間的パターンの確立に必須であると結論した⁸⁾。

マウスの初期胚では,受精後5.2日目に遠位臓側内胚葉 (distal visceral endoderm: DVE) とよばれる一群の細胞が分化し,原腸陥入にむけて前後軸を決定するのに中心的な役割を担う¹²⁾。DVE の形成において BMP が抑制的に作用していることが示されており,胎生4.5日から胎生5.2日までの短期間に, DVE を確立するため BMP シグナルが厳密に制御される必要がある¹³⁾。私たちはこの制御に *mVam2* を介したエンドサイトーシス経路が機能していると考えている。

6. おわりに

BMP シグナル経路は組織の構築,腫瘍の発生と増殖,

骨に関連する疾病, さらには, 幹細胞の維持と分化など, 多彩な機能に関連する. これらの生理機能, また, その破綻に起因する病態生理の理解において, シグナル伝達を負に制御する分子機構としてのエンドサイトーシスは新しい視点を提供すると考えている.

- 1) Sun-Wada, G.H., Murata, Y., Yamamoto, A., Kanazawa, H., Wada, Y., & Futai, M. (2000) *Dev. Biol.*, **228**, 315–325.
- 2) Aoyama, M., Agari, K., Sun-Wada, G.H., Futai, M., & Wada, Y. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, e52.
- 3) Lee, E.C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A., Court, D.L., Jenkins, N.A., & Copeland, N.G. (2001) *Genomics*, **73**, 56–65.
- 4) Nakamura, N., Hirata, A., Ohsumi, Y., & Wada, Y., (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 11344–11349.
- 5) Wada, Y., Ohsumi, Y., Kawai, E., & Ohsumi, M. (1996) *Protoplasma*, **191**, 126–135.
- 6) Wichmann, H., Hengst, L., & Gallwitz, D. (1992) *Cell*, **71**, 1131–1142.
- 7) Radisky, D.C., Snyder, W.B., Emr, S.D., & Kaplan, J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5662–5666.
- 8) Aoyama, M., Sun-Wada, G.H., Yamamoto, A., Yamamoto, M., Hamada, H., & Wada, Y. (2012) *Dev. Cell*, **22**, 1163–1175.
- 9) Kawamura, N., Sun-Wada, G.H., Aoyama, M., Harada, A., Takasuga, S., Sasaki, T., & Wada, Y. (2012) *Nat. Commun.*, **3**, 1071.
- 10) Takasuga, S., Horie, Y., Sasaki, J., Sun-Wada, G.H., Kawamura, N., Iizuka, R., Mizuno, K., Eguchi, S., Kofuji, S., Kimura, H., Yamazaki, M., Horie, C., Odanaga, E., Sato, Y., Chida, S., Kontani, K., Harada, A., Katada, T., Suzuki, A., Wada, Y., Ohmishi, H., & Sasaki, T. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 1726–1731.
- 11) Wada, Y. (2013) *BioArchitecture*, **3**, 13–19.
- 12) Takaoka, K., Yamamoto, M., & Hamada, H. (2011) *Nat. Cell Biol.*, **13**, 743–752.
- 13) Yamamoto, M., Beppu, H., Takaoka, K., Meno, C., Li, E., Miyazono, K., & Hamada, H. (2009) *J. Cell Biol.*, **184**, 323–334.

孫 (和田) 戈虹¹, 和田 洋²
 (¹ 同志社女子大学薬学部生化学,
² 大阪大学産業科学研究所)

mVam2-dependent endocytic pathway regulates BMP signaling during mouse early development
 Ge-Hong Sun-Wada¹ and Yoh Wada² (¹Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College, Kyoto 610-0395, Japan; ²Division of Biological Sciences, Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, Osaka 567-0047, Japan)