

## 解説

## 多指症を防ぐモルフォゲン濃度勾配の新しい形成機構

田中 庸介

Key words: 多指症, ソニック・ヘッジホッグ, 細胞外小胞, サイトネーム, 濃度勾配

いかにして体の座標軸が定まるかは、発生生物学の永年の課題の一つであった。物質レベルは、座標軸を表象して組織のふるまいを誘導する“モルフォゲン”の濃度勾配が安定的に形成されるのはなぜか、という問いに置き換えられる。モルフォゲンを特異的に産生する細胞群を“オーガナイザー”と呼ぶ。ところが、タンパク質レベルにおいて、オーガナイザーから産生されるモルフォゲンのふるまいは初期胚ではほとんど可視化できておらず、オーガナイザー領域におけるモルフォゲン遺伝子発現と、その下流の遺伝子発現の様子から間接的に推測するほかはなかった。今回、Shh タンパク質の濃度勾配をノックアウトマウスで可視化すると共に、その形成機構を細胞生物学的に解析することにより、新しい2層性の勾配形成システムの仮説を立てることができた。

ソニック・ヘッジホッグ (Shh) は最も著名なモルフォゲンの一つである。神経管では、腹側の脊索ならびに神経管の底板から産生され、背側に向けて濃度勾配を形成する。実際、Shh シグナルが減弱する変異マウスでは神経管が背側化する<sup>1)</sup>。異なった Shh 濃度の培地で培養した神経前駆細胞は、それぞれの濃度に従い、異なった背腹軸分化マーカーを発現する<sup>2)</sup>。すなわち、組織は Shh 濃度の減衰の様子から自らの座標を知り、発生運命を決定すると考えられる。体肢芽においては、そ

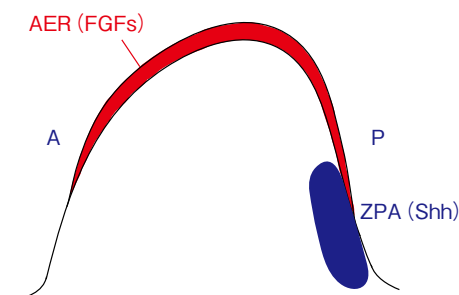


図1 体肢芽における2つのオーガナイザー  
外胚葉性頂堤 (AER) には線維芽細胞成長因子 (FGFs) が、後方の極性化活性域 (ZPA) にはソニック・ヘッジホッグ (Shh) の遺伝子がそれぞれ発現している。A: 前方, P: 後方

の後部に Shh の mRNA を特異的に発現するオーガナイザー領域があり、極性化活性域 (ZPA) と呼ばれている (図1)。体肢芽の前部に異所的に Shh を発現させたり、上流の遺伝子変異によってそれを異所的に発現したりすると、手指の発生に擾乱が生じる<sup>3,4)</sup>。Shh シグナリングの下流因子である Ptc1 や Gli1 は体肢芽の後部に強く発現し、その抑制因子の Gli3 はこれと拮抗する勾配を示す。

今回筆者らは、マウス 10.5 日初期胚の体肢芽を用いて、Shh タンパク質の濃度勾配をマクロレベルとミクロレベルの免疫組織化学によって染色した<sup>5)</sup>。更に多指症を示す KIF3B キネシン遺伝子発現低下マウスの体肢芽でこの濃度勾配が顕著に消失していることを端緒に、その細胞生物学的

## New mechanism of morphogen gradient formation in developing limb buds

Tanaka Yosuke: 東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻細胞構築学分野 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

0370-9531/08/¥500/論文/JCOPY

機序を解明した。本稿ではこのことについて紹介したい。

## I Shh タンパク質は KIF3B 依存的に体肢芽周縁に沿う後→前濃度勾配を形成する

筆者らは、細胞内物質輸送に関わるキネシンスーパーファミリー (KIFs) のすべての哺乳類遺伝子を同定し<sup>6)</sup>、分子細胞生物学的・分子遺伝学的な解析を通して個々の遺伝子の機能を追究してきた<sup>7)</sup>。今回、線毛の形成やカドヘリン、CRMP2 の輸送に関係するキネシン 2 ファミリーの KIF3B 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスをつくる過程で、*3loxP* マウスが多指症の表現型を示した。このマウスでは、当該遺伝子のエクソンがポジティブセレクションカセット中のスプライシングアクセプターによりトラップされ、遺伝子発現が減弱していた。また、このマウスの 10.5 日胚の体肢芽において、ヘッジホッグシグナリングが減弱して、その下流の前後軸が乱れていることをホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションや Gli3 のイムノプロットティングで確認した。*Shh* 遺伝子そのものの ZPA 領域における発現はほとんど変化がみられなかったが、その下流の *Hand2*, *Hoxd13*, *Gli1*, *Ptch1* などの遺伝子発現や Gli3 タンパク質のプロセッシングに顕著な減弱もしくは領域変化が現れており、Shh の翻訳レベル以降でのシグナルカスケードに異常が生じていた。しかし、ノード線毛の生成には明らかな差がなく、また左右軸の決定も正常であった。したがって、線毛の異常を通してヘッジホッグシグナリングが減弱しているわけではない。

そこで、ホールマウントの体肢芽の免疫染色を行った。野生型では顕著に体肢芽周縁部に Shh タンパク質が局在していた。中心部の染色は、これら周縁部に比して明らかに薄かった (図 2A)。更に、この周縁に沿った明るいシグナルは後方から前方に向けた濃度勾配を示した。これらのデータは、単純拡散とは異なった原理により、濃度勾配が形成されていることを示唆する。

そこで多指症を生じる *3loxP* マウス胚を同様に染色してみると、ここでは遠→近方向ならびに後

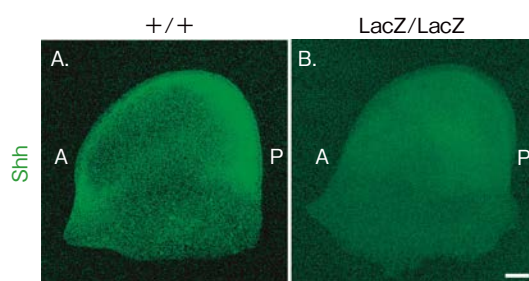


図 2 10.5 日齢マウス胚における体肢芽の Shh に対するホールマウント免疫染色

野生型マウス (A: +/+) では周縁に沿ったグラジエントが形成されるが、KIF3B 発現低下マウス (B: LacZ/LacZ) ではグラジエントが崩壊している。スケールバー: 100  $\mu\text{m}$  (Wang et al: Developmental Cell. 2022 より引用)

→前方向の濃度勾配が崩れ、Shh タンパク質が体肢芽全体に広がっていた (図 2B)。体肢芽全体ならびに後・前半分ずつのイムノプロットティングを行ってみると、Shh の全体発現量はほぼ変わりはないのにもかかわらず、後→前方向の濃度格差が減弱していた。すなわち、体肢芽後方における Shh タンパク質の強い集積部分の消失により、体肢芽の Shh シグナリングが減弱したものと考えられる。Shh シグナリングの減弱は多くの多指症マウスでもみられるため、このマウスにおいても多指症の主な原因となっていると考えられた。

## II Shh タンパク質は KIF3B 依存的に体肢芽中心部の細胞間顆粒に集積する

次に、Shh タンパク質の挙動変化を細胞レベルで明らかにするため、固定した体肢芽の凍結切片を蛍光抗体法で染色した。その結果、野生型では深部と浅部の間葉細胞で Shh タンパク質の局在パターンに大きな差を認めた (図 3)。深部の間葉細胞では、Shh タンパク質は細胞表面あるいは細胞間の数  $\mu\text{m}$  径の顆粒状構造に局在した。しかし浅部では、間葉細胞間のアモルファスな構造が染色され、顆粒状構造は少なかった。ところが *3loxP* マウスの体肢芽では、深部の顆粒状構造がほぼ消失し、深部でも浅部でも細胞間のアモルファスな構造に分布するようになった。細胞間の顆粒状構造は、F-アクチンで染色される細胞間突起 (サイトネーム) 上に局在し、リン酸化 Akt や転写因子 Sox9 など共局在していた。したがって、この

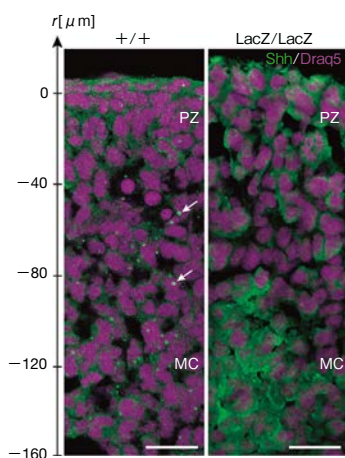


図 3 10.5 日齢マウス胚における体肢芽凍結切片の Shh に対する免疫染色(緑色)と細胞核のカウンターステイニング(紫色)

野生型マウス(+/+)では間葉中心領域(MC)において細胞間顆粒(矢印)がみられるが、その進行域(PZ)あるいは KIF3B 発現低下マウス(LacZ/LacZ)の全層においては、全くみられない。スケールバー: 25  $\mu\text{m}$  (Wang et al : Developmental Cell. 2022 より引用)

構造は、種々のシグナル伝達をまとめて空間的に調整する構造である可能性が高い。

更に透過電子顕微鏡ならびに免疫電子顕微鏡を用いた観察によって、Shh が局在する顆粒状構造と細胞間の構造に関しての詳細を解明した。顆粒状構造は、細胞膜によって被覆され、多くの透明な粒子を含んだサイトネーム上もしくは細胞表面の球形構造と考えられた。一方、野生型の体肢芽浅部ないし、3loxP マウスの深部・浅部においては、これらの顆粒状構造の膜が破れて、その内容物の微粒子が細胞間に放出されていた。放出後の膜は、大きなバブル様の中空構造や、巻物状の構造を形成していた(図4)。すなわち、野生型において Shh タンパク質を含む粒子は、体肢芽周縁部では細胞間に流出し、中心部では細胞間顆粒にトラップされているという2層性の分布を示した。3loxP マウスでは、いずれも細胞間に流出し、1層性に変化した。この2層性の構造は、体肢芽の周縁部に沿って Shh タンパク質が後から前に向かって拡散すると共に、その間に徐々に中心部にトラップされることで徐々にその濃度が減弱するという diffusion-and-trapping の特殊拡散系を生

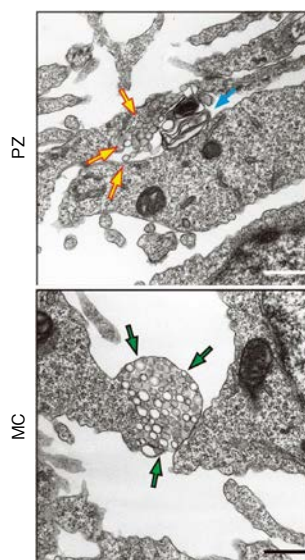


図 4 野生型マウス体肢芽の透過電子顕微鏡像

間葉中心領域(MC)においては透明な小胞を含み細胞膜で被覆された細胞間顆粒(緑色矢印)が多数みられるが、進行域(PZ)においては細胞膜が破れ(青色矢印)、小胞が細胞間隙に放出される(黄色矢印)。スケールバー: 500 nm (Wang et al : Developmental Cell. 2022 より引用)

じて、効率的に濃度勾配を形成・維持しているものと思われた。

### III FGF/PI3K シグナリングの遠近勾配が Shh タンパク質の2層性のふるまいを形成する

それでは、このような2層性の細胞のふるまいは、どのようなシグナリングによって分化するのだろうか。

体肢芽の空間を周縁部と中心部にわけるシグナルとして、最外縁の外胚葉性頂堤(AER)からの線維芽細胞成長因子群(FGFs)の分泌が知られている。FGFR シグナリング強度の高い周縁部の進行域(PZ)は細胞の分裂が盛んになり、体肢芽の伸長に寄与する強度の低い中心部(MC)は細胞の分化が進み、骨化が起こる。FGFR シグナリングの異常でも指の本数が変化するが、Shh タンパク質の濃度勾配との関係は全く不明であった(図5)。

筆者らは、この FGFR シグナリング強度の遠近軸勾配が、間葉細胞に取り込まれた Shh タンパク質のソーティングの違いを生み出すのではないかと考えた。そこで、まず FGFR/PI3K シグナ

リングのマーカであるリン酸化 Akt (pAkt) の免疫染色を行うと、野生型では確かに遠近方向の pAkt 染色の勾配が可視化できた。ところが、*3loxP* マウスでは全層性に染色強度が顕著に上昇していた。

この PI3K シグナリングの遠近勾配の消失が本当に Shh の濃度勾配を変化させるかについて、野生型マウス胚のマニピュレーションにより *in vivo* の系で確認した。ラット成体から immediately centrifuged (IC) 血清を調製して培地とし、回転培養器を用いて全胚培養を行った。まず、野生型の胚の体肢芽中心部に FGF8b 溶液を微量注入、あるいは FGF8b 溶液に浸漬したビーズを移植し、これを 2-4 時間回転培養した後で固定して染色した。すると FGF8b 注入胚は、KIF3B *3loxP* 胚の表現型をきれいに再現した。ホールマウントでは Shh タンパク質の後→前濃度勾配が崩壊し、凍結切片では Shh タンパク質を含有する顆粒状構造が消失し、全層性に細胞外のアモルファスな構造に Shh が放出されていた。また、pAkt 染色強度は全層性に増加していた。

次に、FGFR インヒビターである SU5402 あるいは BGJ398 を添加しつつ全胚培養を試みた。その結果、前述とは全く逆に、Shh タンパク質が全層性に細胞間顆粒ならびに付随するサイトネームに顕著に蓄積された。

これらのことから、KIF3B によって PI3K の活性化が負に調節され、そしてその下流で PI3K の活性が Shh タンパク質の細胞内挙動を制御していることが *in vivo* の系を用いて示唆された。そこで、その細胞生物学的な機序として、以下の 3 点を解明した。

#### IV KIF3B/Talpid3 複合体は PI3K シグナリングを終結させその遠近勾配を調整する

KIF3B と PI3K シグナリングの関係の糸口は、KIF3B 欠損マウスと Talpid3 欠損マウスとの表現型の類似性から得られた。Talpid3 はもともとニワトリの自然発生的多指症系統からクローニングされた遺伝子であり、ゼブラフィッシュやマウスの変異株においても、線毛形成やヘッジホッグ

シグナリングの異常が記載されている。また、データベースサーチによって、N 末端寄りに PTEN タンパク質と類似したドメインを同定したため、同様に PI3K シグナリングを終結させる PIP<sub>3</sub> 脱リン酸化活性を持つのではないかと予想した。

そこで、Talpid3 タンパク質と KIF3B タンパク質の相互作用を解析した。GST プルダウン、タグ免沈、ネイティブ免沈、FRET/FLIM 法などの方法によって、Talpid3 の PTEN ドメインを含む 340-1056 アミノ酸残基の中央部分が KIF3B との特異的な結合に必須であることを解明した。また、この二者が細胞突起内で共に動いている様子を Airyscan 顕微鏡を用いて観察した。

次に、*3loxP* マウス体肢芽間葉系の初代培養細胞を用いて、Talpid3 の発現ないし局在の変化を明らかにした。蛍光抗体法により、野生型細胞では Talpid3 は核小体、線毛基部、細胞周縁の 3 か所に特異的に局在したが、*3loxP* 細胞では有意にこれらの集積が減少した。

qPCR では有意な *Talpid3* トランスクリプトの減少はみられなかったが、ノックダウン細胞で Talpid3 のタンパク質安定性を調べると、*3loxP* 細胞では有意にターンオーバー率が上昇していた。

更に、リコンビナント Talpid3-EGFP と EGFP タンパク質における種々のイノシトールリン脂質に対するマラカイトグリーンアッセイを行い、PIP<sub>3</sub> 特異的な脱リン酸化活性を検出した。すなわち、Talpid3 は活性脂質 PIP<sub>3</sub> を水解し、PI3K シグナルを終結させる役割を持つことが示唆された。実際、培養線維芽細胞において Talpid3 をノックダウンすると、細胞内の pAkt レベルが有意に増加した。

以上のことから、KIF3B/Talpid3 複合体は FGFR/PI3K シグナリングの終結を促進してシグナルノイズ比を高め、体肢芽における遠近勾配を維持していることが示唆された。

#### V PI3K シグナリングは Shh 細胞外小胞の放出を促進させる

そこで NIH3T3 線維芽細胞の系を用いて、ShhN-EGFP 含有粒子の細胞外放出を可視化した。まず、KIF3B ノックダウンベクター、ある

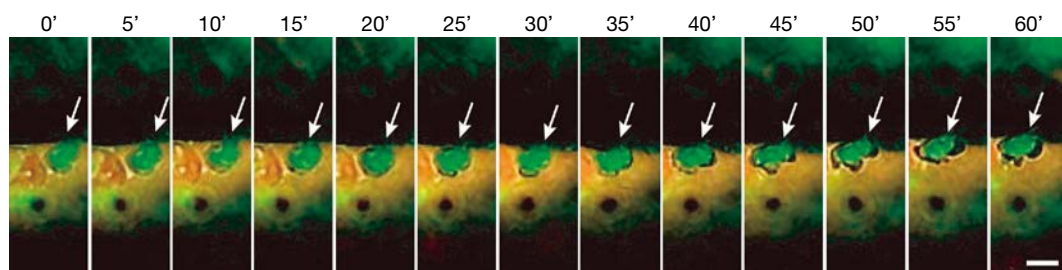


図 5 KIF3B をノックダウンした線維芽細胞から放出される Shh-N-EGFP 含有小胞 (矢印) のタイムラプス観察  
スケールバー: 10  $\mu\text{m}$  (Wang et al: Developmental Cell, 2022 より引用)

いは PI3K シグナリングを賦活する PTEN インヒビターである SF1670 や bpV (HOPic) で細胞を処理すると、培地中をブラウン運動している緑色蛍光粒子の密度が対照群の 2-10 倍に顕著に増加した。この PI3K 依存的 ShhN-EGFP 粒子放出は、一般的なエクソソーム放出に関わる nSMase2 インヒビター GW4869 によって同時処理したところキャンセルされた。

多点スピニングディスク顕微鏡を用い、KIF3B ノックダウン細胞からの Shh 粒子の放出の連続観察を行った。対照群では 5%, ノックダウン細胞では 40% の細胞において、数  $\mu\text{m}$  程度の大型の緑色蛍光粒子が一塊となって表面から放出され、その一部は細胞突起先端へと輸送されていた (図 5)。コリレーション電子顕微鏡により、粒子放出後の細胞表面には多数のフィロポディアが群生しており、そこに細胞膜のみの構造や、細胞外小胞の一部と思われるアモルファスな粒子群が付着していた。

他のグループの知見により、Shh 含有細胞外小胞は一般的なエクソソームマーカー CD63 のかわりに、Axl, Rab18, Tmed10 の ART マーカールを含んでいる<sup>8)</sup>。ShhN-EGFP を線維芽細胞にトランスフェクトし、ART マーカールならびに細胞膜が出芽して生じる細胞外小胞の一種であるエクソソームのマーカーの Flotilin 1/2 に対して免疫染色した。すると、細胞内の大型の蛍光小胞に特異的に ART マーカールが共発現したが、エクソソームのマーカーは全く共局在しなかった。

そこで、更に nSMase2 に対しても免疫染色を行った。特に nSMase2 インヒビター GW4869 存在下において SF1670 による PI3K 刺激を加えた

場合に限り、nSMase2 が Shh 含有の大型小胞へと強く共局在することが認められた。したがって、PI3K シグナリングが一時的に nSMase2 がリクルートされることにより、エクソソーム放出経路による Shh 小胞の細胞外放出が促進されていることが新たに示唆された。

## VI PI3K シグナリングはサイトネーム内の Shh ベシクル輸送を抑制する

最後に、PI3K シグナルにより細胞間顆粒への Shh タンパク質の蓄積が阻害される機構についても解析した。まず、体肢芽間葉細胞を初代培養した系で、この KIF3B/Talpid3 依存性の Shh タンパク質のフィロポディア内への蓄積が再現できた。更に ShhN-EGFP 発現ベクターを *3loxP* 細胞に発現させ、ShhN-EGFP 含有小胞のフィロポディア内でのトラッキングを行った。すると、Shh 小胞を含有しない *3loxP* 細胞のフィロポディアにおいても、LY294002 処理で PI3K シグナルを阻害すると、20 分程度で急激にフィロポディア内への小胞輸送が盛んとなった。これを解析すると、先端方向 0.1-0.2  $\mu\text{m/s}$  のところに LY294002 刺激によって特異的に増加する速度分布が得られた。この速度はミオシン分子モーターの速度とほぼ一致しており、Myosin X などのミオシンは、PIP<sub>3</sub> の直接結合によりその活性が阻害されるとされているため、PI3K シグナルの上昇時にミオシン分子モーターが不活性化され、Shh ベシクルのサイトネームへの輸送が阻害される機構が示唆された。

## おわりに

以上の結果から、指のパターニングに必須な

# A Diffusion-and-Trapping Hypothesis of Shh Gradient Formation in Limb Buds

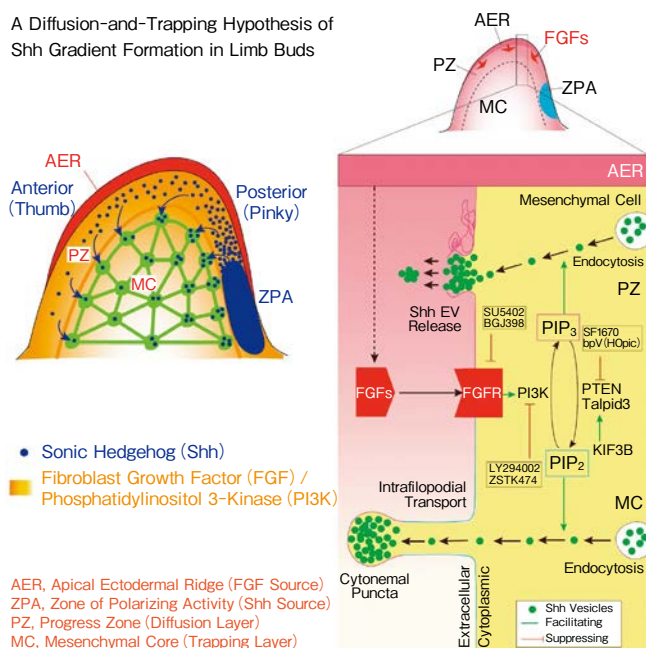


図 6 体肢芽における Shh 濃度勾配形成の新しいモデル

Shh タンパク質の後→前勾配を安定的に形成する 2 層の特殊拡散系の存在が示唆された (図 6)。KIF3B/Talpid3 が支える FGFR/PI3K シグナリングの遠近軸方向の濃度勾配により、間葉細胞にエンドサイトーシスされた Shh 粒子のふるまいが周縁の拡散部と中心の集積部に分化する。この 2 層性の特殊拡散は、1 層性の単純拡散に比して濃度勾配の維持に必須であることが、*3loxP* マウスあるいは FGF8b ビーズ移植マウスの知見から実験的にも示唆された。このようにして、教科書的な体肢芽における互いに直交する濃度勾配のうち、遠→近方向の FGF シグナルの濃度勾配が、後→前方向の Shh の濃度勾配の形成に携わっていること、およびその分子細胞レベルの原理について、遺伝学的ならびに発生学的モデルを用いて初めて提唱することができた。今後、それぞれの拡散定数を多光子顕微鏡により実測することで、濃度勾配形成の 2 層モデルを更に証明していきたい。Shh 含有細胞外小胞は重要な臨床的な意義を持つとされているため、今後この原理を基盤として細胞からの効率的な分泌促進技術を確認し、トランスレーショナルリサーチにも貢献していきたい。

グローバルな体肢芽における 2 層性特殊拡散 (左図) とローカルな細胞生物学的機序 (右図) を整理した。(Wang et al : *Developmental Cell*. 2022 より引用)

**謝辞** キネシンの細胞生物学的な研究を永年にわたって御指導いただいた廣川信隆先生、ならびに共著者の王碩さん、徐璽さん、竹田扇先生に深く感謝申し上げます。また科研費、東京大学 GAP フェンド、AMED 橋渡し研究東大拠点からのサポートにも御礼申し上げます。

## ●文 献

- Chiang C, Litingtung Y, Lee E et al : *Nature*. **383** : 407-413, 1996
- Roelink H, Porter JA, Chiang C et al : *Cell*. **81** : 445-455, 1995
- Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C : *Cell*. **75** : 1401-1416, 1993
- Koyano-Nakagawa N, Gong W, Das S et al : *Nat Commun*. **13** : 4221, 2022
- Wang S, Tanaka Y, Xu Y et al : *Dev Cell*. **57** : 2273-2289.e11, 2022
- Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y : *Neuron*. **68** : 610-638, 2010
- Tanaka Y : The Expanding Universe of Kinesin Superfamily Molecular Motors (KIFs) -The Postmen Who Govern the Country. In *Encyclopedia of Cell Biology* (Second Edition), Bradshaw RA, Hart GW, Stahl PD (eds) : pp101-109, Academic Press, 2023
- Coulter ME, Dorobantu CM, Lodewijk GA et al : *Cell Rep*. **24** : 973-986.e8, 2018