

## なぜ指は5本になるのか？ 体の座標を決める仕組みの解明

### 発表者

王 碩	東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻	特任研究員
田中 庸介	東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻	講師
徐 瓔	東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻	特任研究員(研究当時)
竹田 扇	東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻	准教授(研究当時)
廣川 信隆	東京大学名誉教授／東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻	特任研究員

### 発表のポイント

- 1, 多指症を生じる KIF3B 機能不全マウスを用い、体肢芽におけるソニック・ヘッジホッグ (SHH) タンパク質の濃度勾配の可視化により、指が5本に保たれる仕組みを解明しました。
- 2, SHH 濃度勾配の形成原理を、体肢芽の外周の「走路」と中心部の「砂場」の二層からなる「陸上競技場モデル」で説明しました。機能不全マウスでは Talpid3 タンパク質が運ばれないため中心部の細胞が SHH 粒子をトラップできず、SHH 濃度勾配が保たれず多指症を発症しました。
- 3, 形態形成因子(モルフォゲン)の濃度勾配形成メカニズムは、これまで発生生物学の大きな謎とされていましたが、今回、細胞内で物を運ぶ分子モーターの研究から、画期的な解答がもたらされました。がんや統合失調症の治療や再生医療など、臨床への応用も期待されます。

### 発表概要

ソニック・ヘッジホッグ(SHH)タンパク質は、発生の初期段階において重要な役割を果たす形態形成因子(モルフォゲン)<sup>註1</sup>の一つです。体肢芽や脊髄などにおいて、ある1か所から放出された後、組織内に濃度勾配を形成し、器官のデザインを決定する役割を果たしています。モルフォゲン濃度勾配の形成不全は、多指症をはじめ多くの奇形の原因となります。

東京大学大学院医学系研究科の廣川特任研究員は、細胞内の微小管というレールの上で様々な蛋白質を輸送する分子モーター群、KIFs を発見しその働きを長年にわたり研究してきました。今回、グループの田中庸介講師、王碩特任研究員らが、主要な分子モーターの一つである KIF3B の機能不全マウスを作製したところ、胎児期の四肢の原基である体肢芽において SHH タンパク質の濃度勾配が崩れ、多指症となりました。マウスの胚操作、細胞の初代培養、電子顕微鏡法、蛍光寿命顕微鏡法など、さまざまな実験手法を駆使して SHH タンパク質をめぐる分子群の挙動を解析し、その濃度勾配形成メカニズムの解明に世界ではじめて成功しました。

本研究の成果は「いかにしてモルフォゲンの濃度勾配ができるか」という発生生物学の根源的な課題への一つの回答であり、分子発生生物学の発展に大きく貢献するものです。今回発見した SHH

タンパク質の分泌制御機構は、抗がん剤の開発など、種々の臨床応用も期待されます。

本研究は、科研費(JP23000013、JP16H06372、JP22K06246：廣川)、AMED 融合脳 統合失調症・発達障害プログラム(JP20dm0107084：廣川、田中)、東京大学 GAP ファンド(第8期：田中)、AMED 橋渡し研究シーズ A(JP22ym0126805：田中) の支援により実施されました。

## 発表内容

### 研究の背景

形態形成因子(モルフォゲン)は、発生や再生の初期段階において組織内で濃度勾配を形成し、器官の形態形成を司る生体内物質の総称です。言わば、「形づくりの座標軸」を提供する物質です。中でも SHH タンパク質は、細胞の増殖や分化、四肢の発生、血管新生及び腫瘍形成などに関与する多機能タンパク質として知られ、最も重要なモルフォゲンの一つです。その濃度勾配がいかにして作られるかの解明は、ヒトの体がどのように作られるかという根源的な疑問を解くものであり、モルフォゲンが媒介となる固形がんの治療戦略の開発にも道を開きます。

今回、本研究グループは、分子モーターKIF3B の機能不全マウスの解析から、SHH タンパク質の挙動と FGF<sup>注2</sup>-PI3K<sup>注3</sup> シグナル伝達経路との間の新たな関係を見出し、SHH タンパク質の濃度勾配が形成されるしくみについて、新たな仮説を提唱しました。

### 研究内容

#### 1. 新しい多指症モデルでの SHH タンパク質濃度勾配の消失

細胞の中で物質を輸送するキネシン分子モーター KIF3B の条件付きノックアウトマウス作成の中間段階で、偶然、多指症を示す KIF3B 機能不全マウス(*Kif3b<sup>LacZ/LacZ</sup>* マウス)が生まれました。四肢の親指の近傍に、余分に1本の指が生え、指が合計6本になりました(図1)。

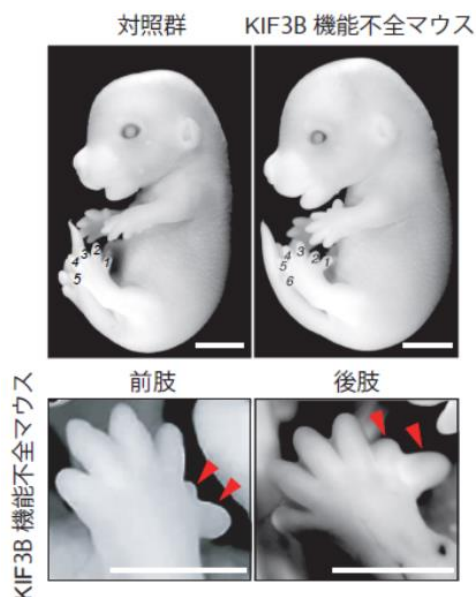


図1：妊娠 14.5 日のマウス胎児。対照群(左上)と KIF3B 機能不全マウス(右上、左下、右下)。前肢(左下)と後肢(右下)の両方において親指が2本生じました(赤矢頭)。スケールバー、3mm。

次に、KIF3B 機能不全マウスの発生初期の前肢の体枝芽を、抗 SHH 抗体で免疫染色した結果、野生型対照群の体枝芽の周縁での小指側から親指側への SHH タンパク質の濃度勾配が、KIF3B 機能不全マウスでは崩れていました(図 2)。SHH タンパク質は体枝芽全体に拡散し、その下流のシグナル伝達が全般的に減弱していました。SHH シグナルは、空間的な波を形成する BMP シグナルと拮抗して、指の本数を最終的に決めています。したがって、これまでの他のモデルマウスで示されたように、この SHH シグナルの減弱は、多指症の形成要因を十分に説明できるものです。

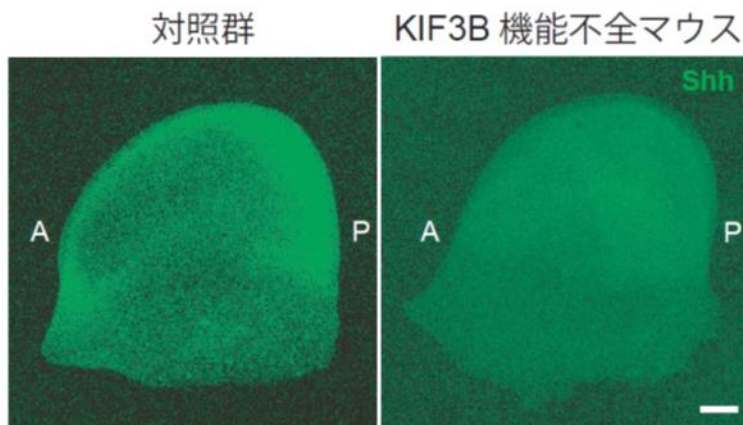


図 2：妊娠 10.5 日の胎児マウスの前肢体枝芽の SHH タンパク質の染色像。対照群の周縁部には小指側(P)から親指側(A)への SHH タンパク質の濃度勾配が存在しますが、KIF3B 機能不全マウスにおいては SHH タンパク質が体枝芽全体に拡散しています。スケールバー、100  $\mu\text{m}$ 。

## 2. SHH タンパク質のふるまいは体枝芽の二層で異なる

体枝芽の切片を作り、抗 SHH 抗体で免疫染色してみました(図 3)。まず、野生型対照群マウスを

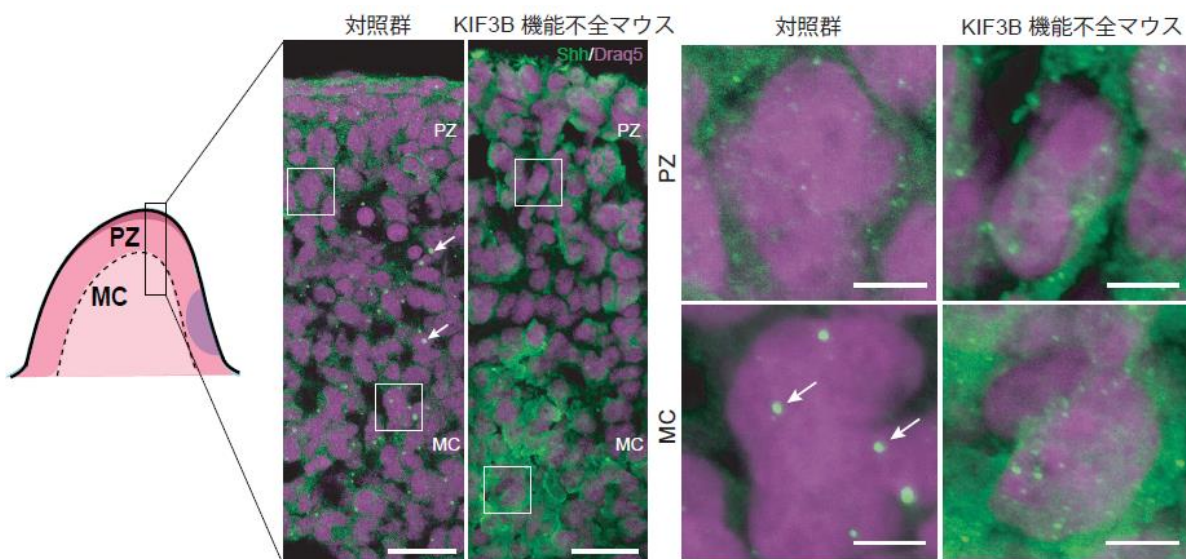


図 3：妊娠 10.5 日の胎児マウスの前肢の体枝芽凍結切片における SHH タンパク質(緑)と細胞核(紫)の染色像。白矢印、SHH タンパク質の集合体。スケールバー、25  $\mu\text{m}$ 。



解析しました。SHH タンパク質は、外縁部の PZ (Progress Zone)領域<sup>注4</sup>では、細胞間に粒子状構造として放出されているにもかかわらず、体枝芽中心部の MC (Mesenchymal Core)領域<sup>注5</sup>では、細胞の表面に集合体として局在していることがわかりました。ところが、KIF3B 機能不全マウスでは、PZ 領域でも MC 領域でも SHH タンパク質は同じように細胞間に粒子状構造として放出されているパターンを示しました。これを電子顕微鏡で観察すると、野生型 MC 領域では細胞膜によって被覆された小粒子の集合体が多数観察されましたが、野生型 PZ 領域や、機能不全マウスの MC と PZ 領域では、被覆がはじけて細胞間に小粒子が放出されている像が観察されました(図4)。

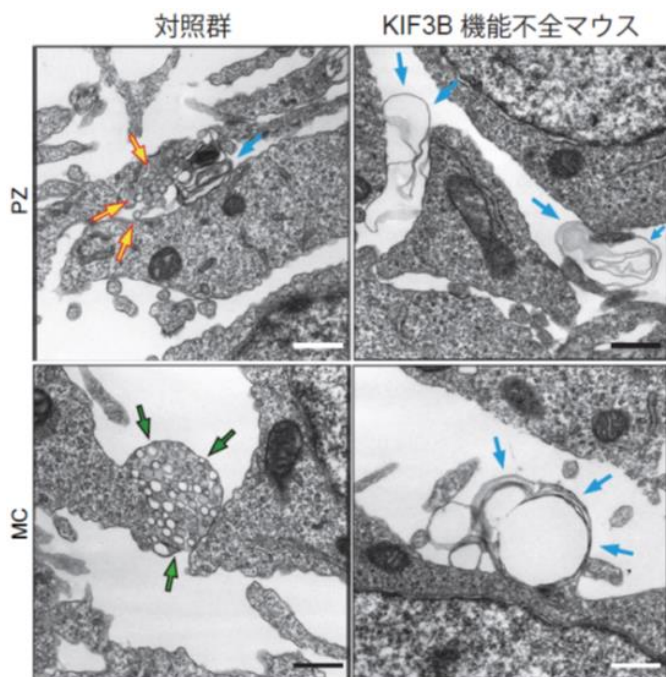


図4：体枝芽の電子顕微鏡像。野生型の対照群の MC 領域では認められる細胞膜にくるまれた小粒子の集合体が、PZ 領域では膜がはじけて放出されています。KIF3B 機能不全マウスでは、MC 領域でも PZ 領域でも膜がはじけて放出されています。これらの集合体への SHH タンパク質の局在を免疫電顕で確認しています。スケールバー、500 nm。

### 3. KIF3B による酵素の輸送によって体枝芽の二層が定まる

そこで、この SHH タンパク質の異なったふるまいの原因となる細胞のシグナル伝達の変化について、さらに解明を進めました。もし、野生型の対照群マウスで周縁部が中心部よりも強く、KIF3B 機能欠損マウスではその差が消失するシグナル伝達経路があれば、この SHH タンパク質の挙動の変化を説明できるはずですが、実際、体枝芽の周縁部の AER (Apical Ectodermal Ridge)領域<sup>注6</sup>から線維芽細胞成長因子(FGFs) が分泌されて中心に向かって薄くなっていき、FGF が FGF レセプターに結合すると細胞内で PI3K シグナルが活性化するということがよく知られていました。そこで PI3K シグナルのマーカーであるリン酸化 Akt (pAkt) で体枝芽の組織を染色してみると、これがまさにシグナルの本態でした。野生型マウスでは pAkt は体枝芽の周縁部にのみ強く染色されましたが、KIF3B 機能不全マウスでは中心部も周縁部も同じように pAkt の発現が強く染色されました。そこで、SHH 遺伝子を発現させた細胞において、阻害剤や賦活薬を用いて PI3K シグナル伝達の強度を人為的に変化させてみると、PI3K シグナルが上昇すると SHH タンパク質は細胞外小胞として分泌され、低下すると今度は細胞突起(サイトネーム)内へと輸送され、そこに蓄積すると

ということがわかりました。

さらに、個体レベルの胚操作実験でもこの現象は再現されました。本来周縁部だけに多く発現しているはずの FGF をアクリルビーズにしみこませ、野生型の胚の体枝芽の中心部に埋め込み4時間にわたり全胚培養してみると、KIF3B 機能不全マウスと全く同じように、中心部の細胞表面の SHH タンパク質の集合体が消失し、体枝芽全体に SHH タンパク質が拡散しました。逆に、野生型の胚を FGF レセプター阻害剤で処理すると、周縁領域にも中心部と同じような SHH タンパク質の集合体が出現しました。これらの結果は、PI3K シグナリングの強弱が、細胞がとりこんだ SHH タンパク質をすぐ細胞外に放出するのか、あるいは集合体にとりこむのかという違いをもたらすのだということを薬理的に示しています。

ここで、KIF3B が体枝芽の中心領域で PI3K シグナリングを減弱させている分子メカニズムとして、KIF3B が PI3K シグナリングを終結させる酵素である Talpid3 タンパク質<sup>注7</sup>を細胞の周縁に運び活性化していることも解明しました。KIF3B と Talpid3 はいずれも統合失調症患者に遺伝子変異が見つかっており、KIF3B のヘテロマウスは当研究グループの以前の知見から、統合失調症様の症状を呈しているため、この KIF3B による Talpid3 の輸送不全によって、統合失調症の分子メカニズムの一部も説明できるかもしれません。

#### 4. SHH タンパク質濃度勾配形成の陸上競技場モデル

以上の結果により、SHH タンパク質の濃度勾配形成の分子メカニズムとして、「陸上競技場」のような体枝芽の二層モデルを提唱しました(図5)。発生初期の体枝芽は、周縁に「走路」があり中心に「砂場」がある半円形のトラックと見なせます。その「走路」の片方の側から一斉に幼児がスタートします。ところが、「砂場」には両親が並んで応援しているので、幼児は両親に走り寄り、「砂場」の中に順次取り込まれていってしまいます。このことにより、幼児の数は「走路」を行くにしたがって減っていきます。これが、濃度勾配形成を説明する陸上競技場モデルです。

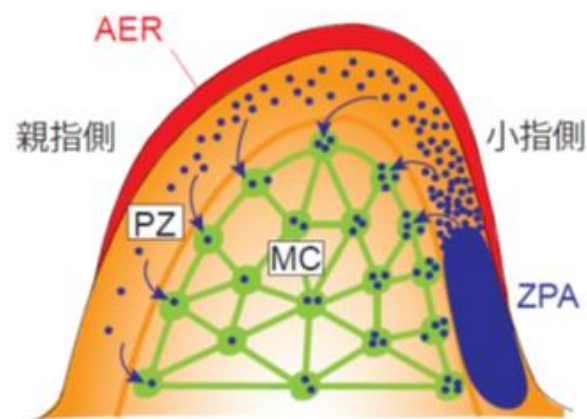


図5：体枝芽における SHH タンパク質濃度勾配形成の陸上競技場モデル。AER 領域からの FGF の分泌により「走路」PZ 領域と「砂場」MC 領域が分化し、小指側の ZPA 領域から分泌される SHH タンパク質を順次トラップして、Diffusion and trapping 原理によって親指側への濃度勾配を形成します。

これを分子のことに置き換えてみましょう。「走路」である PZ 領域においては AER 領域<sup>注7</sup>からの FGF 分泌によって PI3K シグナルが賦活して、SHH タンパク質はいったん細胞にとりこまれてもすぐに細胞外に分泌されやすくなります。このため、SHH タンパク質は細胞間を高速で通過することができます。一方、「砂場」である MC 領域では、位置的にもととの FGF の濃度が低いうえ、PI3K シグナルを終結させる Talpid3 タンパク質の酵素活性によって、PI3K シグナル強度が十分に低くなり、SHH タンパク質を細胞内にトラップするしくみが生じます。この「走路」と「砂場」の相互作用によって、SHH タンパク質が小指側にある ZPA (Zone of Polarizing Activity) 領域<sup>注8</sup>から分泌されて親指側に向かって「走路」を進んでいくうち、路傍の「砂場」に少しずつトラップされて、走路である体肢芽外周における SHH タンパク質濃度が徐々に減っていく、というのがこの二層モデルの骨子です。KIF3B の機能不全マウス胚、あるいは FGF ビーズの移植マウス胚では、中心部で PI3K シグナリングが終結できなくなるので「砂場」であるべき場所も「走路」に変化し、SHH タンパク質がどこにもトラップされず、SHH タンパク質が体肢芽全体に拡散してしまったものと説明できます。

これまでは、体肢芽周縁における SHH タンパク質の「走路」の存在が知られていなかったため、体肢芽の中を SHH タンパク質が単純拡散することで濃度勾配が形成されると漠然と考えられていました(図6)。しかしこの単純拡散モデルでは、どうして体肢芽の外周に SHH タンパク質が強く発現して濃度勾配を形成しているのか、どうして体肢芽が大きくなっても SHH タンパク質の濃度勾配が保たれていくのか、説明できませんでした。そこで今回の研究では「特殊拡散系」の応用に基づく新しい二層モデルを構築し、これらの点をうまく説明できるようになりました。

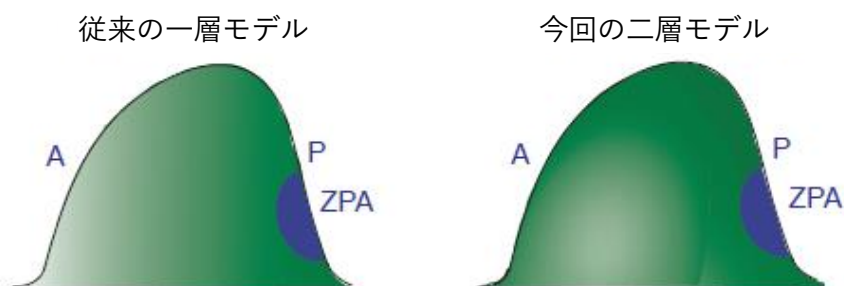


図6: SHH タンパク質の濃度勾配形成のシミュレーション。新たな二層モデルのほうが体肢芽周縁で特に SHH タンパク質の濃度勾配が形成されるという観察結果によく適合しています。

#### 学術的意義

本研究は、発生生物学の永年の疑問である「いかにして SHH タンパク質が濃度勾配を形成するのか」について、体肢芽の二層モデルを提唱し、クリアカットな解答を与えることができました。これまで発生生物学の分野では分子細胞レベルの解析が遅れていましたが、キネシンスーパーファミリー分子モーターの分子遺伝学的研究の新しい展開から、このような発生生物学の根本原理の一

つにまでたどり着いた、非常に意義深い学際的発見です。この発見を記念して、本論文が収録される *Developmental Cell* 誌 10 月 10 日号の表紙を 6 本指の胎児の写真が飾りました。

### 社会的意義

SHH タンパク質は細胞を増殖させ、固形がんの悪化や組織の再生などにかかわることが知られています。このことから、今回発見した KIF3B 依存的な SHH タンパク質の分泌制御メカニズムは、新たな抗がん剤や再生医療のシーズとして応用が期待されます。また Talpid3 と KIF3B はいずれも統合失調症に関連する遺伝子であり、この発見は精神疾患の分子メカニズム解明にも道を開きます。

### 発表雑誌

雑誌名：*Developmental Cell* 2022 年 10 月 10 日号

論文タイトル：KIF3B promotes a PI3K signaling gradient causing changes in a Shh protein gradient and suppressing polydactyly in mice

著者：Shuo Wang †, Yosuke Tanaka †, Ying Xu, Sen Takeda, and Nobutaka Hirokawa († Equal contribution)

DOI 番号：<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.09.007>

### 問い合わせ先

東京大学名誉教授

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 特任研究員

廣川 信隆(ひろかわ のぶたか)

TEL: 03-5841-3326

E-mail: [hirokawa@m.u-tokyo.ac.jp](mailto:hirokawa@m.u-tokyo.ac.jp)

### 用語解説

注1 形態形成因子(モルフォゲン)

発生、変態、再生の際、体の一部の発生源から組織の中に分泌されて濃度勾配を形成する物質で、その濃度が組織の中の「座標」となり、組織や個体の形態形成を助けています。SHH (ソニック・ヘッジホッグ)タンパク質は代表的なモルフォゲンのひとつで、体肢芽における指のパターニングのほか、神経管を腹側化して運動神経と感覚神経を分化させます。

注2 FGF

Fibroblast Growth Factor の略で、線維芽細胞増殖因子と訳され、血管新生、創傷治癒、胚発生に関係する成長因子の一種です。

### 注3 PI3K シグナル伝達

タンパク質合成、細胞増殖、細胞生存などの基本的な細胞プロセスに關与するシグナル伝達経路の一つです。ホルモン、成長因子および細胞外基質(ECM)などが、受容体チロシンキナーゼ、Gタンパク質共役受容体、サイトカイン受容体などに結合して活性化され、活性脂質であるホスファチジルイノシトール-3-リン酸(PIP<sub>3</sub>)を媒介として、Aktタンパク質をリン酸化して活性化し、細胞内にシグナルを伝えます。

### 注4 Progress Zone (PZ) 領域

進行帯とも訳され、発生中の体肢芽において外胚葉性頂堤のすぐ下にある、周縁部の間葉細胞の層です。

### 注5 Mesenchymal Core (MC) 領域

発生中の体肢芽の中心部の間葉細胞の集合体です。のちに、この層に手の骨ができます。

### 注6 AER 領域

Apical Ectodermal Ridge の略で、外胚葉性頂堤と訳されます。発生中の体肢芽の外縁部にある層でFGFを分泌し、そのすぐ下にある間葉細胞をPZとして分化させ、手足の延長を支えます。

### 注7 Talpid3 タンパク質

ニワトリにおいて最初に同定されたタンパク質で、細胞の線毛の基部や細胞周縁部などに局在します。Talpid3タンパク質が欠損したマウスは、線毛形成不全、多指症、水頭症及び末梢神経障害などの多様な表現型を示します。今回、研究グループはTalpid3タンパク質に、PI3Kシグナリングを終結させるPTEN様のPIP<sub>3</sub>脱リン酸化活性をはじめて同定しました。

### 注8 ZPA 領域

Zone of Polarizing Activity の略で、極性化活性域と訳されます。ヒトやマウス胎児の体肢芽の小指側に定められ、SHHタンパク質の特異的な産生部位として知られています。