

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

Endothelin-1-mediated subtype-specific intracellular sorting and signaling of endothelin receptor type A regulate craniofacial morphogenesis.

(エンドセリン-1によってもたらされるエンドセリン A 型受容体のサブタイプ特異的な細胞内動態とシグナル伝達が顎顔面の形態形成を制御する)

氏名 藤澤 興

エンドセリン-1 (Edn1) は血管内皮細胞の培養上清より血管収縮活性を指標に分離精製された 21 アミノ酸からなる環状ペプチドである。Edn1 の生理活性は血管収縮能のみにとどまらず、血管平滑筋細胞の増殖促進や癌細胞の転移浸潤など多岐に渡る。エンドセリンシステムは 3 種類のリガンド (Edn1,2,3) と 2 種類の G タンパク質共役型受容体 (エンドセリン A 型受容体 (Ednra) 、B 型受容体 (Ednrb) ) からなる。これら遺伝子のノックアウトマウスの表現型から、エンドセリンシステムは胚発生における神経堤細胞の増殖・分化に必須の役割を果たすことが明らかにされてきた。このうち Edn1/Ednra は頭部神経堤細胞に由来する顎顔面・頸部骨格や心臓・頸部大血管の形態形成を制御していることが知られている。

我々哺乳類を含む顎口類の顎は上顎骨・下顎骨と呼ばれる上下非対称な骨格構造が上下に接続された顎関節を有する。上顎骨・下顎骨はいずれも神経管菱脳部から第一咽頭弓内に遊走する Ednra 陽性の神経堤細胞に由来するが、第一咽頭弓の腹側領域 (下顎弓、すなわち将来下顎骨が形成される領域) では Edn1 が発現しており、Ednra を介してホメオボックス転写因子 Dlx5/6 や Hand1/2 を始めとする下顎特異的な遺伝子群の発現を誘導する。Edn1 あるいは Ednra のノックアウトマウスはこれら遺伝子の発現が減弱もしくは消失し、本来下顎に形成されるべき下顎骨が上顎骨様の形態に置換されたホメオティック変異を呈する。逆に、Ednra 遺伝子座に Edn1 遺伝子をノックインし、上・下顎で Edn1/Ednra の両方が発現するように遺伝子改変されたマウスでは、本来上顎に形成されるべき上顎骨が下顎骨様の形態に置換される。これらの知見から、Edn1/Ednra シグナルは上・下顎の領域決定を行う分子スイッチの役割を担うと考えられている。

これまで G タンパク質共役型受容体(GPCR)に属する Edn1 受容体である Ednra は、低分子量 G タンパク質の一種である  $G\alpha_{q/11}$  を介して下顎特異的な遺伝子群の発現を誘導することが明らかにされてきたが、詳細な分子メカニズムは一切が不明であった。私が所属する研究室では Ednra 遺伝子座に Ednra もしくは Ednrb の cDNA をノックインしたマウスを作成し、Ednra のノックインは Ednra ノックアウトの表現型 (下顎の上顎化) を完全にレスキューするのに

対して、Ednrb のノックインでは変異した下顎はほとんど正常化しないことを報告してきた。これら二種類の受容体はいずれも Edn1 をリガンドとして認識しうるにも関わらず、顎顔面の形態形成における両者の働きが大きく異なることから、私は Ednrb が持たない Ednra の特異的な機能を明らかにすることが、Ednra 下流の分子メカニズムを明らかにする大きな手がかりになると考え、以下の実験を行った。

まず、顎顔面の形態形成において必要な Ednra のアミノ酸配列部位を明らかにするため、Ednra との相同性が特に乏しい Ednrb の細胞質内ループ（第二、第三、C 末端領域）をそれぞれ Ednra に置換した三種類のキメラ受容体を作製した。これらの cDNA を Ednra 遺伝子座にノックインしたマウスを作製し表現型を Ednrb ノックインマウスと比較したところ、第二、第三細胞質内ループを置換した受容体では表現型の変化が観察されないのに対して、細胞質内 C 末端を置換した受容体では Ednrb ノックインマウスに比べて表現型が大幅に正常化した。この所見はマウスの顎顔面の解剖学的な形態所見に加えて、下顎特異的な遺伝子発現 (Dlx5/6, Hand2, Pitx1) の発現レベルが下顎で回復していることもマウス胚の whole mount in situ hybridization によって確認された。これらの結果から、Ednra の細胞質内 C 末端が顎顔面の正常なパターンニングに必要なサブタイプ特異的ドメインであることが明らかとなった。

そこで、細胞質内 C 末端が Ednra にサブタイプ特異的性質を与える分子メカニズムを明らかにするため、Ednra、Ednrb および Ednrb の細胞質 C 末端を Ednra に置換したキメラ受容体 (Cter) を培養細胞に過剰発現させ性質の比較を行った。まず、Edn1 添加後の細胞質内のカルシウム濃度上昇、ERK のリン酸化、血清応答配列 (SRE) の転写活性化は Ednra, Ednrb, Cter の各受容体間で有意な差は観察されず、 $G\alpha_{q/11}$  を始めとする低分子量 G タンパク質によって活性化されるシグナル伝達の初期応答に関しては受容体間のサブタイプ特異性は存在しないと考えられた。

次に、Ednra, Ednrb, Cter 各受容体の細胞質末端に EGFP を融合した cDNA を作成して培養細胞に過剰発現させ、受容体の総発現量を EGFP の発現量で、膜表面に発現する受容体量を細胞膜表面タンパク質に特異的なビオチン標識でそれぞれ調べることで、Edn1 添加後の受容体の細胞質内動態について経時変化を比較した。Ednra は Edn1 添加後も総発現量、細胞膜表面上の発現量ともにほとんど一定を保ったが、エンドソームの細胞膜表面へのリサイクルを阻害する薬剤であるプリマキンを追加すると細胞膜表面の発現量が顕著に減少した。一方、Ednrb は Edn1 添加によって総発現量、細胞膜表面の発現量が大きく減少したが、細胞質内の受容体の分解を担うリソソームの阻害剤であるクロロキン、もしくはダイナミンの活性を阻害し受容体の細胞質内移行を阻害するダイナソアをそれぞれ追加することでこれらの減少は抑制された。以上の結果から、Ednra はリガンド結合後に初期エンドソームに取り込まれた後細胞膜表面にリサイクルされるのに対して、Ednrb は細胞膜表面にリサイクルされずリソソームに取り込まれ加水分解されることが示唆された。さらに Cter はリガンド結合によって細胞膜表面の発現量は顕著に減少するものの、総発現量は一定を保ったことから、Ednrb 同様に細胞膜表面にリサイクルはされないものの、リソソームでの

分解はほとんど受けないことが示唆された。

さらに、Edn1 添加による受容体のリン酸化を比較したところ、Ednrb は Ednra や Cter と比較してセリン残基が強くリン酸化されることが明らかになった。そこで Ednrb の細胞質 C 末端のセリン残基をアラニン残基に置換した変異受容体を作製したところ、ほとんどリン酸化されない変異体を得られ、さらにこの受容体は Edn1 刺激による分解は抑制されていたことから、Ednrb の細胞質 C 末端のサブタイプ特異的なリン酸化が Edn1 刺激後の受容体の分解を引き起こしていることが示唆された。

最後に、Cter は Edn1 刺激後 Ednrb 同様に膜表面にリサイクルされないにも関わらず、ノックインマウスでは Ednrb に比較して大幅に表現型が正常化したことから、Edn1 刺激後に細胞質内に取り込まれた受容体がエンドソームに運ばれることが受容体のシグナル伝達にとって重要なのではないかと考え、ダイナソアを用いて受容体の細胞質内以降を阻害した時に下流のシグナル伝達がどのような影響を受けるのか調べた。Ednra を過剰発現させた培養細胞に Edn1 を添加すると ERK のリン酸化、SRE の転写活性化が引き起こされるが、ダイナソアの添加によってこれらは抑制された。さらに whole embryo culture を用いて 9.5 日胚マウスにダイナソアを添加して培養すると Edn1/Ednra シグナルの下流遺伝子である Dlx6 の発現が抑制された。これらの結果から、Ednra の細胞質内移行が下流のシグナル伝達に必要であることが示唆された。

以上の結果から、Ednra の細胞質 C 末端は顎顔面の形態形成において下流のシグナル伝達に必要なサブタイプ特異的なドメインであることが明らかになった。さらに、Edn1 添加後の Ednra の細胞質内移行と、その後の膜表面へのリサイクリングが下流のシグナル伝達に重要であることが明らかになった。