

胚発生過程における新規ヘパラン硫酸クラスターの機能 Role of Novel Heparan Sulfate Clusters in Embryonic Development

(日本動物学会推薦)

代表研究者 東京学芸大学 (採択時・東京大学)
Tokyo Gakugei University (Univ. of Tokyo)

山元 孝佳
Takayoshi YAMAMOTO

During embryonic development, secreted signaling proteins, known as morphogens, form extracellular gradients that provide positional information and regulate tissue patterning. Although heparan sulfate has been implicated in morphogen distribution, the functional significance of distinct heparan sulfate modification patterns in vivo remains poorly understood. In this study, we investigated roles of novel heparan sulfate clusters in the regulation of extracellular morphogen dynamics during early embryonic development. We focused on N-acetylated and N-sulfonated heparan sulfate clusters, which differ in their spatial organization, ligand-binding properties, and internalization dynamics. By analyzing secreted factors involved in early patterning, we found that several organizer-derived molecules exhibit distinct binding preferences for heparan sulfate modifications, including N-acetylated clusters. We also identified N-acetylated heparan sulfate-binding motifs. To examine the functional significance of these interactions, we established experimental systems in *Xenopus* embryos to manipulate membrane-binding behavior of secreted factors, and found that these manipulations altered morphogen-dependent gene expression. In addition, we found that alternative splicing of a secreted BMP-regulating factor alters its extracellular distribution, possibly by changing its binding properties to specific heparan sulfate clusters, and may contribute to functional diversification. Together, these results suggest that heparan sulfate clusters function as dynamic extracellular regulators that coordinate morphogen distribution, cellular uptake, and signaling during embryonic development.

研究目的

1つの細胞である受精卵から、どのようにして複雑で精緻なからだ形成されるのか——これは生命科学における根源的な問いの1つである。発生過程では、Wnt、BMP、FGF等のモルフォゲンと呼ばれる分泌性タンパク質が胚の局所から放出され、細胞外を移動しながら濃度勾配を形成し、その濃度に応じた細胞分化を誘導する。したがって、適切な濃度勾配形成は、空間的なパターンを持った組織構造を生み出す上で極めて重要である。

しかし生体内では、モルフォゲンの単純拡散だけでは説明できない形態形成の例も多く、その分布制御機構の理解は未だ十分ではない。例えばアフリカツメガエル胚の神経胚期において、外胚葉は神経板、神経堤、予定プラコード、表皮に分かれ、さらにそれぞれの領域が複雑な空間パターンを形成する。こ

れらの領域の特定化には Wnt、BMP、FGF等の複数のモルフォゲンが関与する。また、WntやFGFについては、分泌源に近い領域で低いシグナル活性が要求される一方、より遠い領域で高いシグナル活性が必要となる例も報告されており、単純な濃度勾配モデルだけでは説明しにくい現象が存在する (Saint-Jeannet and Moody, 2014; Freter et al., 2008 等)。

我々はこの問題に対し、細胞外でモルフォゲンと結合する糖鎖であるヘパラン硫酸に着目してきた (Yamamoto et al., 2022, 2023a,b 等)。ヘパラン硫酸には様々な修飾パターンが存在する。そのうち、N-acetyl修飾とN-sulfo修飾は細胞膜上に異なるクラスターを形成し、それぞれに結合する分泌性因子が異なること、また細胞内への取り込み頻度が異なることを明らかにしてきた (Mii, Yamamoto (co-first) et al., 2017)。従来の生化学的解析からは、1本のヘパラン

硫酸糖鎖上に複数の修飾がパッチ状に存在すると考えられてきたが、我々の解析は、生体内では個々の糖鎖ごとに異なる修飾状態が形成されている可能性を示している。

一方で、ヘパラン硫酸修飾を特異的に認識する抗体は限られており、胚内における修飾パターン空間分布や、その生物学的意義はほとんど明らかにされていない。そこで我々は、ヘパラン硫酸修飾酵素の発現パターンを *in situ hybridization* 法により解析した結果、アフリカツメガエル神経胚において、複数の修飾酵素が一樣ではなく、モザイク状の発現パターンを示すことを明らかにした (Yamamoto et al., 2023a,b)。従来、ヘパラン硫酸修飾は胚内で比較的均一に存在することを前提としてモルフォゲン分布制御が議論されてきた。しかし、これらの結果は、胚内におけるヘパラン硫酸修飾の空間的不均一性が、モルフォゲン分布やシグナル活性の局所的制御に関与する可能性を示している。

そこで本研究では、ヘパラン硫酸を介したモルフォゲン制御メカニズムを明らかにするため、ヘパラン硫酸修飾の違いが、分泌性因子の細胞外分布、細胞内取り込み、およびモルフォゲン依存的シグナル経路の活性にどのような影響を与えるのかを解析した。特に、N-acetyl 修飾に結合する分泌性因子に注目し、分泌性因子のヘパラン硫酸結合性とシグナル制御機能との関係を明らかにすることを目的とした。

研究経過

本研究ではまず、発生初期胚において分泌され、形態形成に関与する複数の分泌性因子について、ヘパラン硫酸修飾に対する結合性を比較した。特に、オーガナイザー領域から分泌され、従来は類似した機能を持つと考えられてきた複数の分子群に注目した。

オーガナイザーは、1924年にシュペーマンとマンゴールドによって発見された、発生生物学上極めて重要な胚領域である。この領域は原腸胚期に形成され、移植実験により二次軸を誘導する能力を持つことが知られている。その後の分子生物学的研究により、オーガナイザーからは BMP を抑制する複数の分泌性因子が産生され、背腹軸形成や神経誘導に重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。

本研究では、これらの分泌性因子のヘパラン硫酸結合性を比較した。その結果、オーガナイザー由来

の分泌性因子は一樣にヘパラン硫酸へ結合するのではなく、N-acetyl 修飾に対する結合性に明確な違いを示すことが分かった。さらに、N-acetyl 修飾に特異的に結合する複数の分泌性因子を同定し、その結合に関与すると考えられる配列上の特徴を見出した。これらの成果は、プレプリントとして発表した (Yamamoto et al., 2025)。

次に、N-acetyl 修飾への結合性が、分泌性因子の胚内分布や機能にどのような影響を与えるのかを検討した。Mii, Yamamoto (co-first) et al. (2017) では、N-acetyl 修飾クラスターに結合する分子は細胞内への取り込み頻度が低く、細胞外で広い分布範囲を示す一方、N-sulfo 修飾クラスターに結合する分子は細胞内への取り込み頻度が高く、比較的限局した分布を示すことが観察されていた。すなわち、分泌性因子の分布範囲は、単なる拡散性だけでなく、どのヘパラン硫酸修飾クラスターに結合し、どの程度細胞内に取り込まれるかによって制御される可能性が示されていた。しかし、N-acetyl 修飾への結合が、それ自体として分泌性因子の分布範囲を広げるのか、あるいは細胞内取り込み頻度や細胞外滞留時間を介して間接的に分布に影響するのかは明らかではなかった。

そこで、理論的な検討および数理シミュレーション (反応拡散モデル) を用いて、ヘパラン硫酸結合性、細胞外拡散、細胞内取り込み頻度の関係を解析した。その結果、N-acetyl 修飾への結合は、観察時点における分布範囲に影響を及ぼし得る一方で、単純に「N-acetyl 修飾に結合すれば分布範囲が広がる」という関係では説明できないことが示唆された。すなわち、ヘパラン硫酸への結合は、分子の空間的な広がりだけでなく、細胞外に滞留する時間、細胞内に取り込まれる頻度、受容体近傍に存在する有効濃度などを複合的に変化させている可能性が考えられた。

これを検証するため、アフリカツメガエル胚を用いたモルフォゲン動態解析の研究環境を整備した。具体的には、胚への mRNA 導入、分泌性因子の局在解析、標的遺伝子発現の解析を組み合わせることで、分泌性因子の膜近傍への滞留や細胞内取り込み頻度を操作・評価できる実験系の構築を進めた。特に、通常は細胞外を拡散する分泌性因子について、その細胞膜近傍への保持状態を人工的に変化させる実験系を確立した。

この解析から、モルフォゲンと結合し、その活性

を抑制すると考えられてきた拡散性の分泌因子であっても、ヘパラン硫酸等を介して細胞膜近傍に保持されるかどうかによって、モルフォゲン依存的な標的遺伝子発現に変化が認められた。また BMP 結合性を持つ分泌性因子の1つには、アフリカツメガエルにおいて複数のスプライシングバリエントを持つものが存在することをクローニングにより発見した。これらのバリエントは大部分の配列を共有しているものの、少なくとも細胞外における分布様式が異なることが明らかになった。すなわち、同一遺伝子に由来する分泌性因子であっても、スプライシングの違いによって細胞外での局在や拡散性が変化し得ることが示唆された。さらに、二次軸誘導能を評価するため、腹側赤道面に mRNA を導入したところ、一方のバリエントでは二次軸様構造の誘導が認められる一方、別のバリエントでは同様の効果が認められないという結果を得ている。したがって、スプライシングバリエント間の細胞外分布様式の違いが、BMP シグナル制御能の違いに結びついている可能性がある。現在、この機能差が BMP との結合性、ヘパラン硫酸修飾への結合性、細胞外滞留時間、あるいは細胞内取り込み頻度の違いに由来するのかについて、解析を進めている。

以上の結果から、本研究により、ヘパラン硫酸修飾の違いが分泌性因子の局在や取り込みを変化させるだけでなく、モルフォゲン依存的シグナル経路の強度を制御し得る可能性が示された。未発表データを含むため、本報告書では詳細な分子名、実験条件、および分子機構の一部については記載を控えたが、本研究で得られた成果は、複数の分泌性因子がなぜ胚内に存在するのか、またそれらがどのように協調してモルフォゲン勾配を形成するのかを理解する上で、新たな視点を与えるものである。

考察

本研究により、ヘパラン硫酸修飾はモルフォゲンの単なる細胞外足場ではなく、分泌性因子の細胞外分布、細胞膜近傍での存在状態、細胞内取り込み、およびシグナル出力を結びつける動的な制御因子として機能する可能性が示された。

また、発生過程では、類似した経路に関与する複数の分泌性因子が同時にはたらくことが多い。本研究の結果は、これらの分子が単に重複した機能を持つのではなく、細胞外分布やヘパラン硫酸結合性の

違いを通じて、それぞれ異なる作用範囲や作用時間を担っている可能性を示している。したがって、ヘパラン硫酸修飾を介した分泌性因子の制御は、発生過程におけるモルフォゲン勾配形成の柔軟性と精密性を支える重要な要素であると考えられる。さらに、本研究で見出されたスプライシングバリエント間の細胞外分布様式の違いは、分泌性因子の機能的多様性が、遺伝子数の増加だけでなく、同一遺伝子から生じるアイソフォームの違いによっても生み出される可能性を示している。

本研究で得られた知見は、発生生物学における基本問題である「どのようにして限られた種類のシグナル分子から複雑な組織パターンが形成されるのか」という問いに対し、細胞外糖鎖修飾を介した新たな制御原理を提示するものである。また、モルフォゲンシグナルの空間的・時間的制御機構の理解は、将来的には細胞外環境を介した分化誘導条件の設計により、幹細胞分化制御や再生医療における組織パターン形成技術の基盤的知見にもつながると期待される。

本助成は、本研究の推進に加え、独立した研究室の立ち上げ、研究環境の整備、学生の主体的な研究活動を支える基盤の構築において、極めて大きな支えとなった。この場を借りて深く感謝申し上げる。

参考資料

1. Freter, S., Muta, Y., Mak, S. S., Rinkwitz, S., & Ladher, R. K. (2008). Progressive restriction of otic fate: The role of FGF and Wnt in resolving inner ear potential. *Development*, 135(20), 3415–3424.
2. Mii, Y., Yamamoto, T., Takada, R., Mizumoto, S., Matsuyama, M., Yamada, S., Takada, S., & Taira, M. (2017). Roles of two types of heparan sulfate clusters in Wnt distribution and signaling in *Xenopus*. *Nature Communications*, 8, 1973.
3. Saint-Jeannet, J.-P., & Moody, S. A. (2014). Establishing the pre-placodal region and breaking it into placodes with distinct identities. *Developmental Biology*, 389(1), 13–27.
4. Yamamoto, T., Kambayashi, Y., Otsuka, Y., Afouda, B. A., Giuraniuc, C., Michiue, T., & Hoppler, S. (2022). Positive feedback regulation of *frizzled-7* expression robustly shapes a steep Wnt gradient in *Xenopus* heart development, together with sFRP1 and heparan

sulfate. *eLife*, 11, e73818.

5. Yamamoto, T., Kambayashi, Y., Tsukano, K., & Michiue, T. (2023a). Ndst1, a heparan sulfate modification enzyme, regulates neuroectodermal patterning by enhancing Wnt signaling in *Xenopus*. *Development, Growth & Differentiation*, 65(3), 153-160.
6. Yamamoto, T., Kaneshima, T., Tsukano, K., & Michiue, T. (2023b). The heparan sulfate modification enzyme, Hs6st1, governs *Xenopus* neuroectodermal patterning by regulating distributions of Fgf and Noggin. *Developmental Biology*, 496, 87-94.

研究の発表

口頭発表

1. 山元孝佳, 道上達男
「カエル胚とシミュレーションで明らかにする、モルフォゲン分布制御機構の根本原理」
日本動物学会第95回長崎大会, 2024年9月.
2. 道上達男, 山元孝佳, 浅沼大樹, 小川真生, 金島時
「ツメガエル胚の神経堤形成における力依存的な細胞内シグナリングの制御」
日本動物学会第95回長崎大会, 2024年9月.
3. Tatsuo Michiue, Takayoshi Yamamoto
“The Involvement of Mechanical Force in Ectoderm Patterning of *Xenopus* Embryo”
Spemann-Mangold Centennial Symposium 2024, 2024年9月.
4. 山本実季, 小谷崇博, 宮田悠生, 坪山洋介, 山元孝佳, 道上達男, 岡嶋孝治
「原子間力顕微鏡によるアフリカツメガエル初

期発生胚の力学測定」

日本顕微鏡学会 SPM 研究会 2023, 2024年2月21日.

誌上発表

1. Yamamoto, M., Yamamoto, T., Kotani, T., Miyata, Y., Michiue, T., & Okajima, T. (2025). Mapping single-cell mechanics in the early embryogenesis of *Xenopus laevis* using atomic force microscopy. *Development, Growth & Differentiation*. 67(9), 531-538.
2. Kim, S., Horikawa, A., Yamamoto, T., & Michiue, T. (2025). Tension-induced enhancement of *SIX1* expression during preplacodal ectoderm differentiation from human induced pluripotent stem cells. *The International Journal of Developmental Biology*, 69(2), 61-69.
3. Yamamoto, T., Mii, Y., Saiga, H., Michiue, T., & Taira, M. (2025). Identification of N-acetyl-rich heparan sulfate binding motifs and their role in expanding BMP distribution and signaling by Cerberus. *bioRxiv*.
4. Horikawa, A., Tsuda, K., Yamamoto, T., & Michiue, T. (2024). Evaluation of pancreatic β -cell differentiation efficiency of human iPSC lines for clinical use. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 19(11), 1449-1460.
5. Kaneshima, T., Ogawa, M., Yamamoto, T., Tsuboyama, Y., Miyata, Y., Kotani, T., Okajima, T., & Michiue, T. (2024). Enhancement of neural crest formation by mechanical force in *Xenopus* development. *The International Journal of Developmental Biology*, 68(1), 25-37.