

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657159

研究課題名(和文)非対称分裂を制御するWnt分子の時空間的制御を明らかにする

研究課題名(英文)Analysis of spatiotemporal patterning of WNT proteins that regulate asymmetric patterning

研究代表者

伊原 伸治 (Ihara, Shinji)

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・助教

研究者番号：70373272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：Wnt分子はアミノ酸配列から親水性の性質をもつことが想定される。しかし、実際には強い疎水性を示し、細胞外マトリックスに結合する傾向が非常に強い。申請課題では、線虫*C. elegans*の非対称細胞分裂をモデルとして、多色蛍光タンパク質をもちいた可視化技術による3次元構築を行うことにより、生体内でのWnt分子と細胞外マトリックスの経時的な局在変化を明らかにすることに取り組む。研究成果として、多色蛍光タンパク質を用いて細胞外マトリックスである基底膜とWNT分子の可視化を行うことができた。

研究成果の概要(英文)：It is assumed that WNT proteins show hydrophilic character based on amino acid sequence. However, these proteins are highly hydrophobic due to adding the lipid and stick tightly to cell membrane and extracellular matrix. To understand spatiotemporal patterning of WNT proteins and extracellular matrix, we use asymmetric division which are regulated by WNT as a model system in *C. elegans*. We have obtained some results about visualization of WNT molecule and extracellular matrix in vivo.

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：細胞分化

キーワード：WNT 非対称分裂 可視化

## 1. 研究開始当初の背景

非対称分裂は、細胞の多様性を生み出す重要な基本機構の一つである。申請課題を研究する前年に、私の所属する研究室は、Wnt分子が微小管の非対称を調節して、細胞分裂の非対称性を制御していることを明らかにした (Sugioka, K., *et al.*, *Cell* 2011)。また我々は、非対称性の分裂を制御するWnt分子が冗長性を持って、非対称分裂を制御していることを報告した (Yamamoto, Y., *et al.*, *PLoS Genetics* 2011)。しかしながら、細胞外におけるWnt分子の局在、そしてWnt分子が細胞にどのように作用するのか?つまり細胞外におけるWnt分子の挙動は不明のままである。その主たる理由は、*in vivo*においてWnt分子と細胞外マトリックス (基底膜) の可視化が難しいため、*in vivo*において時間軸に沿ったWnt分子の挙動を観察できなかったためである。

私は、線虫*C. elegans*を用いて基底膜を可視化することが出来るモデルを2011年に報告した (Ihara, S., *et al.*, *Nature Cell Biology*)。この実験モデルを用いて、まずWnt分子と細胞外マトリックス (基底膜) の経時的な局在変化を高い時間分解能を用いて観察を行う。つぎに、どのような因子 (翻訳後修飾等) がWnt分子の局在決定、それに伴う非対称分裂の制御にどのように関わるのか?明らかにする。

## 2. 研究の目的

Wnt分子は、多細胞生物でよく保存された分泌性の細胞間シグナル分子である。アミノ酸配列上では親水性のタンパク質分子であることが予想されるが、実際には疎水性を示し分泌型のタンパク質である。現在までに翻訳後修飾により疎水性が亢進することが分かっており、細胞外マトリックスに強く結合する性質を示すことが明らかになっている。近年、Wnt分子が細胞の非対称分裂を制御することが明らかになったが、細胞外でWnt分

子がどのように局在して、非対称分裂を制御するのか?まったくの不明である。申請課題では、線虫*C. elegans*の非対称細胞分裂をモデルとして、下記の研究課題に取り組む。

- (1) 3次元構築により生体内のWnt分子と細胞外マトリックスの経時的な局在変化を明らかにする。
- (2) Wnt分子の局在決定と非対称分裂に関与する因子を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 分子イメージング技術を用いた Wnt 分子と基底膜の可視化及び動態解析

現在までに、緑色、赤色蛍光タンパク質を用いて、基底膜の主要構成成分の可視化には成功している。これらの蛍光タンパク質と融合した基底膜蛋白質が基底膜に正常に局在することも確認した。平成 24 年度は、更に進展させて、主要構成成分以外の基底膜蛋白質の可視化、平成 25 年度は動態解析のために光転換型の蛍光物質 Dendra 及び Dronpa を用いて、可視化を行った。すでに Dendra、Dronpa は線虫で発現させるために、コドン在線虫バージョンに作り替えており、さらに線虫で発現することも確認した。Wnt 分子も同様に、Dendra、Dronpa を用いて可視化をおこない、生体内局在を観察した。具体的には、Dendra の場合では ultra violet で、Wnt 分子や基底膜を赤色蛍光に変えた後、その赤色蛍光の局在変化を追跡して、非対称分裂における Wnt 分子の拡散を定量化した。

### (2) 生化学的手法を用いた Wnt 分子の翻訳後修飾の同定

Wnt分子にGFPを結合させた融合タンパク質を用いて、ウエスタンブロットや免疫沈降法により、翻訳後修飾を解析する。具体的には、ウエスタンブロット (分子量の差) や、免疫沈降後、質量分析装置を用いて解析する。並行して線虫のWnt分子に対する抗体を作成して、内在性のWnt分子も同様の修

飾を受けるのか？明らかにする。

#### 4. 研究成果

現在までに基底膜の主要構成成分の可視化には成功しているため、平成24年度は、更に進展させて他の基底膜蛋白質の可視化、さらに動態解析のために多色蛍光蛋白質による可視化、平成25年度は光転換型の蛍光物質Dendra及びDronpaを用いて可視化を行った。最初のステップとして線虫で発現させるために、コドン線虫バージョン作り替えたDronpaのcDNAを作成して、実際に線虫で発現することも確認した。また緑色蛍光蛋白質であるGFPと赤色蛍光タンパク質mCherryにより、多種の基底膜タンパク質の融合タンパク質を作成して、それぞれ細胞外領域での局在を確認することができた。光転換型蛍光蛋白質Dendraに関しては、それぞれのWnt分子に対して融合タンパク質を作成したが、現在までのところ、蛍光が観察されていない。Wnt::Dendraの蛍光が観察されない理由は、不明である。

またWnt分子を生化学的に認識するために、3種類のWnt分子に対して、抗原性の高い部位を選択して、合計6種類（各Wnt分子に対して二箇所）のペプチドを抗原として、ポリクローナル抗体を作成した。各ペプチド抗体は、抗原であるペプチドに対して良好な反応性を示すが、Wnt分子そのものに対しては、全く応答性を示さなかった。この理由は不明であるが、おそらく抗原部位が分子表面に露出していない、あるいはWnt分子の疎水性の性質のために、ウエスタンブロットに用いるタンパク質画分への溶出が難しいためであると考察している。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 3件)

1. In Situ Imaging in *C. elegans* Reveals

Developmental Regulation of Microtubule Dynamics. Lacroix B, Bourdages KG, Dorn JF, Ihara S, Sherwood DR, Maddox PS, Maddox AS *Dev. cell* 29 203-216 2014年4月 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580714001592> doi: 10.1016/j.devcel.2014.03.007、(査読有り)

2. The Novel Secreted Factor MIG-18 Acts with MIG-17/ADAMTS To Control Cell Migration in *Caenorhabditis elegans*. Kim HS, Kitano Y, Mori M, Takano T, Harbaugh TE, Mizutani K, Yanagimoto H, Miwa S, Ihara S, Kubota Y, Shibata Y, Ikenishi K, Garriga G, Nishiwaki K *Genetics* 2013年12月 <http://www.genetics.org/content/196/2/471.long> doi: 10.1534/genetics.113.157685 (査読有り)

3. 伊原伸治：線虫における細胞移動・浸潤の制御機構 2013年 生化学 第85巻 第11号 PP. 972-984, ISSN:0037-1017, (公社)日本生化学会出版 (査読なし)

〔学会発表〕(計7件)

1. 遺伝学的スクリーニングによって明らかになった糖鎖による恒常性維持機構 伊原伸治 日本糖質学会 (大阪) 2013年8月6日

2. Analysis of Heparan Sulfate function during *C. elegans* anchor cell invasion. Shinji Ihara, David, R. Sherwood and Sawa Hitoshi 日本発牛生物学会 松江 くにびきメッセ 2013年5月30日

3. 伊原伸治, 細胞移動・浸潤過程を制御する分子の発見と解析 奨励賞受賞講演 第85回日本生化学会大会 2012年12月14日 福岡国際会議場

4. Ihara, S., David, R. Sherwood, and

Sawa, H. Regulation of hole size in basement membrane during cell invasion in *C. elegans*. East Asia Worm Meeting. Taipei, June 27-30, 2012

5. Ihara, S., David, R. Sherwood, and Sawa, H. Regulation of hole size in basement membrane during cell invasion in *C. elegans*. Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, Kobe International Conference Room, JWS-B5 (P1-142) May 29, 2012

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/labs/MultiOrg/Multicellular/Home.html>

研究期間中の受賞(3件)

- (1)日本生化学会平成 24 年度 日本生化学会  
奨励賞 2012 年 11 月  
(2)アステラス病態代謝研究会 第一回 竹中  
奨励賞 2012 年 10 月  
(3)文部科学省 平成 24 年度 科学技術分野の  
文部科学大臣表彰 若手科学者賞受賞  
2012 年 4 月

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊原 伸治 (Ihara Shinji)

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センタ  
ー・助教

研究者番号 :

70373272

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号 :

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号 :