

令和元年5月23日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08138

研究課題名(和文)形態形成過程における細胞極性制御機構に関わる下流因子の網羅的解析

研究課題名(英文)Overall analysis for downstream factors of Cell polarity during Morphogenesis

研究代表者

中谷 雅明(Nakaya, Masa-aki)

横浜市立大学・医学研究科・特任助教

研究者番号：70422095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞極性に関わるaPKC遺伝子と細胞集団の極性制御に関わるWnt-PCPシグナルの構成因子Daam1遺伝子に着目した一連の実験生物学的検討である。一連の解析により、1細胞を制御する極性シグナルと多細胞を制御する極性シグナルの関連性を明らかにする。本研究では上皮細胞内でのaPKCとDaam1の相互作用によりリン酸化が変動する分子が、下流因子かどうかを生化学的、細胞生物学的、分子生物学的に検証している。上皮細胞での機能解析を目的として、遺伝子ノックアウト上皮細胞株の樹立を試み、aPKCとDaam1の相互作用が具体的な表現形として得られるかを検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、「細胞極性病」という新たな疾患概念を確立に注力した。細胞極性異常は上皮由来の癌の病理学的特徴から推測された原因の1つであるが、近年の分子生物学的研究成果から、細胞極性を制御する一連の遺伝子群が先天性奇形など、他の疾患群の原因となる事が明らかとなってきた。本研究では、この点に着目して基礎医学的手法を駆使した研究を遂行し、バイオ・インフォマティクス・データベースに蓄積されている膨大な情報と照らし合わせて、細胞極性病を定義する病態の探索と検証を行った。

研究成果の概要(英文)：Proper regulation of cell polarity which we can recognize as obviously cellular asymmetries of cellular components, such as planar cell polarity in x-y plane (PCP) and apico-basal polarity (z axis), is essential to form correct three-dimensional architecture of the body. However, whether and how apico-basal polarity and PCP mutually interact remains unclear. In this study, we show that atypical protein kinase C (aPKC), a key regulator for apical-basal polarity, genetically interact in mice with Daam1 (Dishevelled associated activator of morphogenesis 1), a member of the Wnt-PCP signaling. Functional experiments in *Xenopus* embryo further revealed that aPKC complement loss of Daam1 phenotype. Biochemically, aPKC and Daam1 physically interact through Lgl-1. Consistently, loss of Lgl in *Xenopus* phenocopies loss of function of aPKC or Daam1. These results reveal a connection between the two key polarity signaling, PCP and apicobasal polarity; aPKC contributes to PCP through Lgl.

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞極性 平面極性 タンパク質リン酸化 プロテオミクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究では細胞極性制御分子の機能を1細胞の方向性(aPKC)と細胞集団の方向性(Daam)を規定する分子を、生体内と試験管内で欠損させることにより、形態形成過程における3次元細胞極性制御の分子メカニズムを解析した。

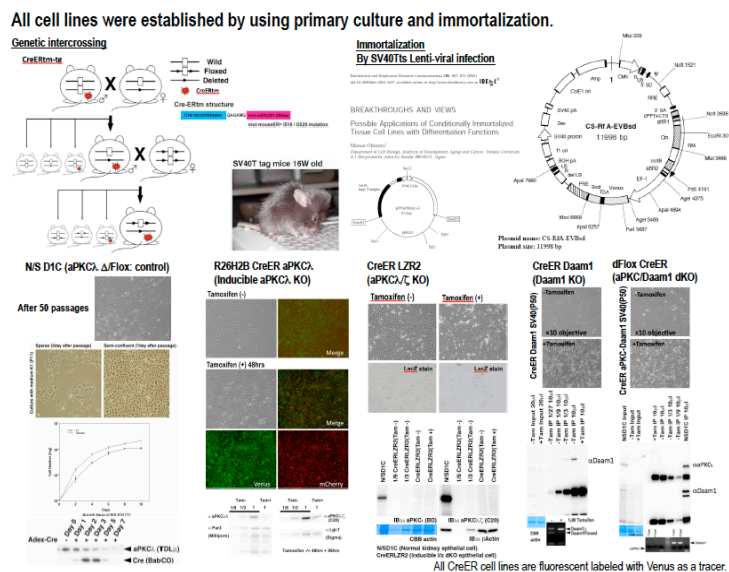
申請者は aPKC (atypical Protein kinase C) が PAR-3 (partitioning defective) と種間保存された極性シグナル複合体を形成し、1細胞であるアフリカツメガエルの卵母細胞の動物-植物極軸の形成過程において、細胞極性制御に関与する事を示してきた(aPKC-PAR系: Nakaya, MA et al., *Development* 127: 5021-5031, 2000)。さらにツメガエル初期胚を用いて aPKC の機能破壊実験を行い、aPKC が 1. 欠失により致死となること、2. 頭部形成に必須であること、3. **Convergent Extension (CE)** と呼ばれるツメガエル外殖体の伸長運動を制御していることを明らかにした。意外な事に、これらの表現型は平面極性 (PCP: Planar Cell Polarity) を制御する遺伝子群に共通に見られるものであった。この PCP シグナルは、癌や発生過程に関与する Wnt によって制御されており、軸に沿った細胞集団の極性形成に関与している。そこで申請者は、Wnt シグナル経路において共通に用いられる Deshevelled の結合タンパク質として同定した、Daam (Deshevelled associated activator of morphogenesis) 遺伝子を解析し(Nakaya, MA et al., *Gene Expression Patterns* 5: 97-105, 2004)、ツメガエル初期胚における機能破壊実験により平面極性制御の表現型を示すことを確認してきた (Wnt-Daam-PCP 系)。さらに申請者は、Cre-loxP システムを用いて Daam 遺伝子のコンディショナル・ノックアウトマウスを作製し表現型の初期解析を行った(未発表データ)。また申請者は、aPKC と Daam1 のコンディショナル・ノックアウトマウスを掛け合わせて、薬剤誘導下で aPKC and/or Daam1 遺伝子ノックアウトを行う実験系を構築して、本研究の手懸かりとなる表現型を抽出し、遺伝学的、機能的相互作用を検出してきた(平成 21-22 年度、若手研究 B、平成 24-26 年度 基盤研究 C)。その結果、aPKC が Daam1 の下流で機能すること、両タンパク質は介在タンパク質と共に複合体を形成すること、この介在タンパク質と機能的にも相互作用することを明らかにした(論文作成中)。さらに、コンディショナル・ノックアウトマウスから、薬剤誘導性遺伝子ノックアウト細胞株を作製し、その実験系の確認を行うと共に、aPKC and/or Daam 遺伝子ノックアウト条件下でのリン酸化プロテオミクスを解析し、下流タンパク質群の検索した結果、複数の候補タンパク質の同定に成功した(平成 24-26 年度、基盤研究 C)。本研究では、表現型と下流候補タンパク質群を手掛かりとして、遺伝子相互作用の本態を、細胞生物学、分子生物学、発生生物学、形態形成学、生化学的手法を駆使して解明することを試みる。

2. 研究の目的

本研究は、細胞極性制御という3次元での形態形成過程に必須である生命現象の根幹メカニズムに着目し、さらに1細胞と細胞集団に細分化して細胞極性の制御機構を明らかにすることを目的とする。具体的には、形態形成過程における、3次元細胞極性制御に関わる具体的な分子ターゲットを同定し、それらの機能を解析する。本研究の遂行のために、これまで独自に構築してきた薬剤誘導性遺伝子ノックアウトシステムを用いて、オミックス解析により遺伝学的相互作用の本態をタンパク質の活性調節レベルで明らかにしてきた。これらの分子ターゲットと既知の細胞極性制御因子との相互作用を具体的に解析することにより、細胞極性制御の本態を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究計画では細胞極性制御に関わる分子ターゲットの同定に向けた、新たな解析系を構築しながら、現存する実験系をこれまでに得られてきた成果をもとにさらに発展させる。1. 胚発生過程の形態遺伝学的解析、2. 細胞・器官原基の初代培養系での形態学的・生化学的解析、3. コンディショナル・ノックアウトマウスからの ES 細胞株の樹立、の3種の解析系の結果を逐次総合して見直すことで、研究の効率化を図ると共に、より確実に研究目的を達成するための方法論・解析系の構築を図る。1. については論文化する。これまでに樹立した数種の初代培養上皮細胞の新たな解析系の構築と共に新たな細胞株の樹立と解析法を試みる。特に2に関しては新たな器官培養モデル(乳腺組織培養等)実験系の構築を図り、3次元培養下での形態観察手法を確立する。

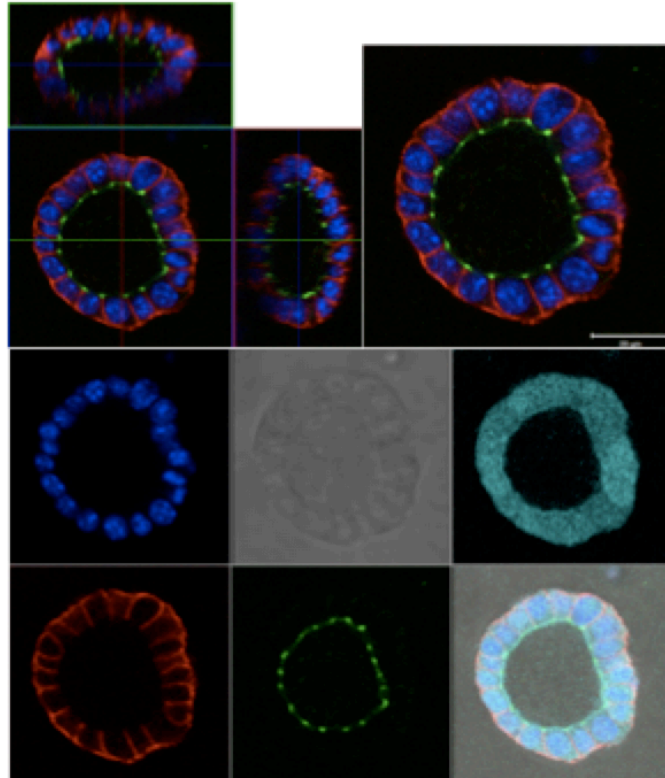


4. 研究成果

本研究では胚発生の形態遺伝学的解析により、細胞極性制御因子である aPKC の上流因子と下流因子の網羅的解析を行った。その結果、平面極性制御を制御する Wnt-PCP 経路の主因子である Daam1 との相互作用が検出された。これは、形態遺伝学的結果のみならず、生化学、細胞生物学的にも一致する結果が得られたので、論文を作成し、現在投稿準備中である。

また、ES細胞株の樹立に困難を極めたので、代替手段として腎上皮細胞株を初代培養から株化し、コンディショナル・ノックアウトが可能な上皮細胞株を樹立し、リン酸化プロテオミクス解析により下流因子を網羅的に解析した。その結果、既知の下流因子に加えて、転写調節因子、細胞骨格系の調節因子など種々の下流因子候補が同定された。現在はこれらの候補因子に対して、リン酸化部位の置換型変異体を作製してその直接相互作用と、作製した遺伝子ノックアウト細胞に対する作用を指標として、細胞遺伝学的な解析を行っている。

CreER-aPKC λ -H2B(Tam-) :normal cyst



Normal

Roundish single cystic cavity.

Columnar epithelial monolayer.

Correct ZO1-Ecad alignment.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Kimura-Yoshida C, Mochida K, Nakaya MA, Mizutani T, Matsuo I
Cytoplasmic localization of GRHL3 upon epidermal differentiation triggers cell shape change for epithelial morphogenesis. *Nature communications* 9(1) 4059 Oct 2018
doi: 10.1038/s41467-018-07486-2. 査読・有
2. Yazaki M, Ito Y, Yamada M, Goulas S, Teramoto S, Nakaya MA, Ohno S, Yamaguchi K
Oral ingestion of collagen hydrolysate leads to the transportation of highly concentrated Gly-Pro-Hyp and its hydrolyzed form of Pro-Hyp into the bloodstream and skin. *Journal of agricultural and food chemistry* 65(11) 2315-2322 Feb 2017
doi: 10.1021/acs.jafc.6b05679. 査読・有
3. Tokinaga-Uchiyama A, Mizushima T, Akimoto K, Nagashima Y, Sasaki K, Nakaya MA, Ohashi K, Kubota K, Maruyama Y, Kato H, Hirahara F, Miyagi E, Ohno S, Asai-Sato M
Aberrant Nuclear Localization of aPKC λ/ι is Associated With Poorer Prognosis in Uterine Cervical Cancer. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* Jul 2018
doi: 10.1097/PGP.0000000000000539. 査読・有
4. Kawamura M, Umehara D, Odahara Y, Miyake A, Ngo MH, Ohsato Y, Hisasue M, Nakaya MA, Watanabe S, Nishigaki K
AKT capture by feline leukemia virus. *Archives of virology* 162(4) 1-6 Dec 2016

doi: 10.1007/s00705-016-3192-1. 査読・有

5. Ajima R, Bisson JA, Helt JC, Nakaya MA, Habas R, Tessarollo L, He X, Morrisey EE, Yamaguchi TP, Cohen ED. DAAM1 and DAAM2 are co-required for myocardial maturation and sarcomere assembly. *Developmental Biology* 408(1) 126-139 Dec 2015
doi: 10.1016/j.ydbio.2015.10.003. 査読・有
6. Mizushima T., Asai-Sato M., Akimoto K., Nagashima Y., Taguri M., Sasaki K., Nakaya MA, Asano R, Tokinaga A, Kiyono T., Hirahara F., Ohno S., Miyagi E. Aberrant expression of the cell-polarity regulator aPKC λ/ι is associated with disease progression in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) : a possible marker for predicting CIN prognosis. *International Journal of Gynecological Cancer* 35(2) 106-117 Mar 2016
doi: 10.1097/PGP.000000000000228. 査読・有

〔学会発表〕（計 2 件）

1. Masa-aki Nakaya, Shinya Matsukawa, Kayano Moriyama, Hiroki Kuroda, Tatsuo Michiue, Terry P. Yamaguchi and Shigeo Ohno 「平面極性制御機構における aPKC の役割 : aPKC contributes to Planar Cell Polarity regulation」
第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月横浜 2P-0552
2. Masa-aki Nakaya, Shinya Matsukawa, Kayano Moriyama, Hiroki Kuroda, Tatsuo Michiue, Makoto Asashima, Terry P. Yamaguchi and Shigeo Ohno The novel concept of the functional disorders and diseases caused by cell polarity mis-regulation.
第 51 回日本発生生物学会・第 70 回日本細胞生物学会 2018 年 6 月船堀

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/read0131475/?lang=japanese>

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：森山 佳谷乃

ローマ字氏名：Moriyama Kayano

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。