

令和元年5月31日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15551

研究課題名(和文)N-カドヘリン/Vangl2相互作用の神経管閉鎖に於ける役割の解析

研究課題名(英文)Analysis of the role of the interaction between N-cadherin and Vangl2 during neural tube closure

研究代表者

永岡 唯宏(Nagaoka, Tadahiro)

藤田医科大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：70634864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、二次元的に細胞を整列させる極性、平面内細胞極性(PCP)を司る蛋白質の一つであるVangl2が、細胞接着分子Nカドヘリンと相互作用することで、正常な神経突起の形成に不可欠な分子であることを示した。しかし、NカドヘリンがPCPのシグナル経路に含まれるかは不明である。本研究ではこの相互作用が、PCPがその形成に関わる神経管閉鎖や、内耳発生にも影響するかを調べた。マウス胚においてはNカドヘリンとVangl2は共に神経板、神経管に発現して、部分的に共局在していた。内耳の発生についても解析を進めている。本研究過程で、Vangl2のユビキチン化がPrickle2の分解を促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

二分脊椎症は神経管閉鎖異常が原因の難病で、妊娠前から妊娠中の女性の葉酸摂取により予防が可能であるが、約20%の症例では遺伝子異常が原因のため予防は困難である。この異常にはVangl2を含むPCP因子も含まれる。本研究ではVangl2とNカドヘリンの遺伝学的相互作用が神経管閉鎖に重要であることを示した。PCP複合体とカドヘリン複合体との間の相互作用が細胞接着の形成を調節することがより普遍的なものである可能性を示唆しているが、更に研究が必要である。本研究を更に発展させることで、Vangl2/N-カドヘリンが神経管形成に果たす役割を明らかにでき、二分脊椎の発生原因の解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We previously revealed that the planar cell polarity (PCP) protein Vangl2 is essential to form normal dendritic spine by interacting with cell adhesion molecule N-cadherin physically. However, it is unknown whether N-cadherin is included in the PCP signaling pathway. In this study, we investigated whether this interaction also affects neural tube closure and inner ear development are regulated by PCP pathway. In mouse embryos, both N-cadherin and Vangl2 were expressed in the neural plate and neural tube and partially colocalized. We are also analyzing the occurrence of the inner ear. In the course of this study, we revealed that ubiquitination of Vangl2 promotes the degradation of Prickle2 in mammalian cells.

研究分野：分子生物学 細胞生物学

キーワード：神経管閉鎖 二分脊椎 解剖学 ユビキチン化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

二分脊椎症は、神経管の下部に発生する閉鎖障害により露出した脊髄の癒着や傷害が原因の神経障害で、症状の軽重には個人差が大きいものの、下肢障害、排泄障害、学習障害(発達障害)等の症状を示す。多くの場合、妊娠前から妊娠中の女性の葉酸摂取により予防が可能であるが、20~30%の症例では遺伝子の異常が原因で、予防は困難である。この遺伝子異常には上皮細胞群がその組織平面内で一定方向を向いて並ぶ際の極性、すなわち平面内細胞極性(Planar Cell Polarity: PCP)因子も含まれる。そのPCP分子のVangl2の変異も報告されており(Lei et al., N Engl J Med. 2010)、PCPの異常が二分脊椎の発生に深く関わっていることが知られる。Vangl2遺伝子に点変異の入ったLooptail(Lp)マウスは、ホモ変異(Lp/Lp)では、通常神経管閉鎖が始まるE8.5に、神経板の湾曲が起こらず、最終的に頭蓋脊椎披裂により胎生致死となる(Kibar et al., Genomics. 2001)。ただし、ヘテロ変異(Lp/+)では数%程度の確率でヒトの二分脊椎様の、脊椎下部の閉鎖不全が認められるが、ほとんどの場合、尾が螺旋状に巻く形態異常のみで、正常に生育、繁殖する。我々は、これまでに、神経シナプスにおいてVangl2は、細胞接着分子Nカドヘリンと直接的に相互作用することによって、そのエンドサイトーシスを制御し、また正常な樹状突起スパインの形成に不可欠な分子であることを明らかにした(Nagaoka et al., Cell Rep. 2014)。Vangl2とNカドヘリンとの間の物理的、機能的な相互作用は β -カテニンやVangl2の結合分子であるPrickle2によって競合的に阻害され、逆に、Nカドヘリン/ β -カテニンの結合は、Vangl2の過剰発現によって抑制される。細胞生物学的には、 β -カテニンがNカドヘリンを細胞表面上に保持し、それに拮抗する形でVangl2がNカドヘリンの内在化を促しているということが明らかになった。PCP複合体とクラシックカドヘリン複合体との間の相互作用が細胞接着の形成を調節しているという分子機構がより普遍的なものである可能性を示唆しているが、更に研究が必要である。

2. 研究の目的

神経管閉鎖に於ける、Vangl2とCdh2の遺伝学的相互作用が、我々が見出した蛋白質間相互作用を反映するものであるのかどうかを明らかにすることで、神経管閉鎖のメカニズムや、二分脊椎発生過程を解明していきたい。そこで、以下のように研究を行う。

マウス胎児に於いて、神経管閉鎖が始まる時期(E8.5前後)に、神経板のNカドヘリンの局在を観察する。また、神経管に於ける、NカドヘリンとVangl2の共局在についても観察を行う。PCPシグナルは内耳の有毛細胞の不動毛の向きを一定にする働きを持つ。そこで、神経管閉鎖不全を起こすCdh2 +/-; Lp/+マウスに於いて、不動毛束の配向に異常が見られるかどうかを観察を行う。本研究課題を通じて、Vangl2/Nカドヘリンの神経管形成期の局在や、Nカドヘリンのエンドサイトーシスを解析することによって、Vangl2/Nカドヘリンが神経管形成に果たす役割を明らかにできると考えられる。また、二分脊椎の発生原因の解明につながることを期待される。

3. 研究の方法

(1) in situ hybridization

マウス胚に於けるVangl2およびCdh2の発現が胚の同じ部位で起こっているかどうかを調べるために、マウスE8.5胚をPFAで固定し、メタノール置換後、再度PBSで置換した。更に過酸化水素水で漂白して、ブロッキング後、DIG標識したVangl2およびCdh2のアンチセンスプローブでハイブリダイゼーションを行った。複合体はAP標識抗DIG抗体でプローブし、NBT/BCIPで発色させた。

(2) 免疫蛍光染色

マウス胚の神経板および神経管に於けるVangl2タンパク質とNカドヘリンタンパク質の共局在を調べるために、マウスE8.5胚を、OCTコンパウンドを用いて包埋して凍結し、マイクロトームで5 μ mの薄切切片を作製した。切片はメタノール固定し、FBSでブロッキングした後、一次抗体で処理し、さらに蛍光標識二次抗体でプローブした。また、内耳有毛細胞の不動毛の向きを解析するためにE18.5胚の内耳をPFA固定し、Myo7AおよびPhalloidinで標識した。蛍光は共焦点レーザー顕微鏡LSM 710 (Zeiss)を用いて観察した。

(3) ユビキチン化の検出

タンパク質のユビキチン化はタンパク質の分解やシグナル伝達に重要である。PCPシグナル経路ではタンパク質のユビキチン化が細胞内のPCP因子の局在に重要であることが示唆されている。Vangl2がその結合タンパク質のユビキチン化を制御しうるかどうかを調べるために、ヒト胎児腎由来293T細胞にVangl2およびその結合タンパク質の発現プラスミドを導入し、標的タンパク質のユビキチン化を解析するために、標的タンパク質を免疫沈降してその抽出物をSDS-PAGEして抗ユビキチン抗体でウェスタンブロットした。また、標的タンパク質の発現レベルの解析を細胞抽出物のウェスタンブロットで解析した。

4. 研究成果

(1) E18.5マウス胚に於ける二分脊椎の観察

Looptail マウスと *Cdh2* KO マウスを交配させ、妊娠 18.5 日の胎仔を観察したところ、ダブルヘテロ変異体のおよそ 80%の尾部で神経管閉鎖不全が観察された (図1)。Fisher の性格確率検定を行ったところ、神経管閉鎖不全の発症率は野生型、*Lp* マウスと比較してダブルヘテロ変異体で優位に高いことが分かった。さらに、胎仔を PFA 固定後、パラフィン包埋し切片を作製してヘマトキシリン・エオジン染色を行い病理解析を行った。ダブルヘテロ変異体では脊椎が二つに別れ、外部に露出するというヒトの二分脊椎症様の症状を示すことが分かった。

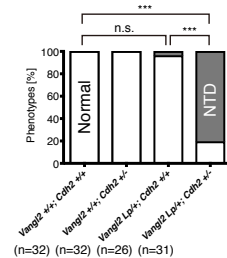


図1 神経管閉鎖異常の割合

(2) in situ hybridization

上記のように、*Vangl2*と*Cdh2*の遺伝学的相互作用が神経管閉鎖に影響することが示唆されたので、神経管閉鎖が起こっている E8.5 胚でこれらの遺伝子の発現を in situ hybridization によって解析した。その結果、*Vangl2*と*Cdh2*は神経板および神経管に発現していることが分かった (図2)。更にパラフィン切片を作製し、神経板および神経管のどの細胞に発現するかその詳細を解析している。

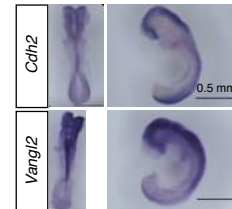


図2 E8.5胚の遺伝子発現の解析

(3) 免疫蛍光染色による胚の解析

*Vangl2*および、*Cdh2*は神経管および神経板に強く発現することが分かったので、さらにこれらのタンパク質の E8.5 胚神経板細胞内の共局在を解析した。神経板には E カドヘリンが発現し、N カドヘリンは神経板が神経管を形成してから発現するとされているが、我々の系では管形成前の神経板でも発現していた。また、*Vangl2*と N カドヘリンは細胞のラテラル膜に局在しており、特にアドヘレンスジャンクションでは両者が部分的な共局在が観察された (図3)。このことから神経板で *Vangl2*と N カドヘリンは相互作用していることが示唆される。また、E18.5 胚の内耳の不動毛を染色するために Phalloidin で染色し、野生型、*Cdh2* KO、*Lp*、ダブルヘテロ変異体で不動毛の配向を解析している。

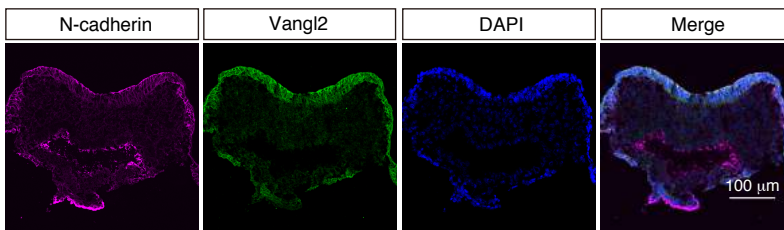


図3 神経板に於ける *Vangl2*と N カドヘリンの局在

(4) *Vangl2*によるユビキチン化の解析

*Vangl2*が N カドヘリンのユビキチン化を制御するかどうか 293T にそれぞれのプラスミドをトランスフェクションして N カドヘリンを免疫沈降で濃縮してそのユビキチン化を解析した。しかし、*Vangl2*の有無に関わらず、N カドヘリンのユビキチン化は変化しなかった。しかし、その実験の過程で、*Vangl2*が PCP 因子で、*Vangl2*結合タンパク質である *Prickle2*と共発現すると *Prickle2*の発現を減少させることが分かった。これがユビキチン化によるものかどうかを調べるために *Prickle2*を免疫沈降で濃縮しそのユビキチン化を調べたところ、*Vangl2*

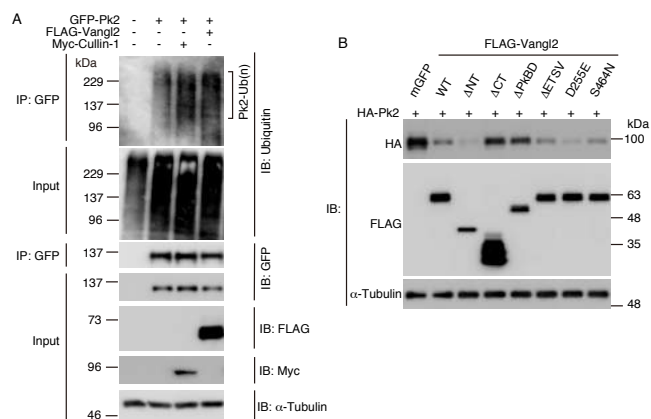


図4 *Vangl2*による *Prickle2*の分解促進

を経発させた時にユビキチン化が亢進していることが分かった (図4A)。また、*Vangl2*の変異体を用いて同様の実験を行ったところ、*Prickle2*結合部位である C 末端領域を削った変異体でこのユビキチンの亢進が抑制された (図4B)。このことは *Vangl2*による *Prickle2*のユビキチン化の促進は、*Prickle2*と相互作用することが必要であることが示唆される。細胞においては、タンパク質の分解の主要な経路としてユビキチン/プロテアソーム経路とリソソーム経路が知られている。我々は *Prickle2*の分解がプロテアソーム系のみで起こっているかどうかを調べるために、プロテアソーム阻害剤およびリソソーム阻害剤を用いて *Vangl2*による *Prickle2*の分解が抑制されるかどうかを解析した。その結果、プロテアソーム阻害剤のみが *Prickle2*の分解を阻害することができた。このことからこの分解にリソソーム経路は関与していないことが示唆される。ショウジョウバエに於ける *Vangl2*のオルソログである *Vang*は *Prickle2*の分解を促進することが報告されていた (Strutt et al., PLoS genet. 2013)。その中で、*Prickle2*の C 末

端の膜結合に重要な脂質修飾ドメインである CAAX ドメインが必要、つまり Prickle の膜局在が重要であるとされていた。しかし、我々の系では CAAX ドメインを欠失させた Prickle2 でも Vangl2 による分解の促進が観察された (図 5 AB)。我々の CAAX 欠失 Prickle2 はファルネシル化しないことから膜局在能力はないものと考えられる (図 5 C)。このことからショウジョウバエと哺乳類では性質が異なることが予想される。本研究成果は Scientific Reports に掲載された。

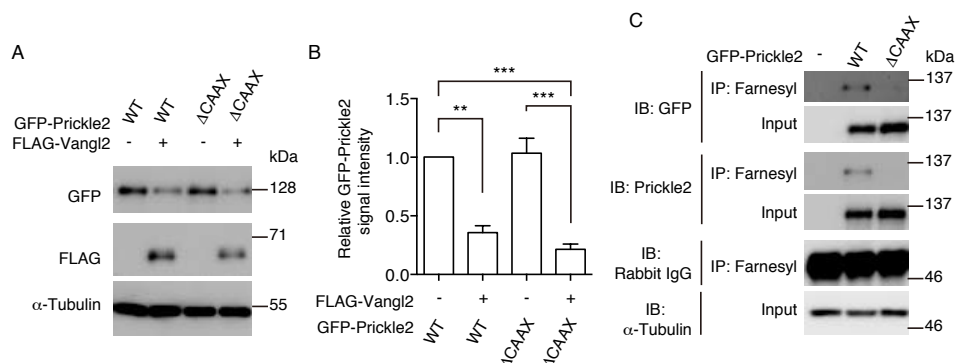


図 5 Prickle2 の CAAX ドメイン欠失は Vangl2 による分解の促進に影響しない

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① [Tadahiro Nagaoka, Mikio Furuse, Toshihisa Ohtsuka, Kunihiro Tsuchida, Masahi Kishi, Vangl2 interaction plays a role in the proteasomal degradation of Prickle2. Scientific Reports. 9\(1\):2912, 2019, DOI:10.1038/s41598-019-39642-z 査読有り](#)

[学会発表] (計 2 件)

- ① [永岡唯宏, 岸将史, 平面内細胞極性因子と N カドヘリンの相互作用が組織形成に果たす役割の解析, 日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 2017](#)
- ② [Tadahiro Nagaoka, Mikio Furuse, Kunihiro Tsuchida, Masashi Kishi, Function of interaction between Vangl2 and N-cadherin in synapse and neural tube. Cold Spring Harbor Asia Conference Latest Advances in Development & Function of Neuronal Circuits, 2018](#)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

※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。