

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：82675

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19418

研究課題名(和文)局所的シグナル分布が作り出す組織のパターン形成

研究課題名(英文)Tissue Pattern Formation Generated by Local Signal

研究代表者

高田 慎治 (Takada, Shinji)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター)教授

研究者番号：60206753

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):組織や器官の形成過程において、Wntなどの分泌性シグナル蛋白質は重要な役割を果たすが、それらの空間的挙動は十分に理解されていない。研究代表者らは、分泌されたWntが「グローバルな濃度勾配」を形成するのではなく、細胞膜上の局所に「ローカルに局在化」することに着目し、アフリカツメガエルの初期発生を材料にWnt11と平面内細胞極性に関わる因子(PCP因子)との関係を解析した。その結果、WntはPCP因子との相互作用によって極性化するとともに、極性化したWntがさらにPCP因子の極性化を誘導することを示唆する結果を得た。このような相互誘導がリレー式に広がり組織全体を極性化するものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、Wnt蛋白質は細胞間を自由拡散し組織の広い範囲に渡る「グローバルな濃度勾配」を形成すると考えられてきたが、本研究の結果はWntが極性を持って上皮シート上に分布することを示しており、これまで見過ごされてきたWnt蛋白質の「ローカルな局在化」の重要性を示唆している。さらに、このようなローカルな局在化は、WntとPCP因子との相互作用によるものであり、それがさらにPCP因子の極性化を誘導することを本研究の結果は強く示唆している。このような相互誘導がリレー式に広がることにより組織全体に極性形成が起きるといふモデルは、平面内細胞極性に形成機構に対して新たな考え方を提唱するものである。

研究成果の概要(英文): Secretory signal proteins, including Wnt, play roles in the formation of tissues and organs, but their spatial dynamics has yet been poorly understood. We found previously that secreted Wnt does not form a global concentration gradient but localizes on the cell membrane. In this study, by using the early development of *Xenopus* as a model system, we examined the relationship between Wnt11 and factors regulating the planar cell polarity (PCP factors). Our results suggest that Wnt is polarized by the interaction with PCP factors and that the polarized Wnt further induces the polarization of PCP factors. Such mutual induction appears to spread in a relay manner and polarizes the entire tissue.

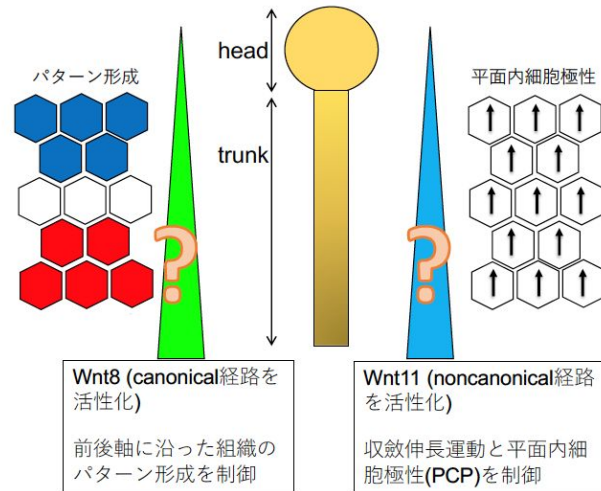
研究分野：発生生物学

キーワード：遺伝子 細胞 シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

組織や器官が形成され、それらの機能が維持されていくためには、何らかの秩序をもって個(細胞)と全体(組織や器官)が関連づけられる必要がある。そこで大きな役割を果たすのが細胞間シグナルであり、Wnt, FGF, BMPといった分泌性シグナル蛋白質の重要性が、主に分子遺伝学的解析から明らかにされてきた。これらのシグナル蛋白質はパラクライン的に周囲の細胞に作用するものと考えられているが、実際にこれら蛋白質の空間分布を組織内で観察した研究は極めて少ない(図1)。研究代表者はWnt蛋白質の組織内での分布や動態を明らかにするために、これまでに様々なアプローチを試みてきた。例えば、Wntの場合、組織免疫染色に用いることができる抗体がほとんどないことから、独自の工夫により抗体調製を行い、組織内の内在性Wnt蛋白質の可視化に成功した。また、蛍光蛋白質を付加した融合Wnt蛋白質を胚体内で発現させることによってWnt蛋白質の挙動を観察することに成功した。これらの観察の結果は当初の予想とは大きく異なり、Wnt蛋白質は細胞間を自由拡散し組織の広い範囲に渡る「グローバルな濃度勾配」を形成するというよりも、細胞膜上の局所に「ローカルに局在化」することが明らかになった。そこで、このような局在化の意義を検討するために、脊椎動物の初期発生においてWntが細胞極性の形成に関与することが知られている「収斂伸長運動」に注目し、解析を進めた結果、WntはPCP因子と協調しながらまず1細胞レベルでの局在化を生み出し、さらにそのような細胞同士がPCP因子間の相互作用(Chen et al., Cell 133:1093, 2008)などで協調しあって組織レベルでのWntの局在化と組織全体の極性を生み出すのではないかという着想を得るに至った。



2. 研究の目的

本研究では、1つの細胞の周囲において見られるWnt蛋白質の局所的な局在化(1細胞レベルでの局在化)機構、並びにそのような細胞レベルでの局在化をもとにした組織の極性形成機構の基本となる分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

この目的のために、個々の細胞が比較的大きく、ライブイメージング観察も容易である、アフリカツメガエル初期胚を主な実験系とする。そして原腸陥入および神経管形成における細胞・組織の運動である、外胚葉の収斂伸長運動に着目し、この現象に必須な役割を果たすことがすでに知られているWnt11蛋白質の挙動とそれに関わる分子機構を解析する。

4. 研究成果

(1) 内在性Wnt11蛋白質の局在化プロセスの解明

まず、1細胞内で最初に起きると想定するWnt11の局在化が、発生の進行とともに実際にどのように組織全体に渡って広がっていくかを確認した。その結果、原腸胚期において、内在性

Wnt11の局在化が動物極側の上皮シートにおいて顕著に見られることが明らかになった(図2)。

(2) グローバルな濃度勾配モデルとローカルな局在化モデルの直接的な検証

次に、Wnt11がどのように細胞の極性形成に関わるかどうかを検討した。一般的に、Wntのような分泌性のシグナルタンパク質は産生細胞の周囲に濃度勾配を形成して分布すると考えられている。濃度勾配モデルを支持する主要な根拠としては、Wntを人為的に発現

させたとき、長いレンジにわたり周囲の細胞の極性がWntのソースに向かって方向付けられることが挙げられている(Wu et al., Nat. Cell Biol. 15:1045, 2013; Chu and Sokol, 2016)。しかし、これらの報告ではWnt蛋白質の分布を可視化していないため、実際のところWntがグローバルな濃度勾配を形成して働くのか、それともローカルなWntの局在化がいくつかの細胞で起こり、それが隣接する細胞同士の間で調節・伝搬されていくのかが明らかにされていない。

アフリカツメガエル初期胚を用いた研究から、Wnt11を局所的に発現させることによりPCP因子であるPrickleやVanglが極性をもって細胞の周囲に局在化することが示されている(Chu & Sokol (2016))。そこで、Wnt11抗体を用いてこの系でWnt11蛋白質を可視化し、Wnt11の濃度勾配が形成されているのか、それともPCP因子とともにWnt11が局在化しているのかを検討した。Wnt11を蛍光強度の高いタグにより標識したところ、十分な検出感度が得られ、Wnt11蛋白質の可視化に成功した。その結果、Wnt11は巨視的には濃度勾配を形成するものの、局所的には極性化して存在することが明らかになった。

(3) Wnt11蛋白質による平面内細胞極性の形成機構の解明

また、Wnt11局在化によるPCP因子の局在化の機構として、Wnt11がその発現細胞と隣接細胞のPCP因子を極性化したのち、そのPCP因子の極性がPCP因子相互間の相互作用で平面内の細胞全体に伝搬されて行く可能性もある。そこで、膜結合型Wnt11蛋白質を発現させ、PrickleやVanglの局在化の広がり調べることによりその可能性を検討した。膜結合型Wnt11蛋白質を異所発現させたところ、数細胞の範囲でコア因子の極性化が引き起こされたのに対し、その状態で低濃度のWntを拡散させると、極性化される範囲が格段に広がることを示された。さらに、Wntのシグナル伝達をdominant negative Dishevelledの異所発現により局所的に阻害すると、阻害した細胞以降には極性化は広がらなかった。このことから、平面内細胞極性はWnt発現細胞の周囲で最初にできた細胞極性がリレー式に周囲へと伝播されること、かつそのリレーにはWntが必要なことが明らかになった。以上の結果をもとに、Wnt11とPCPコア因子が相互に極性化を誘導し、その誘導がリレー式に広がることにより組織全体に極性形成が起きるのではないかというモデルを構築することができた。

(4) Wnt11局在化に関わる因子の解析

Wnt11局在化機構を検討するために、PCP因子がWnt11局在化を制御する可能性を検討した。様々な濃度のPrickleやVanglを発現させ、Wnt11の空間パターンを調べたところ、これらPCP因子によってWnt11の極性化が誘導されると同時に、Wnt11の安定性にもこれら因子との相互作用

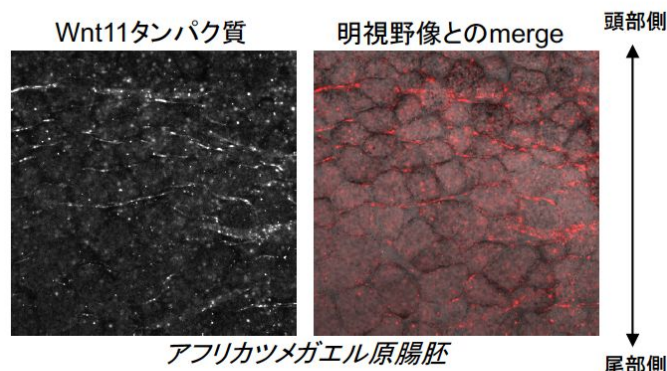


図2 平面内細胞極性形成におけるWnt11の分布
多くのWnt11は頭尾軸に沿った細胞極性に直交するように細胞間隙に局在する。

が重要であることが示唆された。

一方、Wntは細胞外においてヘパラン硫酸と相互作用することが知られている。そこで、ヘパラン硫酸糖鎖の対するさまざまな抗体を用いて解析を行ったところ、特別な修飾状態にあるヘパラン硫酸が細胞表面上にクラスターを形成し、内在性のWn11はそのようなヘパラン硫酸に特異的に結合していることが示唆された。

これまで、Wnt蛋白質は細胞間を自由拡散し組織の広い範囲に渡る「グローバルな濃度勾配」を形成すると考えられてきたが、本研究の結果はWntが極性を持って上皮シート上に分布することを示しており、これまで見過ごされてきたWnt蛋白質の「ローカルな局在化」の重要性を示唆している。さらに、このようなローカルな局在化は、WntとPCP因子との相互作用によるものであり、それがさらにPCP因子の極性化を誘導することを本研究の結果は強く示唆している。このような相互誘導がリレー式に広がることにより組織全体に極性形成が起きるといふモデルは、平面内細胞極性に形成機構に対して新たな考え方を提示するものであり、今後このモデルを検証していく事により、平面内細胞極性の形成機構が明らかになるものと期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takada, R., Mii, Y., Krayukhina, E., Maruyama, Y., Mio, K., Sasaki, Y., Shinkawa, T., Pack, C.-G., Sako, Y., Sato, C., Uchiyama, S., Takada, S.	4. 巻 1
2. 論文標題 Assembly of protein complexes restricts diffusion of Wnt3a proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	6. 最初と最後の頁 165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-018-0172-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Shinozuka Takuma, Takada Ritsuko, Yoshida Shosei, Yonemura Shigenobu, Takada Shinji	4. 巻 146
2. 論文標題 Wnt produced by stretched roof-plate cells is required for the promotion of cell proliferation around the central canal of the spinal cord	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 pii:dev15934
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.159343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mii, Y., Yamamoto, T., Takada, R., Mizumoto, S., Matsuyama, M., Yamada, S., *Takada, S., & *Taira, M. (*Co-corresponding authors)	4. 巻 8
2. 論文標題 Roles of two types of heparan sulphate clusters in Wnt8 distribution and signalling in Xenopus.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Commun.	6. 最初と最後の頁 1973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-017-02076-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 7件／うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Shinji Takada
2. 発表標題 Oligomerization-based assembly restricts Wnt protein diffusion.
3. 学会等名 Frontier Bioorganization Forum 2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Mii, Ritsuko Takada, Makoto Matsuyama & Shinji Takada
2. 発表標題 How do Wnt proteins regulate planar cell polarity?
3. 学会等名 17th International Xenopus Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinji Takada, Ritsuko Takada, Makoto Matsuyama, & Yusuke Mii
2. 発表標題 Visualization of Wnt11 proteins reveals that Wnt acts not by forming global gradient, but as a local signal to progressively propagate planar cell polarity
3. 学会等名 European Wnt Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinji Takada, Ritsuko Takada, Makoto Matsuyama, & Yusuke Mii
2. 発表標題 Extracellular Dynamics and Diffusion Range of Wnt Protein in Xenopus Embryos
3. 学会等名 Keystone Symposia "Signal Dynamics and Signal Integration in Development and Disease" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Mii
2. 発表標題 How does Wnt11 direct the planar cell polarity?
3. 学会等名 119th International Titisee Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ritsuko Takada, Yusuke Mii, Elena Krayukhina, Chan-Gi Pack, Yasushi Sako, Susumu Uchiyama, and Shinji Takada
2. 発表標題 Oligomerzation-based assembly restricts Wnt protein diffusion.
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuma Shinozuka, Ritsuko Takada, Shosei Yoshida, Shigenobu Yonemura, Shinji Takada
2. 発表標題 Roof plate cells dramatically elongate and promote the proliferation of neural progenitors by secreting Wnt proteins in the mouse spinal cord
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Mii, Ritsuko Takada, Makoto Matsuyama, & Shinji Takada
2. 発表標題 Local and mutual regulation between Wnt and planar cell polarity propagate global coordination of cell polarity throughout the tissue.
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yudai Hatakeyama, Takuma Shinozuka, Yusuke Mii & Shinji Takada
2. 発表標題 Lineage analysis of roof plate cells during the developmen of mouse spinal cord
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三井優輔、高田律子、松山誠、高田慎治
2. 発表標題 Wnt11はどのようにして平面細胞極性を揃えるのか？
3. 学会等名 第12回日本ツメガエル研究集会・第4回次世代両生類研究会;合同シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三井優輔、高田律子、松山誠、高田慎治
2. 発表標題 分泌性シグナル蛋白質Wnt11による平面細胞極性(PCP)の制御
3. 学会等名 日本発生物学会 秋季シンポジウム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三井優輔、高田律子、松山誠、高田慎治
2. 発表標題 Wntはどのようにして平面細胞極性をそろえるのか？
3. 学会等名 Wnt研究会2018-2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 畠山宙大、篠塚琢磨、三井優輔、高田慎治
2. 発表標題 マウス神経管におけるWnt発現細胞の細胞系譜解析
3. 学会等名 Wnt研究会2018-2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinji Takada
2. 発表標題 Oligomerization-based assembly restricts Wnt protein diffusion
3. 学会等名 Gordon conference Wnt signaling 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takuma Shinozuka, Ritsuko Takada, Shinji Takada
2. 発表標題 Wnt signal modulates proliferation of spinal cord ependymal cells by promoting morphological change of the source cells
3. 学会等名 18th International Congress of Developmental Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yusuke Mii
2. 発表標題 Extracellular Behaviors of Wnt Ligands in Xenopus Embryo
3. 学会等名 Amphibian development, regeneration, evolution and beyond (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinji Takada
2. 発表標題 Oligomerization-based assembly restricts Wnt protein diffusion
3. 学会等名 ConBio 2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高田慎治
2. 発表標題 Restricted diffusion of Wnt proteins
3. 学会等名 Wnt研究会2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三井 優輔
2. 発表標題 ツメガエル初期胚での分泌性シグナル蛋白質Wntの挙動を理解する
3. 学会等名 第9回イメージング若手の会 光塾 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takuma Shinozuka, Ritsuko Takada, Shinji Takada
2. 発表標題 Wnt signal is required for proper rearrangement and morphological change of roof plate cells in the formation of median septum of mouse spinal cord
3. 学会等名 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 篠塚琢磨, 高田律子, 高田慎治
2. 発表標題 Wnt産生細胞の伸長はWntシグナルの場を変化させる
3. 学会等名 日本動物学会第88回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

プレスリリース (1) シグナル分子(モルフォゲン)の足場となる点状構造の発見とその役割の解明 http://www.nibb.ac.jp/press/2017/12/07.html (2) Wntタンパク質複合体の凝集と解離が情報の拡散範囲を規定する ~細胞の社会の中で情報が拡散するためには~ https://www.nibb.ac.jp/press/2018/10/12.html (3) 細胞の変形により生じる新たな細胞間情報伝達 ~Wnt産生細胞の変形が神経前駆細胞の増殖を促進する~ https://www.nibb.ac.jp/press/2019/02/07.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	三井 優輔 (Mii Yusuke) (70634129)	基礎生物学研究所・分子発生学研究部門・助教 (63904)	
研究協力者	高田 律子 (Takada Ritsuko) (40450720)	大学共同利用機関法人自然科学研究機構(新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター・生命創生探究センター・研究員 (82675)	
研究協力者	篠塚 琢磨 (Shinozuka Takuma) (70869023)	基礎生物学研究所・分子発生学研究部門・特任助教 (63904)	
研究協力者	畠山 宙大 (Hatakeyama Yudai)	基礎生物学研究所・分子発生学研究部門・大学院生 (63904)	