

機関番号：63904

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20370090

研究課題名（和文） 原腸形成運動を制御するユビキチン化システムの役割

研究課題名（英文） Role of ubiquitin system in *Xenopus* gastrulation movements

研究代表者

木下 典行 (Kinoshita Noriyuki)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・准教授

研究者番号：30300940

研究成果の概要（和文）：

細胞接着分子 paraxial protocadherin (以下 P APC と略す)は、アフリカツメガエル胚発生の原腸形成運動において重要な役割を果たしていることがわかっている。我々は、P APC は原腸形成期の初期には細胞接着分子として必須であるが、後期の細胞移動期には細胞膜から除去されなければ運動が阻害されることを見いだした。さらに P APC が急速に除去される分子メカニズムを明らかにした。この P APC のタンパク質レベルでの制御メカニズムは、胚発生における細胞接着分子の局在と安定性の新しい制御機構である。

研究成果の概要（英文）：

Paraxial protocadherin (P APC) has been shown to be involved in gastrulation cell movements during early embryogenesis. It is first expressed in the dorsal marginal zone at early gastrula stage and subsequently restricted to paraxial mesoderm during gastrulation in *Xenopus* and zebrafish. Using *Xenopus* embryos, we found that P APC is regulated also at the protein level is degraded and excluded from the plasma membrane in the axial mesoderm at late gastrula stage. Our findings suggest a novel mechanism of regulation of a cell adhesion protein and that this system plays a crucial role in vertebrate embryogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：原腸形成、細胞接着、細胞運動

1. 研究開始当初の背景

秩序正しい細胞移動は、形態形成において基本的な生命現象である。アフリカツメガエルの原腸形成運動においては、背側中胚葉の細胞が極性化した形態変化を行い、さらにそれが中心線に集まる収斂伸長運動を行なう。そ

の結果、体軸が伸長して、球形から紡錘形へと胚の形が変化する。本研究は、この収斂伸長運動においては、細胞間相互作用が重要である。細胞接着分子 P APC は、細胞外ドメインにカドヘリンリピートを持つプロトカドヘリンの一つである。これまで、P APC

は原腸形成運動に必要であることはわかっていたが、その分子レベルでの制御機構は明らかではなかった。我々は、これまで原腸形成運動におけるユビキチン化の役割について研究を行ってきた。そして、PAPCが原腸形成運動においてユビキチン化の制御を受けていることを見いだした。

2. 研究の目的

本研究では、PAPCのユビキチン化システムによる制御機構を明らかにし、発生過程でのユビキチン化システムと細胞接着制御の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PAPC、E3ユビキチン化酵素、脱ユビキチン化酵素、ユビキチンなどにGFP、RFP、GSTなどのタグをつけたプラスミドを作製し、in vitroでRNA合成を行ない、アフリカツメガエル初期胚にインジェクションを行なった。また、必要に応じて、PCRによる突然変異導入を行なった。

(2) 原腸形成開始期に、背側中胚葉の外植片を切り出し、共焦点顕微鏡で観察した。細胞膜は、farnesylationシグナルをつけたGFPまたはRFPを共発現することにより可視化した。

(3) ユビキチン化は、mycタグしたユビキチン遺伝子をカエル初期胚にRNAとして導入し、GSTタグした基質タンパク質をGSTプルダウンアッセイによりユビキチンを検出した。

4. 研究成果

(1) PAPCは収斂伸長を行なう中胚葉細胞においては急速に減少する。

PAPC-GFPをアフリカツメガエル胚の中胚葉で発現させて、その動態を顕微鏡で観察した(図1a)。原腸形成期初期(st.11)の中胚葉ではPAPCは観察されるが、収斂伸長を行っているst.15の細胞では、ほとんど検出できなくなる。この減少は、プロテアソーム阻害剤では阻害されなかったが、リソゾーム阻害剤で阻害されることから、リソゾームによる分解が関わっていると考えられた。

PAPCタンパク質が減ることが発生において重要であるかどうかを検証するため、過剰発現実験を行なった。PAPCを過剰発現した胚では、収斂伸長運動が阻害され、体長の短い表現型を示す胚が多数観察された(図1b)。また、アニマルキャップアッセイにおいて、Nodal発現による伸長を、PAPCの過剰発現が阻害することもわかった。以上のことから、PAPCは、収斂伸長運動する細胞においては、PAPCは分解されることが、正常な形態形成運動に必須であることがわかった。

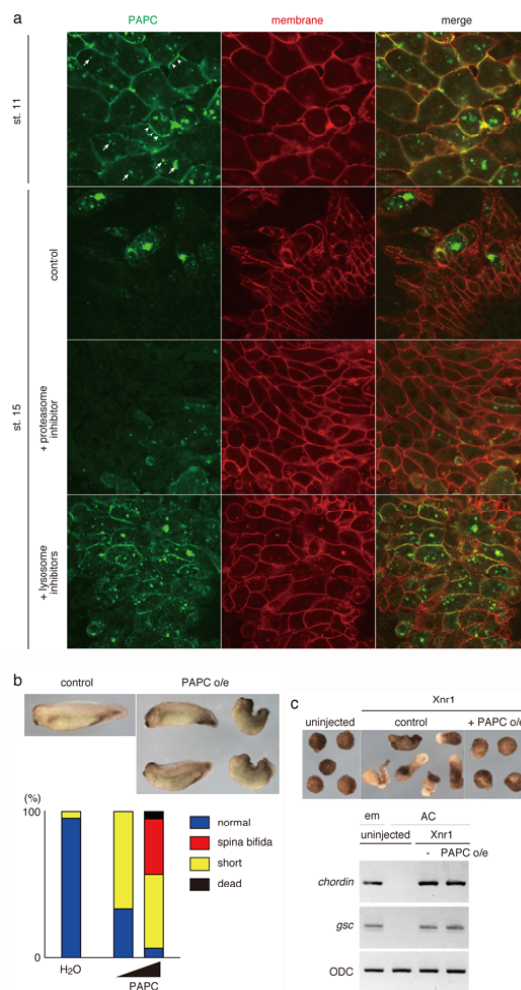


図1 PAPCのタンパク質量の制御が正常な発生過程に重要である

(2) PAPCはリン酸化により局在と安定性が変化する。

PAPCは魚類、鳥類、哺乳類でも保存されている分子である。そのなかでも特に保存性の高い領域が細胞内ドメインに存在する。この部分は約20数アミノ酸からなり、アスパラギン酸とセリンに富むことからDSRドメインと名付けた(図2a)。この領域を欠損したり、保存されているセリン残基をアラニンに置換した変異PAPC分子では、細胞膜局在が減り、細胞質に大きな塊を形成することがわかった(図2b)。また、この変異タンパク質は、収斂伸長運動期でのPAPCタンパク質レベルの低下が見られなかったことから(図2c)、分解を受けない変異と考えられる。セリンをアラニンに置換することによって安定性が変化的ことから、リン酸化による制御を考え、GSK3βのドミナントネガティブ変異遺伝子を発現させたところ、野生型PAPCがDSRドメイン変異と同様の局在と安定性を示し

た(図2d、e)。さらに、大腸菌に生成させたPAPCの細胞内ドメインのタンパク質を、リコンビナントのGSK3 β とin vitroで発現させたところ、リン酸化PAPC抗体によるリン酸化が検出された。これらの結果から、PAPCはGSK3 β によるリン酸化により、その局在と安定性が制御されていることが明らかとなった。

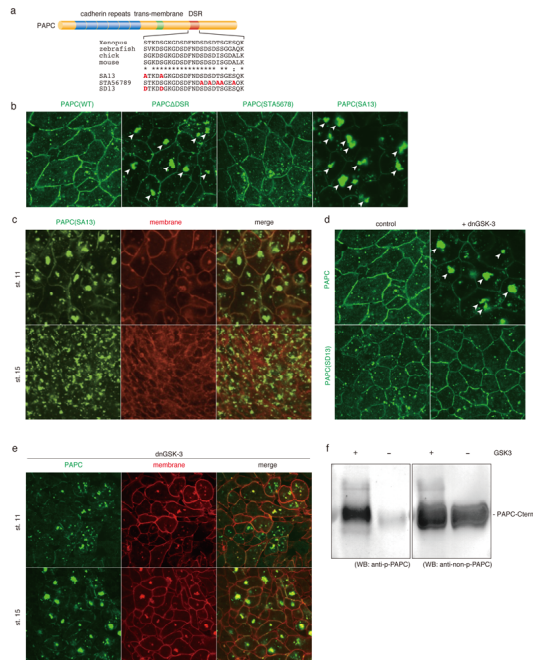


図2 PAPCはGSK3 β により制御される

(3) PAPCは β -TrCPによりユビキチン化される

PAPCの細胞内ドメインのリジン残基を全てアルギニンに置換した変異タンパク質(KR変異)を発現させたところ、DSRドメインの変異体と同様の表現型を示すことがわかった(図3a)。このことから我々は、PAPCがユビキチンによる制御を受けていると考え、ユビキチンE3リガーゼとの相互作用を検証した。その結果、E3リガーゼの一つである β -TrCPがPAPCと共局在することを見いだした(図3b)。さらに β -TrCPのドミナントネガティブ変異遺伝子(TrCP Δ F)を発現させたり、モルフォリノオリゴによりノックダウンを行なうと、PAPCはKR変異体を同様の局在、安定性を示すこともわかった(図3c、d)。さらにTrCP Δ Fは収斂伸長運動をそがいすることから、 β -TrCPによる制御が初期発生において必須であることを明らかにした。

また、mycタグしたユビキチンを用いたユビキチン化アッセイを行い、アフリカツメガエル胚において実際に、PAPCのユビキチン化が起こっていることもわかった(data not

shown)。

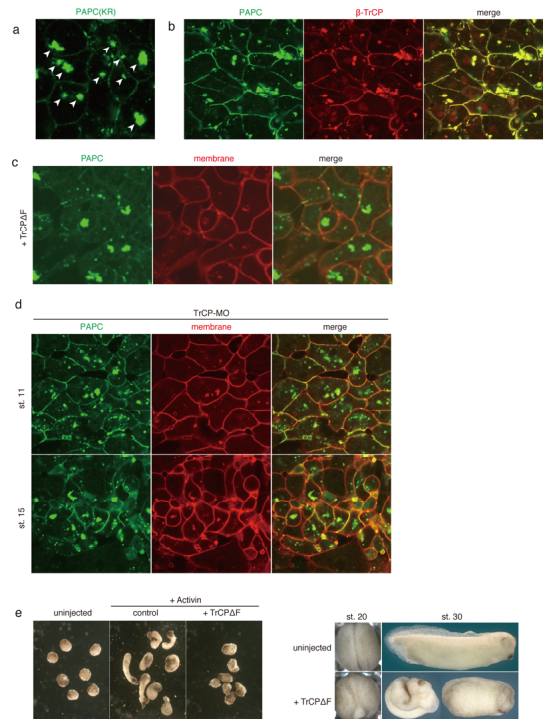


図3 PAPCは β -TrCPにより制御されている

(4) 考察

以上の結果から、PAPCはプロテインキナーゼGSK3 β によるリン酸化、そしてE3リガーゼ β -TrCPによるユビキチン化の制御を受けていることがわかった。そして、脊索を形成するための重要な細胞運動である収斂伸長運動において、この制御機構が必須であることを明らかにした。細胞膜に局在する膜タンパク質の、これらの分子による一連の制御機構はまだ報告されておらず、重要な成果として発生学、細胞生物学の分野において大きなインパクトがあると期待される。また、PAPCの属するプロトカドヘリンはガンの抑制遺伝子としても知られている。プロトカドヘリンの安定性や局在制御を明らかにした我々の成果は、医学的な分野でも重要な知見となる可能性を持っている。

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2件)

木下典行. Wnt/PCPシグナルにおけるユビキチンシステムの役割. 医学のあゆみ (査読なし) 233: 978-982 (2010).

木下典行, 脊椎動物の PCP シグナル, 実験医学 (査読なし) 26: 374-379 (2008).

[学会発表] (計 6 件)

甲斐理武, **木下典行**

Prickle と β -TrCP はツメガエル初期発生において paraxial protocadherin をユビキチン化を介して調節することにより細胞接着を制御する

日本発生生物学会

2011 年 5 月 18-21 日

沖縄コンベンションセンター

Masatake kai, **Noriyuki Kinoshita**

Dissecting biological functions of a Wnt/PCP pathway component Prickle

The 16th International Conference of the INTERNATIONAL SOCIETY OF DIFFERENTIATION

2010 年 11 月 15-18 日 奈良県立公会堂

Noriyuki Kinoshita, Masatake kai

Ubiquitin system regulates the localization of Wnt/PCP signal proteins in *Xenopus* embryonic cells

The 16th International Conference of the INTERNATIONAL SOCIETY OF DIFFERENTIATION

2010 年 11 月 15-18 日 奈良県立公会堂

木下典行

アフリカツメガエル胚細胞においてユビキチンシステムが PCP タンパク質の局在を制御する 日本発生生物学会 2010 年 6 月 21-23 日 京都国際会議場

木下典行 Wnt/PCP シグナルのユビキチン化酵素による制御 九州大学 GCOE シンポジウム 2009 年 3 月 24 日 九州大学医学部

Noriyuki Kinoshita, Wnt signalling regulates paxillin ubiquitination essential for mesodermal cell motility.

Santa Cruz Developmental Biology Meeting at University of California, Santa Cruz

2008 年 6 月 26-29 日 アメリカ合衆国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 典行 (Kinoshita Noriyuki)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・准教授

研究者番号: 30300940