

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07253

研究課題名(和文) 平面内細胞極性因子のユビキチン化が神経管閉鎖に及ぼす影響の解析

研究課題名(英文) Analysis for the ubiquitination of the planar cell polarity factors during neural tube closure.

研究代表者

永岡 唯宏 (Nagaoka, Tadahiro)

藤田医科大学・医科学研究センター・助教

研究者番号：70634864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：平面内細胞極性は細胞の頂端方向と垂直方向の細胞極性である。その極性形成メカニズムの一つとして極性因子のユビキチン化による分解があるが、その詳細にはまだ不明な点が残っている。申請者らはVangl2がPrickle2のユビキチン化・分解を促進させることを明らかにした。しかし、Prickle2のユビキチン化を担う分子の同定には至っていない。そこで、この分子を質量分析により網羅的に解析し同定することを目的としている。我々は、これまでに、この複合体に結合する新規分子RBX1とMAGEF1を見出した。後者は、細胞における遺伝子ノックダウンでPrickle蛋白質の分解を抑制することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Prickleをユビキチン化させる新規因子を解析することは、私たちの体の形を制御するのに重要な役割を果たしている平面内細胞極性形成のメカニズムの一端を明らかにすることができる。また、Nカドヘリン変異マウスやVangl2変異マウスを用いることで神経管閉鎖に於けるPrickleのユビキチン化を解析しその重要性を議論できる。また、それによって平面内細胞極性の形成過程の一端や、二分脊椎の病態の解明につながる結果が得られる可能性もあり、基礎医学から将来の臨床医学まで貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The planar cell polarity (PCP) is the apical and vertical cell polarity. One of the mechanisms of polarity formation is degradation by ubiquitination of PCP factors, but the details remain unclear. We revealed that Vangl2 promotes the ubiquitination and degradation of Prickle2. However, the molecules responsible for the ubiquitination of Prickle2 have not been identified. Therefore, we aim to comprehensively analyze and identify this molecule by mass spectrometry. We have so far found novel molecules RBX1 and MAGEF1 that bind to this complex. The latter was found to suppress the degradation of the Prickle protein upon gene knockdown in cells. Although not a molecule involved in ubiquitination, it was revealed that N-cadherin, an adhesion molecule found to interact with Vangl2, is involved in neural tube closure through genetic interaction with Vangl2. Further analysis of this interaction was performed.

研究分野：分子生物学

キーワード：平面内細胞極性 ユビキチン 神経管閉鎖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

平面内細胞極性は細胞の頂端方向と垂直方向の細胞極性です。その極性を担う蛋白質群は平面内細胞極性因子と呼ばれ、それらが細胞内で磁石の N 極、S 極のように局在することによって、細胞シート内で細胞を一定の方向に整列させています。皮膚細胞、内耳有毛細胞の整列や発生に於ける神経管閉鎖には平面内細胞極性が重要な役割を果たしています。しかし、平面内細胞極性因子の細胞内局在がどのように形成され、極性化するかは不明な点が残されています。平面内細胞極性因子の一つ Vangl2 は、4 回膜貫通型の蛋白質です。Vangl2 変異 *looptail* (Lp) マウスはホモ変異では神経管が開放する異常が起こり胎生致死となりますが、ヘテロ変異では尻尾が曲がる異常はあるものの生殖可能で、神経管閉鎖異常モデル動物として広く利用されています。

2. 研究の目的

平面内細胞極性の形成メカニズムの一つとして、平面内細胞極性因子間の作用によって一方の因子をユビキチン化させ分解することで分極を促すというものがあります。例としては、Prickle が Dishevelled のユビキチン化を促進し、分解させることが報告されています。一方、Vangl が、同じ極に局在する Prickle のユビキチン化・分解を促進させていることも他グループによるショウジョウバエの実験と、申請者らのヒト細胞株の実験から明らかになっており、対極だけでなく、同極の蛋白質間での発現蛋白質量の調節機構があることを示唆しています。しかし、Vangl が Prickle をユビキチン化させる時に Cullin1 が働くことは分かっていますが、どの F-box 蛋白質が働くかなどは不明であり、本研究でそれを明らかにし、それが神経管閉鎖でも機能しているのかどうかを解析することを目的としています。

3. 研究の方法

(1) Vangl2/Prickle2 複合体に含まれるユビキチン化因子の同定

FLAG-Vangl2 と HA-Prickle2 をヒト胎児腎由来 293T 細胞に共発現させ、その細胞抽出物を抗 FLAG 抗体カラムで精製し、エピトープペプチドで溶出しました。対照サンプルには Prickle2 との結合性を持たない C 末端領域欠失 Vangl2 を発現させた細胞抽出液を用いました。溶出サンプルは還元アルキル化及び、トリプシン消化後に、C18 カラムで精製し、NanoLC と質量分析装置 Orbitrap により LC-MS/MS 分析を行いました。Vangl2/Prickle2 複合体に含まれる因子を質量分析によって網羅的に解析し、その中からユビキチン化に関わる因子を選択しました。

(2) 候補因子と Vangl2, Prickle2 との相互作用の解析

候補因子の cDNA を神経膠芽腫 SH-SY5Y 細胞から単離し、発現プラスミドを作製し、それらを Vangl2 あるいは Prickle2 と 293T 細胞で共発現させました。その細胞抽出液を共免疫沈降して、ウェスタンブロットしました。

(3) 候補因子のノックダウンによる Prickle2 蛋白質発現への影響

候補因子の shRNA を作製し、それらを Vangl2 及び Prickle2 と共に 293T 細胞に導入しました。2 日間培養後、細胞抽出液をウェスタンブロットして Prickle2 のシグナルを観測しました。

(4) N カドヘリン/Vangl2 変異マウスの解析

N カドヘリンノックアウトマウスと *looptail* マウスを交配させて得た二重ヘテロ変異マウスの E9.5 胚から神経管を切除してその溶解物をウェスタンブロットして、Mypt1 のリン酸化を解析しました。また、神経管細胞を培養し、c-Jun のリン酸化を免疫蛍光染色により解析しました。さらに、E18.5 胚の内耳有毛細胞の細胞の配列を免疫蛍光染色により解析しました。

4. 研究成果

(1) Vangl2/Prickle2 複合体に含まれるユビキチン化因子の同定

FLAG-Vangl2, FLAG-Vangl2 delNT (N 末端欠失変異体), FLAG-Vangl2 delICT (C 末端欠失変異体), FLAG-Vangl2 delW (N, C 両末端欠失変異体) それぞれを、HA-Prickle2 と 293T 細胞で共発現させ、相互作用する蛋白質を質量分析により解析した。Prickle 結合型の Vangl2 (WT, del NT) と非結合型 (del CT, del W) との間で比較して (図 1)、シグナル強度に 2 倍以上の違いがあり、統計学的に有意な蛋白質の中に、ユビキチン化に関連する蛋白質として、RBX1, RNF181, MAGEF1 が同定されました。また、これらの蛋白質と Vangl2 及び、Prickle2 との

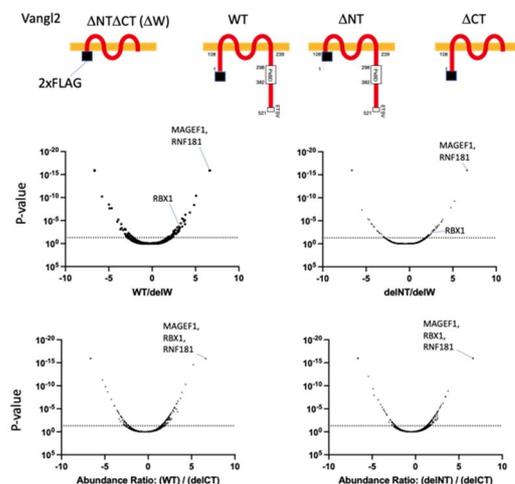


図1 Volcano plot

相互作用を調べると、RBX1はVangl2との相互作用が確認できました。RNF181はVangl2、Prickle2のどちらとも相互作用が確認できませんでした。MAGEF1は、Vangl2、Prickle2のどちらとも相互作用が確認できました(図2)。RBX1はCullin-1と共にSCF複合体を構成する因子であり、以前、我々が報告した内容(Nagaoka et al., *Sci Rep* 2019; doi: 10.1038/s41598-019-39642-z.)をサポートする結果です。

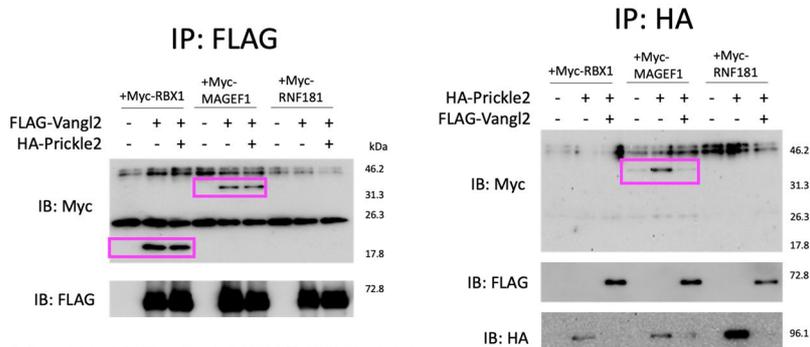


図2 共免疫沈降による蛋白質間相互作用の解析

(2) 候補因子のノックダウンによるPrickle2蛋白質発現への影響

MAGEF1 shRNAを用いて、Vangl2/Prickle2発現293T細胞のMAGEF1発現をノックダウンしたところ、Vangl2によるPrickle2の分解が抑制されることが示唆されました(図3)。さらに、MAGEF1は、RBX1とも相互作用することが示唆されました。これらの結果からは、MAGEF1がVangl2/Prickle2複合体とSCF複合体のブリッジとして働くことが示唆されます。そして、MAGEF1がVangl2やSCF複合体と協働してPrickle2の分解に関与していることが予想されます。この分子機構は、まだ報告されたことがない例と考えられ、更に研究を進めることが必要であると考えられます。

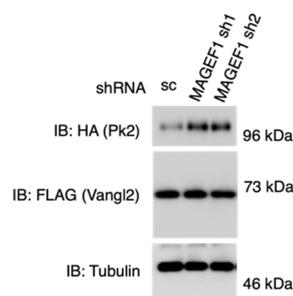


図3 Prickle2の発現

(3) Nカドヘリン/Vangl2変異マウスの解析

ユビキチン化に関わる分子ではありませんが、Vangl2と相互作用する分子として見つかった接着分子であるNカドヘリンが、Vangl2と遺伝学的相互作用により神経管閉鎖に関与することを明らかにしていました。この相互作用について更に解析を行いました。

Nカドヘリン/Vangl2相互作用が関与するシグナル伝達の解析

Vangl2が関与するシグナル伝達経路として、主にRho/ROCK経路とJNK経路が知られています。このうち、神経管閉鎖に関わるとされているのは前者です。そこで、Vangl2とNカドヘリンの二重ヘテロ変異が入ったマウス胚の神経管におけるRho/ROCK経路の下流因子であるMypt1のリン酸化を評価しました。二重変異マウス胚のMypt1リン酸化レベルは野生型や、Nカドヘリン単変異に比べると有意に低かったですが、Vangl2単変異とは有意差は同レベルでした。一方、神経管閉鎖には関与しないとされているJNK経路についても、その下流因子c-Junのリン酸化で評価しました。こちらも二重変異マウス胚のc-Junリン酸化レベルは野生型や、Nカドヘリン単変異に比べると有意に低かったですが、Vangl2単変異とは有意差は同レベルでした。このように、NカドヘリンとVangl2の相互作用で制御されるシグナル伝達経路を特定することはできませんでした。今後も更なる研究が必要であると考えられます。

内耳有毛細胞の配向に果たすNカドヘリン/Vangl2相互作用の影響

内耳蝸牛上皮の方向は平面内細胞極性によって調節されます。そこで、内耳有毛細胞の不動毛の角度を測定することにより、蝸牛上皮の一方方向性発達にVangl2とNカドヘリンの連携が必要かどうかを検討しました(図4)。E18.5野生型マウスでは、不動毛の約80%がすべての外有毛細胞(OHC)列において神経-非神経軸に向かって±10°の範囲内に配向していることが観察されました(OHC1: 82%、OHC2: 79%、OHC3: 87%)および内有毛細胞(IHC)列(83%)。また、すべての有毛細胞において、不動毛の100%が軸の±30°以内に配向していることもわかりまし

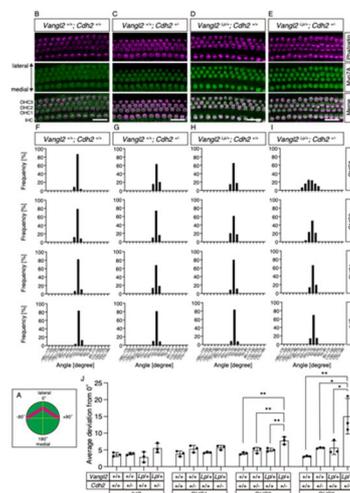


図4 Vangl2/Nカドヘリン相互作用の内耳有毛細胞の配向への影響

た。他の変異で以前に報告されているように、外側の有毛細胞は異常な Vangl2 シグナル伝達に対してより敏感に反応します。Nカドヘリンまたは *Vangl2* 単変異体の OHC3 列では、 $\pm 10^\circ$ 範囲内に配向した不動毛の頻度がわずかに減少しました (Nカドヘリン単変異: 64%、*Vangl2* 単変異: 65%)。また、 $\pm 10 \sim 30^\circ$ の範囲の割合が増加しました (Nカドヘリン単変異: 37%、*Vangl2* 単変異: 33%)。二重ヘテロ変異体では、 $\pm 10^\circ$ 範囲内の不動毛の頻度がさらに減少し (24%)、 $\pm 10 \sim 30^\circ$ の範囲が増加しました (41%)。さらに、 $\pm 30 \sim 50^\circ$ および $\pm 50 \sim 70^\circ$ の範囲内の細胞が観察されました。このように OHC2, OHC3 の細胞の配向に *Vangl2*/Nカドヘリンの遺伝学的相互作用が影響することが示唆されました。

これらの結果は、Nカドヘリンが平面内細胞極性の形成に重要な役割を果たしていることを示した、重要な研究成果であると考えられます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ohashi Riuko et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Frequent Germline and Somatic Single Nucleotide Variants in the Promoter Region of the Ribosomal RNA Gene in Japanese Lung Adenocarcinoma Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2409 ~ 2409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9112409	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 Nagaoka Tadahiro, Katsuno Tatsuya, Fujimura Kyoka, Tsuchida Kunihiro, Kishi Masashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Functional interaction between Vangl2 and N-cadherin regulates planar cell polarization of the developing neural tube and cochlear sensory epithelium	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-30213-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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永岡唯宏、勝野達也、岸将史、土田邦博
2. 発表標題 器官形成におけるVangl2とCdh2の遺伝的相互作用
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永岡唯宏、土田邦博
2. 発表標題 平面内細胞極性因子Prickle2の分解に関する新規因子の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------