

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15809

研究課題名(和文)細胞の形態変化におけるWntタンパク質の役割

研究課題名(英文)The role of Wnt proteins in morphological change of roof-plate cells

研究代表者

篠塚 琢磨(Shinozuka, Takuma)

基礎生物学研究所・分子発生学研究部門・特任助教

研究者番号：70869023

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):本研究ではWntシグナルによる細胞の形態形成の制御機構を明らかにすることを目的とし、マウス発生期の神経管におけるroof plate細胞の形態変化に着目して研究を行った。種々のWntシグナル関連因子の変異体マウスを用いた解析からroof plate細胞の頂端収縮は  $\beta$ -catenin依存的なWntシグナルによって、ミオシンのリン酸化を介して引き起こされることを見出した。さらに、roof plate細胞頂端面へのWntタンパク質の集積が頂端収縮に関与する可能性が示唆された。このように、Wntシグナルを介したroof plate細胞の頂端収縮の制御機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではWntシグナルによる細胞の形態変化の制御機構の解析を行った。細胞の頂端収縮がWnt/ $\beta$ -cateninシグナル依存的なミオシンのリン酸化によって制御されるという新たな知見は細胞生物学分野にとって重要である。また、本研究では分泌性シグナル因子であるWntタンパク質の空間分布に注目してシグナル伝達を理解することを試みた。一般的に遺伝子発現を制御するWnt/ $\beta$ -cateninシグナル伝達に関与すると考えられているWnt1およびWnt3aタンパク質の局所的な集積が細胞骨格の制御を行う可能性を示唆した点で、シグナル伝達研究の観点からも重要である。

研究成果の概要(英文): In this study, to reveal the regulatory mechanisms of the morphogenesis of the cells by Wnt signaling, we focused on the morphological change of the roof-plate cells during mouse spinal cord development. First, we found that phosphorylation of myosin light chain specifically induced in the apical surface of the roof-plate cells coincident with morphological change of the roof-plate cells. To reveal the molecular mechanisms of the phosphorylation of the myosin light, we analyzed some knock-out mouse lines which are related in Wnt signaling pathway. We concluded that Wnt/ $\beta$ -catenin signal regulate apical constriction in the roof-plate cells via phosphorylation of myosin light chain.

研究分野: 発生生物学

キーワード: Wnt roof plate 細胞骨格 形態形成

## 1. 研究開始当初の背景

Wnt をはじめとする分泌性シグナルタンパク質を介した細胞間シグナル伝達は細胞の分化や組織の領域化などに重要であり、発生現象の様々な局面でシグナル伝達経路を使い分け、細胞の運命や特徴を規定している。

Roof plate 細胞は神経管の最も背側に存在する神経上皮細胞で、Wnt1 と Wnt3a を特異的に発現し、神経発生初期の背側神経管の神経上皮細胞の領域化と増殖を制御することが知られていた。しかし、神経発生後期の roof plate 細胞の形態や Wnt の発現、機能については明らかになっていなかった。

私達のこれまでの研究から、発生過程の神経管において roof plate 細胞が背腹軸に沿って伸長することを見出した。細胞外への Wnt の分泌に必須の因子である *Wntless* を roof plate 細胞特異的にノックアウトしたマウス (*Wls* cK0) では、roof plate 細胞の伸長および細胞形態が異常になることから、roof plate 細胞の形態変化には Wnt シグナルが必要であることが示唆された。しかし、roof plate 細胞の形態変化が Wnt シグナルによってどのように制御されるのかという問題は未解決のままである。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞の形態形成・形態変化における Wnt シグナルの役割を明らかにするため、胚発生期のマウス神経管における roof plate 細胞の伸長機構の解明を目的とする。

私達のこれまでの観察から、roof plate 細胞の形態変化には以下に挙げる 2 つの段階があり、それぞれに Wnt シグナルが関わっていることが示唆されている。

(1) E10.5 日胚の roof plate 細胞では頂端面が収縮し、細胞がくさび型の形態をとっている。一般的に上皮細胞における頂端収縮では細胞の頂端面においてアクトミオシン細胞骨格が収縮することで細胞が変形する。*Wls* cK0 マウスでは roof plate 細胞の頂端側が広がっていることが観察された。このことから、roof plate 細胞の頂端側の収縮には Wnt シグナルを介したアクトミオシン細胞骨格の制御が関わっている可能性が示唆される。

(2) E13.5 日以降に、頂端-基底軸に沿って roof plate 細胞が長い突起を伸長させる。伸長した roof plate 細胞には Nestin などの中間径フィラメントが豊富に存在し、頂端-基底軸に沿って配向していることを見出した。*Wls* cK0 マウスでは Nestin の局在が乱れ、roof plate 細胞の伸長が異常になることから、伸長した roof plate 細胞の形態保持には Wnt シグナルを介した細胞骨格の制御が関わっている可能性が示唆される。

そこで本研究では、発生過程の roof plate 細胞の (1) 頂端面の収縮および、(2) 頂端-基底軸に沿った伸長に着目し、「細胞の形態形成における Wnt シグナルによる細胞骨格の制御メカニズム」の解明に取り組む。

## 3. 研究の方法

本研究では roof plate 細胞の伸長過程を詳細に記述し、細胞の形態変化における細胞骨格の変化とそれに関与する Wnt タンパク質の役割の解析し、Wnt シグナルによる細胞の形態変化の制御機構の解明を試みた。

まず、実際に roof plate 細胞で頂端収縮が起こる時期を明らかにするため、roof plate の細胞形態を経時的に観察するとともに、細胞骨格関連因子の免疫染色を行い共焦点顕微鏡による解析を行った。次に、Wnt シグナル関連因子および細胞骨格関連因子の欠損マウスの解析を行い、Wnt シグナルによる細胞の形態変化の制御メカニズムの解明を試みた。具体的には、Wnt シグナルの関連因子として、Wnt タンパク質の分泌に必須な *Wls*、Wnt リガンドである *Wnt1*、*Wnt3a*、Wnt シグナルの細胞内での制御因子  $\beta$ -catenin、アクチンと細胞膜に結合する *Ezrin*、*Radixin* の変異マウスを用いて、roof plate 細胞の形態と細胞骨格の構成因子の局在の解析を行った。さらに、roof plate 細胞特異的に頂端収縮を引き起こされる分子メカニズムを明らかにするため、*EGFP-Wnt3a* ノックイン (KI) マウスを用いて Wnt タンパク質の空間局在の解析を行った。Wnt タンパク質の空間局在を制御する候補因子として、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) に着目し、その糖鎖伸長酵素である *Ext1* の変異マウスを用いて、Wnt の空間局在および、頂端収縮に与える影響の解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) Roof plate 細胞における頂端収縮

まず roof plate 細胞で実際に頂端収縮が起こる時期を明らかにするため、roof plate の細胞形態を経時的に解析した。E9.5 日胚では、roof plate 細胞は円筒型をしていたのに対し、E10.5 日胚では頂端側が収縮し、roof plate の細胞形態が楔型へと変化することが見出された。一般的に、上皮細胞の頂端収縮はミオシンのリン酸化を介したアクトミオシン細胞骨格の収縮によって制御されると考えられている。そこで、ミオシン軽鎖のリン酸化を免疫染色により検出した。E9.5 日胚ではミオシンのリン酸化が神経管の頂端側全体で観察されたのに対し、E10.5 日および、

びに E11.5 日胚では roof plate 領域の頂端側に限局した。これらの結果からマウス神経管の roof plate 細胞では E10.5 日から頂端収縮が引き起こされることが明らかになった。

#### (2) Roof plate 細胞の頂端収縮に Wnt シグナルが必要である

次に、Wnt シグナルによって roof plate 細胞のアクトミオシン細胞骨格が制御されているかどうかを検証するため、Wnt の分泌に必須の因子である *Wls* を *Wnt1-cre* を用いて roof plate 特異的に欠損した *Wls* cKO マウスを用いた解析を行った。*Wls* cKO マウスでは E10.5 日および E11.5 日胚において roof plate 細胞の頂端側が広がっていることが見出された。さらに、アクトミオシン細胞骨格への Wnt シグナルの影響を解析するため、アクチン、ミオシン、リン酸化ミオシンの免疫染色を行った。野生型胚と同様に *Wls* cKO 胚においてもアクチン、ミオシンは神経管の頂端側全体で観察された。一方、リン酸化ミオシンのシグナルは野生型胚では roof plate 細胞の頂端側に限局して見られるのに対して、*Wls* cKO 胚ではミオシンのリン酸化が有意に減少した。これらの結果から Wnt シグナルはアクチン、ミオシンの局在ではなく、ミオシンのリン酸化を制御することで頂端収縮を引き起こすことが明らかになった。

#### (3) Roof plate 細胞の頂端収縮に関わる Wnt リガンド

Roof plate 細胞の頂端収縮とそこでのミオシンのリン酸化に Wnt の分泌が必要であることが示唆された。そこで、次に、ミオシンのリン酸化に関わる Wnt リガンドの探索を行った。発生過程の roof plate 細胞では *Wnt1* と *Wnt3a* が特異的に発現している。そこで、これらの *Wnt* が roof plate 細胞の頂端収縮に必要であるかを検証するため、*Wnt1*, *Wnt3a* のダブルノックアウト (DKO) マウスを作製した。E11.5 日の *Wnt1*, *Wnt3a* DKO 胚では、roof plate 細胞の頂端面が拡大し、さらに roof plate 特異的なミオシンのリン酸化が有意に減少した。これらの結果から、roof plate 細胞から分泌される *Wnt1* と *Wnt3a* によってアクトミオシン細胞骨格が活性化され、頂端収縮が引き起こされることが示唆された。

#### (4) Roof plate 細胞の頂端収縮は $\beta$ -catenin 依存的に引き起こされる

一般に、*Wnt1* と *Wnt3a* は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路を誘導し、 $\beta$ -catenin 依存的に Wnt の標的遺伝子の転写を制御すると考えられている。そこで、roof plate 細胞の頂端収縮が Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路を介して引き起こされるかを明らかにするため、 $\beta$ -catenin の機能阻害および機能亢進実験を行った。まず、*Wnt1-cre* を用いて roof plate 細胞特異的な  $\beta$ -catenin cKO マウスを作製した。E10.5 日の  $\beta$ -catenin cKO 胚では roof plate 細胞の頂端面の拡大する表現型が観察された。また、roof plate 細胞におけるミオシンのリン酸化の減少も見出された。次に、*Wls* cKO 胚において、 $\beta$ -catenin の機能亢進による表現型のレスキュー実験を行った。 $\beta$ -catenin exon3 の欠損は恒常活性型として働くことが知られている。そこで、*Wls* cKO マウスと  $\beta$ -catenin exon3 flox マウスを交配し、roof plate の細胞形態の解析を行った。上述したように、E10.5 日の *Wls* cKO 胚では roof plate 細胞の頂端面が拡大したのに対し、*Wls* cKO マウスに恒常活性型  $\beta$ -catenin を発現させると野生型と同様に roof plate 細胞の頂端面が収縮し、表現型がレスキューされた。これらの結果から Wnt シグナルによって誘導される roof plate 細胞における頂端収縮は  $\beta$ -catenin 依存的であることが示唆された。

#### (5) ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) による頂端収縮の制御

Roof plate 細胞の頂端収縮は非常に限定された領域、時期に観察される。一方で、*Wnt1*, *Wnt3a* の roof plate における mRNA 発現は頂端収縮が起こる前から発生後期まで維持されている。そこで、頂端収縮が時期・場所特異的に引き起こされる分子メカニズムを明らかにするため、Wnt タンパク質の空間局在に着目した。*EGFP-Wnt3a* KI マウスの解析から、E9.5 日胚では Wnt タンパク質が roof plate 細胞全体で見られるのに対して、E10.5 日胚では Wnt タンパク質が roof plate 細胞の頂端側に集積することを見出した。また、E13.5 日以降では Wnt タンパク質が roof plate 細胞全体に広く分布していることは既に私達が報告している。これらの結果から、Wnt タンパク質は、頂端収縮の起こる時期に roof plate 細胞の頂端側に集積し、細胞の形態変化を制御している可能性が示唆された。この可能性を検証するため、HSPG に着目した。HSPG は Wnt をはじめとする分泌性シグナル因子と結合し、その空間局在やシグナル伝達を制御することが知られている。そこで、HSPG の糖鎖の伸長酵素である *Ext1* を roof plate 特異的に欠損した *Ext1* cKO マウスの解析を行った。*Ext1* cKO 胚では Wnt タンパク質の頂端側への集積が減少するとともに、roof plate 細胞の頂端収縮が阻害された。これらの結果から Wnt シグナルの頂端側への集積が頂端収縮に関与する可能性が示唆された。

#### (6) ERM ファミリーによる roof plate 形態変化の制御

私達の以前の研究から、E13.5 日以降 roof plate 細胞が頂端-基底軸に沿って伸長し、その伸長には Wnt シグナルが関与することが示唆された。そこで、roof plate 細胞伸長の分子メカニズムを明らかにするため、roof plate 細胞で発現しアクチンと細胞膜に結合する ERM ファミリータンパク質の Ezrin と Radixin に着目し、roof plate 細胞の頂端-基底軸に沿った伸長が

顕著となる E13.5 および E14.5 日胚の *Ezrin*, *Radixin* DKO マウスを用いて roof plate の形態解析を行った。*Ezrin*, *Radixin* DKO マウスでは *Wls* cKO マウスと同様に roof plate の伸長が阻害された。これらの結果から ERM ファミリーが roof plate の伸長に関わることを見出した。

#### (7) 今後の展望

本研究により、マウス神経管の roof plate 細胞では E10.5 日にミオシンのリン酸化が特異的に誘導され、頂端収縮が引き起こされることが示された。また、Wnt シグナル関連因子の変異マウスを用いた解析から、roof plate 細胞特異的に発現する Wnt1 および Wnt3a タンパク質の分泌によって、roof plate 細胞で  $\beta$ -catenin 依存的な Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが活性化され、これによりミオシンがリン酸化されることで頂端収縮が引き起こされることが示唆された。このように、Wnt シグナルによる細胞の形態変化の制御メカニズムの一端が明らかになった。しかし、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルによって発現が誘導され、ミオシンのリン酸化を促進する因子はまだ明らかになっていない。また、神経発生の初期に roof plate 細胞で起こる頂端収縮が、その後の細胞伸長を誘導し、成熟した組織の形態形成に関わっているかどうかは、今後の課題として残されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takuma Shinozuka and Shinji Takada	4. 巻 9
2. 論文標題 Morphological and Functional Changes of Roof Plate Cells in Spinal Cord Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jdb9030030	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takuma Shinozuka and Shinji Takada
2. 発表標題 Regulatory mechanism of morphological change of roof-plate cells in the mouse spinal cord
3. 学会等名 53rd annual meeting of the JSDB
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takuma Shinozuka and Shinji Takada
2. 発表標題 Wnt-dependent mechanism of the apical constriction of roof-plate cells in the mouse spinal cord
3. 学会等名 54th annual meeting of the JSDB
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 篠塚琢磨、高田慎治
2. 発表標題 マウス神経管発生過程におけるWnt産生細胞の形態変化の制御と意義
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------