

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月30日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657132

研究課題名（和文） 二機能性制御因子によるWntシグナルデジタル処理機構の解明

研究課題名（英文） Clarification of the molecular mechanisms that degitimize Wnt signaling.

研究代表者

石谷 太 (ISHITANI TOHRU)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：40448428

研究成果の概要（和文）：

脊椎動物の組織・器官の軸（極性）形成過程においては、細胞外のWnt分子の濃度というアナログ情報が特定の遺伝子群の選択的な発現制御というデジタル情報へと変換される。本研究ではこのシステムの解明に取り組み、DP1という分子が、脊椎動物初期胚の神経板においてWntシグナルデジタル処理に貢献していることを見いだした。また、Wntシグナルの活性強度を生きた脊椎動物で観察する新たな実験系を開発した。

研究成果の概要（英文）：

During axis-formation in vertebrate tissues, cells sense the concentration of Wnt ligands and convert its information into the digital information that directs the regulation of selective gene expression. In this study, we investigated this Wnt signaling-degitizing system and found that DP1 protein is involved in this system. We also generated the new experimental systems for observing Wnt signaling activity in living animals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3000000	900000	3900000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学・細胞内情報伝達

キーワード：Wntシグナル

1. 研究開始当初の背景

Wnt-βカテニンシグナル（本稿ではWntシグナルと略）は組織・器官の構築において必須の働きをするシグナルである。これまでに、Wntシグナルの伝達機構は、すでに大要が明らかになっている。まず、Wntシグナルがオフ状態の細胞では、“分解装置”がβカテニンタンパク質をユビキチン化して分解に導いており、Wntシグナル標的遺伝子の発現は抑制された状態になっている。一方、細胞が細胞外リガンド分子Wntを受容するとWntシグナルがオン状態になり、その結果、Dvlタンパク質が分解装置を細胞膜にリクルートしてその働きを抑制してβカテニンを

安定化する。安定化したβカテニンは核内に移行して転写因子Tcf/Lefと複合体を形成し、Wntシグナル標的遺伝子の転写を活性化する。

Wntシグナルは、脊椎動物の組織・器官の前後・背腹軸（極性）の形成に必須の役割を果たしている。軸（極性）形成の際、Wnt分子が局在する発生源から濃度勾配を持って発せられ、その濃度に応じた強さのシグナルを細胞に入力し、その結果として、連続した組織空間内で各領域ごとに異なるセットの遺伝子群の発現制御を行い、各領域ごとに異なる複数種の細胞運命を誘導する。しかしながら、Wnt分子の濃度勾配やWntシグナル

の入力強度勾配は比較的なだらかであり、組織空間内で隣接する細胞が受け取る“シグナル入力”の強さに大きな差はない。それにも関わらず、構築中の組織内では、Wnt 分子濃度に応じて隣接する細胞群がそれぞれに違う運命を選択する。おそらくこの過程においては、「アナログ方式で入力される Wnt シグナル入力をデジタル処理し、特定のセットの遺伝子発現制御を導くシステム」が存在すると考えられる。しかしながら、そのような“Wnt シグナルデジタル処理機構”はほとんど不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、「アナログ方式で入力される Wnt シグナル入力をデジタル処理するシステム」の存在と実体を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

私たちは本研究開始以前に、状況に応じて Wnt シグナルを正にも負にも制御する因子“二機能性因子”として DP1 などを発見していた。本研究では、二機能性因子に特に注目し、Wnt シグナルのデジタル処理機構を解析した。

また、“Wnt シグナル可視化ゼブラフィッシュ”を作成し、Wnt シグナルデジタル処理”の実体解明を試みた。

4. 研究成果

(1) DP1 は中枢神経組織の前後軸形成において Wnt シグナルのデジタル処理を行う (Kim et al. EMBO J 2012)

中枢神経組織は、前脳等の前側神経組織と後脳・脊髄などの後側神経組織からなるが、このような前後極性は、中枢神経組織の原基である神経板において決定される。神経板の前後軸（極性）形成の際には、Wnt 分子が後方組織から濃度勾配を持って発せられる（図 1 上段）。Wnt 分子濃度の濃い後方神経板では後方神経組織の形成に必要な遺伝子の発現が誘導され、Wnt 分子の少ない前方神経板では前方神経組織の形成に必要な遺伝子の発現が誘導される。この濃度勾配と合致するように、これまでの研究により、後方神経組織の形成に必要な遺伝子の発現には、強い Wnt シグナルの入力が必須であり、一方、後方神経組織の形成に必要な遺伝子の発現には、Wnt シグナルの抑制が必要であることがわかっていた。しかしながら、神経板の前後軸に沿った Wnt 分子の緩やかな濃度勾配のみで、神経板の前方組織と後方組織に明確な違いを生み出せるとは考えにくかった。

一方で私たちは、韓国ソウル大学との共同研究により Dimerization Partner 1 (DP1) という分子が、Wnt 分子の有無に依存して Wnt

シグナルを正にも負にも制御する二機能性因子であることを発見した。具体的には、DP1 が Wnt 分子を添加したヒト細胞株においては、核内でタンパク質リン酸化酵素 NLK による転写因子 Tcf/Lef の抑制を解除することで Wnt シグナル標的遺伝子の発現を増強し（図 2 の右パネル）、Wnt を添加していない細胞株では、細胞質で Dvl と Axin というタンパク質に結合することで β カテニンを不安定化し、これにより Wnt シグナル標的遺伝子の発現を低下させることがわかった（図 2 の左パネル）。

図 1) 神経板の前後軸と DP1

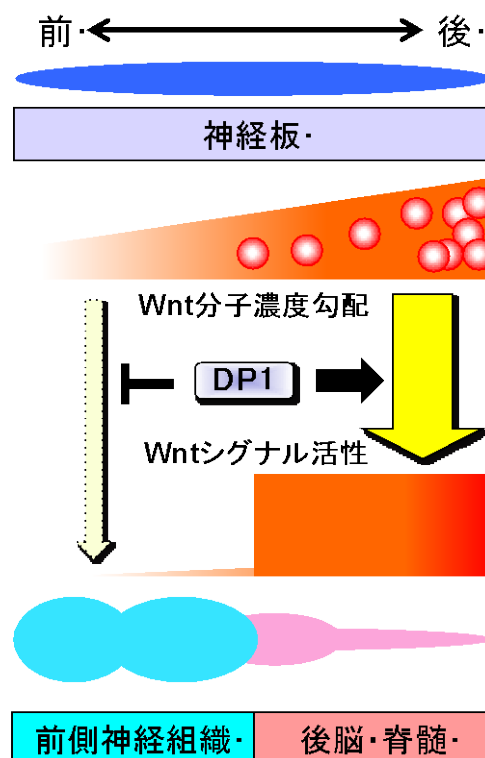
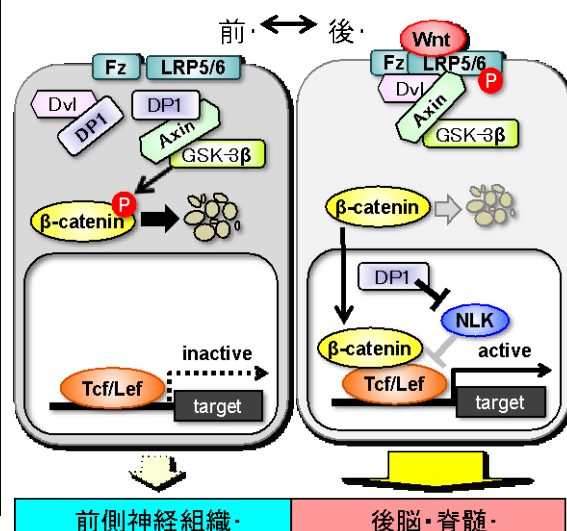


図 2) DP1 によるデジタル化



さらに、アフリカツメガエル初期胚を用いた DP1 の機能解析により、DP1 が神経組織の前後軸形成に貢献することを発見した。具体的には、DP1 が Wnt 分子濃度の低い前方組織では上述の β カテニン不安定化促進機構を介して Wnt シグナル活性をさらに抑制して前方神経組織の形成に必要な遺伝子の発現を促進し (図2の左パネル)、Wnt 分子濃度の高い後方組織では NLK 抑制を介して Wnt シグナル活性を増強することにより、後方神経組織の形成に必要な遺伝子の発現を促進すること (図2の右パネル) を示した。このように、DP1 は細胞外の Wnt 分子の濃度差というアナログ情報を Wnt シグナルの ON/OFF (強い活性化状態と完全な不活性化状態) というデジタルな情報に変換することで、前方組織と後方組織の明確な境界を生み出していると考えられる。

(2) 高感度 Wnt シグナル可視化システムの構築 (Shimizu et al. Dev Biol 2012)

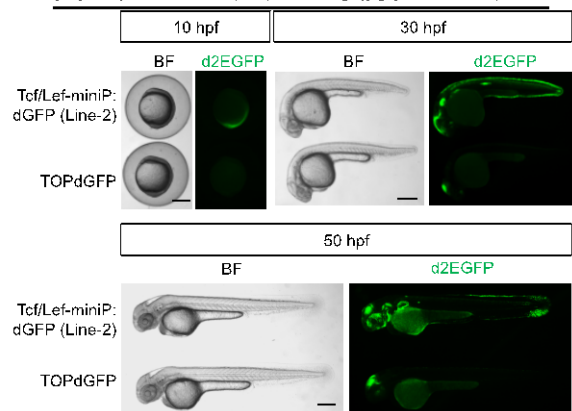
組織構築における Wnt シグナルの活性動態を把握する為、胚が透明でライブイメージングに適したモデル脊椎動物であるゼブラフィッシュにおいて、Wnt シグナルの転写因子 Tcf/Lef の活性を可視化するシステムを構築した。

ゼブラフィッシュにおける Tcf/Lef の活性の可視化は、すでに前例があった。この例では、TOPdGFP と呼ばれる、4 つの Tcf/Lef 結合配列の下流に c-fos 遺伝子の最小プロモーターと d2EGFP レポーター遺伝子を連結したレポーター遺伝子をゼブラフィッシュに組み込むことで Tcf/Lef 活性を可視化していた。しかしながら、TOPdGFP を用いたこの系では、Wnt シグナルが活性化する一部の組織や器官でしか d2EGFP 活性を可視化できていなかった。そこで、TOPdGFP の改良を行った。TOPdGFP の最小プロモーターには、基本転写因子が結合する TATA 配列に加え、c-fos 遺伝子由来の配列が含まれており、これが TOPdGFP のレポーター活性に影響を与えている可能性が考えられた。そこで、新たなレポーターには、最小プロモーターとして、プロメガ社が開発した最小プロモーター miniP を採用した。miniP は、生物由来の配列を含まない、非特異的なシグナルの影響を最小限に抑えるように人工的に設計された最小プロモーターである。また、レポーターの感度を上昇させる為に転写因子 Tcf/Lef の結合する配列を 4 つから 6 つに増やした。このようにして新たに作成したレポーター Tcf/Lef-miniP:dGFP を、Tol2 トランスポゾンを用いてゼブラフィッシュ個体に導入し、3 つの系統 Line-1, -2, -3 を樹立した。Line-1 はレポーター遺伝子を 4 つもつ系統であり、Line-2 と Line-3 はレポーター遺伝子がゲノ

ム上の違う位置に一つずつ挿入されている系統である。Line-2 と TOPdGFP トランスジェニックゼブラフィッシュのレポーター活性を比較したところ、Line-2 は、受精後 10 時間 (10 hpf) ごろの後方組織や、受精後 30-50 時間 (30-50 hpf) ごろの背側中脳、耳胞、視床下部、後方側線原基、胸ビレ、正中ヒレ膜などの Wnt シグナルの活性化が報告されている多様な領域で d2EGFP の発現 (緑色蛍光) が観察されたのに対し、TOPdGFP フィッシュでは背側中脳でしか d2EGFP による蛍光を観察できなかった (図3)。また、これらの d2EGFP の発現は、阻害剤等を用いた Wnt シグナルの時期特異的機能阻害により阻害された。したがって、Line-2 は Wnt シグナル (Tcf/Lef) の活性を反映したレポーター活性を高感度に示す優れた系統であると考えられる。また、Line-1、Line-3 も Wnt シグナル活性を反映したレポーター活性を示すことや、3 つの系統が同様の時期部位で d2EGFP を発現することも確認した。加えて、新たな系統 Tcf/Lef-miniP:dGFP トランスジェニックフィッシュは、初期胚発生から器官構築、組織再生などの既知の Wnt シグナル活性化領域ほぼ全てにおいてレポーター活性を示した。さらに、モルフォリノを用いた機能阻害実験により、Tcf/Lef-miniP:dGFP トランスジェニックフィッシュのレポーター活性が Tcf/Lef ファミリーの転写因子である Lef1、Tcf1(Tcf7)、Tcf3(Tcf711a)、Tcf4(Tcf712) に依存したものであることが分かった。

このように、本研究により、胚発生、組織・器官構築の過程における Wnt シグナル (Tcf/Lef) の活性を高感度に可視化するシステムを構築することが出来た。現在、このシステムを用いて、Wnt シグナルのデジタル処理機構の解析を進めている。

図3) Wnt シグナル可視化システム



(2) “超” 高感度 Wnt シグナル可視化システムの構築 (投稿準備中)

上述のように、Tcf/Lef の活性を d2EGFP

の発現に変換して可視化することに成功したが、この系で可視化に使用されているd2EGFPは、転写から蛍光能の獲得までの時間が比較的長く、またタンパク質としての半減期が2時間で細胞内での安定性が比較的高いため、d2EGFPを用いた方法では *in vivo* における Wnt シグナルの活性変動をリアルタイムで可視化することができていない。加えて、d2EGFPの放つ蛍光は、細胞や組織の持つ自家蛍光、励起光の対象組織へのあたりムラ等、干渉要素が多く、定量には不向きである。このような d2EGFP の持つ問題点故に、従来の方法では *in vivo* における Wnt シグナルの活性を定量的に測定することが不可能であった。この問題を解決するためには、d2EGFP よりも定量性に優れたレポーターを用いた新しいトランスジェニックシステムを作製する必要がある。

発光酵素ルシフェラーゼは、その感度の高さや定量性に優れていることから細胞生物学や創薬アプリケーションなどで転写活性のモニタリングに広く利用されている。その中でも、ヒカリコメツキムシ (*Pyrearinus termitilluminans*) 由来のエメラルドルシフェラーゼ (Emerald Luciferase:ELuc) はホタル由来のルシフェラーゼと同じ D-ルシフェリンを発光基質とするが、その発光強度は *in vivo*、*in vitro* いずれのアッセイにおいても従来の蛍光ルシフェラーゼよりも高い。さらに、ELuc の細胞内での半減期を短くするために、その C 末端側に PEST 配列と呼ばれるタンパク質分解を促進する配列を付加した Eluc-PEST が既に開発されている。そこで本研究では、ELuc-PEST を用いて、ゼブラフィッシュにおける Tcf/Lef (Wnt シグナル) の活性の定量的な可視化に挑戦した。

まず、Tcf/Lef-miniP:dGFP レポーター遺伝子の d2EGFP を Eluc-PEST にすげ替えた Tcf/Lef-miniP:Eluc-PEST を作成して、これをゼブラフィッシュに Tol2 システムを用いて導入し、系統化した。続いて、作成した系統におけるレポーターの発現パターン (Eluc-PEST mRNA の発現パターン) を *in situ* ハイブリダイゼーションにより解析し、Tcf/Lef-miniP:dGFP トランスジェニックフィッシュと同様の発現パターンを示すことを確認した。さらに、発光イメージングシステムを用いて、作成した系統において Wnt シグナル活動領域を発光により検出することも確認した。今後この系統を用いて、Wnt シグナルのデジタル処理機構をさらに詳細に解析して行く予定である。

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)

1. Shimizu N, Kawakami K, *Ishitani T. Visualization and exploration of Tcf/Lef function using a highly responsive Wnt/ β -catenin signaling-reporter transgenic zebrafish. 2012. Developmental Biology, 370. 71-85 doi: 10.1016/j.cellsig.2012.09.017.
2. Kim WT, Kim H, Katanaev VL, Joon Lee S, Ishitani T, Cha B, Han JK, *Jho EH. Dual functions of DP1 promote and stabilize biphasic Wnt-on and Wnt-off states during anteroposterior neural patterning. 2012. EMBO Journal, 31. 3384-3397 doi: 10.1038/emboj.2012.181.

[学会発表] (計 3 件)

1. Nobuyuki Shimizu, Tohru Ishitani, Analysis of the spatiotemporal dynamics and its regulatory mechanisms of Wnt/ β -catenin and Hedgehog signaling pathways using the transgenic zebrafish lines carrying the signaling reporters., 第17回小型魚類研究会, 東レ総合研修センター, 2011年9月8日
2. Tohru Ishitani, Shizuka Ishitani, A dual and opposite role of NLK-mediated Lef1 phosphorylation on the Wnt/ β -catenin signaling, 第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同年会, 神戸国際会議場, 2012年5月31日
3. Nobuyuki Shimizu, Koichi Kawakami, Tohru Ishitani, Exploration of Tcf/Lef function using a highly responsive Wnt/ β -catenin signaling-reporter transgenic zebrafish, 第18回小型魚類研究会, 京都大学, 2012年9月22日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/crs/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石谷 太 (ISHITANI TOHRU)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号: 4 0 4 4 8 4 2 8