

## 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26年 5月 17日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770139

研究課題名（和文）非定型カドヘリンの細胞外領域リン酸化の生理機能の解明

研究課題名（英文）Studies on the physiological functions of the extracellular phosphorylation of atypical cadherins

## 研究代表者

石川 裕之（ISHIKAWA HIROYUKI）

千葉大学・大学院理学研究科・特任准教授

研究者番号：00398819

研究成果の概要（和文）：非定型カドヘリンの一種であるFatは、ショウジョウバエの発生において組織の成長と平面細胞極性を制御する。本研究では、非定型カドヘリンの細胞外カドヘリンドメインのリン酸化の生体内における役割を、トランスジェニックショウジョウバエを用いて明らかにすることを試みた。その結果、Fatの3番目のカドヘリンドメインのリン酸化は、ショウジョウバエにの正常な発生に必要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Fat is an atypical cadherin that regulates growth and planer cell polarity in Drosophila development. In this study, we focused on the physiological roles of extracellular phosphorylation of Fat cadherin domains, by using transgenic flies. We found that phosphorylation of the third cadherin domain of Fat is required for normal development in Drosophila.

## 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	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞生物学・生化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：翻訳後修飾、カドヘリン、ゴルジ体キナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の発生や恒常性の維持においては、細胞間のコミュニケーションが重要な役割を果たしている。カドヘリンファミリーに属する細胞膜タンパク質Fatは、一般的な、いわゆる古典的カドヘリンが5個の細胞外カドヘリンドメインを有するのに対して、34個のカドヘリンドメインを有する非定型カドヘリンである。近年の研究により、Fatは、組織の成長と平面細胞極性を制御するシグナル伝達経路（Fatシグナル）の受容体であ

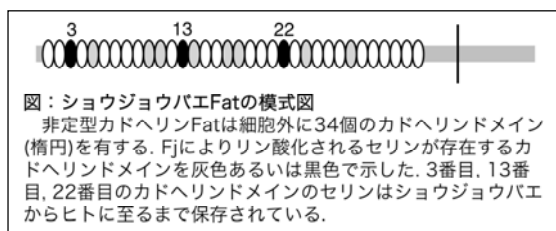
ることが明らかにされた。

Fatシグナル構成因子の多くは、ショウジョウバエを用いた遺伝学的スクリーンにより同定されているが、そのなかに機能未知のFatシグナル調節因子four-jointed(fj)が存在した。ショウジョウバエを用いた解析により、fjはfatあるいはFatのリガンドである別の非定型カドヘリンdachous(ds)に作用することよりFatシグナルを調節すること、FjはII型の膜タンパク質でありゴルジ体に局在すること、が明らかにされていた。しか

し、ゴルジ体タンパク質 Fj の分子機能は不明であった。そこで申請者は、Fj は、Notch シグナルにおける糖転移酵素 Fringe のごとく、Fat と Ds の細胞外ドメインに糖を付加することにより Fat と Ds の結合を調節する糖転移酵素であると予測して、Fj の生化学的機能解明を行った。その結果、予想外なことに、Fj は、Fat と Ds の細胞外カドヘリンドメイン上の特定の箇所のセリンをリン酸化するゴルジ体キナーゼであることが分かった。Fj は分子として初めて同定されたゴルジ体キナーゼである。

## 2. 研究の目的

次に、全長のカドヘリンドメインを用いたショウジョウバエ Fat と Ds の *in vitro* 結合実験系を構築し、Fj による Fat のカドヘリンドメインのリン酸化が、Fat と Ds の結合に与える影響を生化学的に調べた。その結果、リン酸化されていない Fat と Ds の結合は検出されないが、Fat が Fj によりリン酸化されると、Fat と Ds は結合することが分かった。すなわち、Fat のカドヘリンドメインのリン酸化は Ds との結合に必要である。また、Fat はショウジョウバエからヒトに至るまで保存された分子であり、カドヘリンドメインの数は種を越えて 34 個である(図)。申請者は、ショウジョウバエ Fat において、Fj によりリン酸化される 11 箇所のセリンのうち、3 箇所(3 番目、13 番目、22 番目)のカドヘリンドメインのセリンはショウジョウバエからヒトに至るまで保存されていることを見いだした(図)。



そこで、生化学的に Fj の最も良い基質となることが既に明らかにされている、3 番目のカドヘリンドメインのセリンをリン酸化を受けないアラニンに置換した変異型 Fat を用いた結合実験を行った。その結果、Fj によりリン酸化された Fat と Ds の結合は、野生型 Fat を用いた場合と比較して約 60% に低下した。この結果は、Fat の 3 番目のカドヘリンドメインのリン酸化は、Fat と Ds の結合に重要であることを示している。一方でこの結果は、リン酸化されていない Fat と Ds の結合は検出されないことを考えると、3 番目以外のカドヘリンドメインのリン酸化の重要性を示している。

*in vitro* 結合実験における 60% の結合の低下は、生体内で意味を持つ低下であるのか生化学的実験で明らかにすることはできない。そこで、ショウジョウバエを用いた *in vivo* の実験により、生体内での Fat の機能発現に必要な十分なリン酸化部位を同定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

Fat の生体内での機能に必要なカドヘリンドメインのリン酸化部位を同定するために、fat 遺伝子を含む BAC クローンを用いたショウジョウバエ fat 変異体の *in vivo* レスキュー実験を行う。fat 遺伝子を含む約 40 kb の BAC クローンは fat 変異体の表現型を救済することができる。この BAC クローンに大腸菌内での Recombineering を用いて変異を導入する。種間で保存されている 3 箇所のカドヘリンドメインのセリンに着目し、アラニン変異を組み合わせた変異型 fat の BAC クローンシリーズを作製する。次に BAC クローンをショウジョウバエに形質転換する。形質転換体は、既に多くのショウジョウバエ研究者に利用されている、 $\lambda$ ファージの att サイトを介した部位特異的組み替えを利用したシステムにより作出する。このシステムにおいて、BAC クローンは必ずゲノム中の同一の箇所に挿入されることから、BAC クローンを形質転換した個体と、変異を導入した BAC クローンを形質転換した個体のゲノムの差異は、変異を導入した部分のみとなるため、ゲノムへのランダムな挿入を期待する通常の形質転換よりも制御された実験を行うことが可能となる。リン酸化サイトに変異を導入した fat の BAC クローンを持つ形質転換体が、fat 変異体を示す増殖および平面細胞極性の異常をレスキューできるか交配実験により調べる。

## 4. 研究成果

Recombineering 法を用いて、fat 遺伝子を含む約 40 kb の BAC クローンに fat の 3 番目のカドヘリンドメインのセリンがアラニンに置換される変異を導入した。この BAC クローンをマイクロインジェクション法によりショウジョウバエに形質転換し、形質転換体を得た。交配実験により、得られた形質転換体と fat の突然変異体の二重突然変異体を作製した。その結果、fat の 3 番目のカドヘリンドメインのセリンにアラニン置換を導入した変異型 BAC クローンは、fat 突然変異体の致死性を救済したものの、成虫において fat 突然変異体の表現型が観察された。この結果から、Fat の 3 番目のカドヘリンドメインのセリンのリン酸化は、ショウジョウバエ

の正常発生に必要であることが分かった。次に、3番目のセリンに加えて、22番目のカドヘリンドメインのセリンをアラニンに置換した fat 遺伝子を含む BAC クローンを作製し、形質転換体を作出した。この形質転換体による、fat 突然変異体の救済効果は、3番目のカドヘリンドメインに変異を導入した場合と比較して顕著な差はみられなかった。そこで、3番目と13番目と22番目のカドヘリンドメインのセリンをアラニンに置換した BAC クローンを作製し、形質転換体を作出した。この形質転換体においても、fat 突然変異体の救済効果は3番目のカドヘリンドメイン一箇所に變異を導入した場合と比較して顕著な差はみられなかった。これらの研究により、Fat の3番目のカドヘリンドメインのセリンのリン酸化は、生体内における Fat の正常な機能発現およびショウジョウバエの正常発生に重要な役割をはたしていることを明らかにした。

#### 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3件)

(1) Ayukawa T, Matsumoto K, Ishikawa HO, Ishio A, Yamakawa T, Aoyama N, Suzuki T, Matsuno K. Rescue of Notch signaling in cells incapable of GDP-L-fucose synthesis by gap junction transfer of GDP-L-fucose in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Sep 18;109(38):15318-23.

査読有

(2) Ishikawa HO, Xu A, Ogura E, Manning G, Irvine KD. The Raine syndrome protein FAM20C is a Golgi kinase that phosphorylates bio-mineralization proteins. PLoS One. 2012;7(8):e42988. doi: 10.1371/journal.pone.0042988.

査読有

(3) Nakayama M, Sato H, Okuda T, Fujisawa N, Kono N, Arai H, Suzuki E, Umeda M, Ishikawa HO, Matsuno K. Drosophila carrying pex3 or pex16 mutations are models of Zellweger syndrome that reflect its symptoms associated with the absence of peroxisomes. PLoS One. 2011;6(8):e22984.

doi: 10.1371/journal.pone.0022984.

査読有

[学会発表] (計7件)

(1) Ishikawa HO, Xu A, Ogura E, Manning G, Irvine KD. The Raine syndrome protein FAM20C is a Golgi kinase that phosphorylates bio-mineralization proteins. 第35回日本分子生物学会年会. 2012年12月12日. 福岡

(2) Keira Y, Irvine KD, Ishikawa HO. In vivo analysis of cadherin domain phosphorylation in the Drosophila Fat. The 10th Japanese Drosophila Research Conference. 2012年10月13日. 東京慈恵医科大学

(3) Ishikawa HO, Xu A, Ogura E, Manning G, Irvine KD. Identification of a novel Golgi kinase that phosphorylates biomineralization proteins. Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology. 2012年5月29日. 京都

(4) 計良陽子, 荒井星矢, 森岡早苗, 五十嵐美絵, 石川裕之. ショウジョウバエ成虫原基における four-jointed のエンハンサー解析. 日本動物学会第64回関東支部大会. 2012年3月17日. 東邦大学

(5) 荒井星矢, 森岡早苗, 五十嵐美絵, 計良陽子, 石川裕之. Enhancer analysis of the Golgi kinase four-jointed in transgenic Drosophila. 第34回日本分子生物学会年会. 2011年12月13日. 横浜

(6) 計良陽子, Irvine KD, 石川裕之. In vivo function of extracellular phosphorylation in the Drosophila cadherin Fat. 第34回日本分子生物学会年会. 2011年12月13日. 横浜

(7) 石川裕之, Xu A, 小倉絵里, Manning G, Irvine KD. 骨の細胞外基質をリン酸化する新規ゴルジ体キナーゼの同定. 第36回日本比較内分泌学会大会. 2011年11月23日. 東京

[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://life.s.chiba-u.jp/ishikawa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 裕之 (ISHIKAWA HIROYUKI)  
千葉大学・大学院理学研究科・特任准教授  
研究者番号：00398819