

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657147

研究課題名(和文)核局在性の分泌性ペプチドと分泌性の転写因子の生物学的・進化的意義の解析

研究課題名(英文)Evolutionary mechanisms of the gastrula organizer and blastopore formation by focusing on the gene regulatory network

研究代表者

平良 眞規(Taira, Masanori)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60150083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：分泌性タンパク質と核内で機能する転写因子とは関連性がなさそうであるが、生化学的な類似点性に加え、ある種の分泌性タンパク質は核へ移行したり、転写因子が分泌されたりする例が幾つか報告されている。そこで本研究は分泌して作用する転写因子として知られるOtx2について解析した。シグナルペプチドと検出のための蛍光タンパク質VenusをOtx2に結合してアフリカツメガエル胚に発現させたが、細胞外間隙へのOtx2の分泌は検出されなかった。理由の1つとして考えられたのがOtx2の修飾である。解析の結果、C末端領域の3箇所のセリンがリン酸化されていることを見出した。今後分泌との関連で解析するのが重要である。

研究成果の概要(英文)：Secreted proteins in the extracellular space and transcription factors functioning in the nuclei do not appear to be related, but they have similarity not only in biochemical characters but also in other features so that some secreted proteins are functioning in the nucleus, and some transcription factors are secreted from the cell. To explore the meaning of these phenomena, we focused on Otx2, which is a transcription factor and reported to be secreted from the cell. We made an Otx2 construct containing a signal peptide and a fluorescent protein, Venus, at the N-terminus, but we could not detect this construct in the extracellular space in the Xenopus embryo. One possibility might be the fact that Otx2 is modified, which we found recently. We revealed that Otx2 is phosphorylated at three serines in the region C-terminal to the homeodomain. Thus, it is important in future to examine whether modifications of Otx2 affect its secretion from the cell.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：転写因子 分泌性因子

1. 研究開始当初の背景

(1) ペプチド増殖因子を含む分泌性ペプチドと遺伝子制御に関わる転写因子とは、構造的に全く異なる範疇の蛋白質と一般には考えられおり、また存在場所も一方は細胞間隙であり、他方は核内と、トポロジ的にも全く異なっている。分泌性ペプチドが核に局在する例としては、線維芽細胞増殖因子である FGF1 や FGF2 が以前より知られているが、それらの核内での役割については依然として不明のままである (Nickel Traffic 12:799, 2011)。一方、転写因子が分泌される例としては、Engrailed (En)、Antennapedia (Antp)、Pax6、Otx2 などのホメオドメイン (HD) 蛋白質があり、その役割の一部が報告されている (Sugiyama et al. Cell 134:508, 2008)。しかしこれらの現象の一般性や、その生物学的意義の概念的な議論や進化的な考察については十分になされていない。従って、これらは単に特殊な例と考えられがちであるが、果たしてそうであろうか。

2. 研究の目的

(1) 分泌性の転写因子と、核局在性の分泌性ペプチドはそれぞれ解析されているが、それらを統一的に解析されていないため、その普遍性については不明のままである。そこで本研究では、ペプチド増殖因子が細胞外でヘパラン硫酸 (HS) へ結合することで留まるように、転写因子も DNA への結合性により、細胞外では HS に結合することで留まれるか否か、さらに分泌された転写因子が別の細胞に取り込まれて機能するかを、レポーター解析により種々のタイプの転写因子で解析して、その普遍性を明らかにしようとした。これらの解析を通じて、分泌性ペプチドと転写因子との生化学的な性質の類似性、およびその進化的起源に迫ることが可能となる。

(2) 解析に用いる転写因子としては、機能が良く解析されている Otx2 に注目する。Otx2 はまた分泌されて機能するということが報告があるので、本解析に適している。そこで Otx2 の N 末端にシグナルペプチドを連結してが分泌されるか否かを検討する。また解析の過程で見出された Otx2 タンパク質の修飾は、細胞内での機能にどのように影響するかを調べることに加えて、それが分泌されて細胞外にどのように留まれるかにも関係することが考えられたので、この点についても詳細に検討して明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 転写因子に、シグナルペプチドと Venus-HA/Myc タグを付加したコンストラクトを、Xenopus 胚に発現させ、細胞外での分布から ECM との相互作用を調べ、ホメオドメインおよび他の転写因子が、細胞外に適度の範囲に分布するというリガンドとしての条件を満たすかを検討する。

(2) リガンドとしての機能が予想される転写因子 Otx2 について、修飾状態との関連を調べるため、種々の欠失コンストラクトやアミノ酸変異を導入したコンストラクトを作成し、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 胚に mRNA 顕微注入して、原腸胚期で回収して、ウエスタン・ブロットによるバンド移動度で修飾を検出した。その実験を繰り返すことで、修飾部位の同定を行った。また修飾の種類を同定するため、脱リン酸化酵素を用いた消化実験を行った。

4. 研究成果

(1) 転写因子を分泌させて細胞間隙での動態を解析するため、目的の転写因子をシグナルペプチド (SP) と蛍光蛋白質 Venus の下流に融合させるためのプラスミドベクターとして pCS107-SP-Venus-mT を構築した。そのベクターに、アフリカツメガエルのホメオドメイン転写因子 Otx2 をコードする cDNA を組み込み、Otx2 の N 末端側にシグナルペプチドと蛍光蛋白質 Venus が融合したコンストラクト (SP-Venus-Otx2) を作成した。それを基に mRNA を合成して、アフリカツメガエル胚の 4 細胞期の 1 つの割球の動物極側に顕微注入した。顕微注入された細胞のトレーサーとして赤色蛍光蛋白質 mRFP の mRNA を共注入した。これにより mRFP 発現細胞の周辺の細胞間隙に Venus-Otx2 の蛍光が観察されることが期待される。しかし mRFP と Venus の蛍光が検出された細胞の周りの細胞間隙には Venus の蛍光が検出されず、予期せぬ結果となった。原因としては、Venus-Otx2 が細胞毒性を持つ可能性、Venus-Otx2 が分泌していない可能性などが考えられた。細胞外への分泌を確認するために HA タグを付け、かつ単量体 Venus (mVenus) を用い、さらに RNA ポリメラーゼの転写終結配列を除いたシグナルペプチド SP5a を組み込んだ新しいベクター pCS107-SP5a-mVenus-mT を構築した。これに種々の転写因子の DNA 結合ドメインをこのベクターに組み込むことが可能となった。組み込む DNA 結合ドメインとしては、ホメオドメインタンパク質の Otx2、Mix1、Siamois、Lim1、T ボックス転写因子としては VegT を PRC により部分 cDNA を単離してプラスミドに組み込んだ。

(2) 転写因子 Otx2 の翻訳後修飾について解析して大変興味深い結果を得た。Otx2 は通常は転写因子として機能するが、網膜の視神経の視野への選択的軸策投射において、Otx2 は分泌されて機能することが報告されている。最近我々は Otx2 に翻訳後修飾の存在を見出したが、もしこれがリン酸化ならば、分泌性に対して影響することが考えられた。そこで Otx2 における翻訳後修飾の同定をまず行った。その結果、ホメオドメイン下流の C 末側領域の 3 箇所のセリン残基がリン酸化修飾に

関与することを見出した。その上流には Akt キナーゼ部位のスレオニンが存在するので、それら 4 箇所の修飾部位の役割を検討した。アラニン置換の非リン酸化コンストラクト 4A と、グルタミン置換の擬似リン酸化コンストラクト 4E を作成して、アフリカツメガエル胚に発現させたところ、4E は野生型の表現型である眼の縮小の活性が増強されたが、大変興味深いことに 4A では逆に網膜領域の拡大が認められた。細胞増殖に対する影響では、4E は増殖を促進する一方、4A は増殖を抑制した。このことは、Otx2 は C 末領域のリン酸化修飾により活性を変化させることが示唆された。

(3) Otx2 のリン酸化酵素を探索した結果、cyclin A/Cdk1 と cyclin B/Cdk1 を同定した。従って Otx2 は細胞分裂期の S 期から M 期にリン酸化を受け、それが細胞記憶として次の細胞周期に対して正に働くことを予想させる。事実、Otx2 は Cdk 阻害因子の発現を抑制することが知られており、Otx2 の転写抑制にはリン酸化が関わることを我々は見出していることから、リン酸化 Otx2 --| Cdk 阻害因子 --| Cdk1 --> Otx2 のリン酸化、という正のフィードバックの存在が示唆された。一般にリン酸化修飾はマイナスイオン化により膜の透過性を下げることが予想されるので、分泌型 Otx2 は非リン酸化型と予想される。今後、4A が直接細胞膜を通過して分泌するか否かを検討することが重要である。

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)

Sudou, N., Yamamoto, S., Ogino, H. and Taira, M. (2012). Dynamic in vivo binding of transcription factors to cis-regulatory modules of *cer* and *gsc* in the stepwise formation of the Spemann-Mangold organizer. *Development* 139, 1651-1661. (査読有) doi: 10.1242/dev.068395

Moriyama, Y., Kawanishi, T., Nakamura, R., Tsukahara, T., Sumiyama, K., Suster, M., Kawakami, K., Toyoda, A., Fujiyama, A., Yasuoka, Y., Nagao, Y., Sawatari, E., Shimikzu, A., Wakamatsu, Y., Hibi, M., Taira, M., Okabe, M., Naruse, K., Hashimoto, H., Shimada, A., Takeda, H. (2012). The medaka enhancer mutant for *zic1/zic4* provides molecular insights into teleost caudal fin evolution. *Curr. Biol.*, 22, 601-607. (査読有) doi: 10.1016/j.cub.2012.01.063

[学会発表](計 5 件)

Mii, Y., Nakazato, K., Pack, C.-G., Sako, Y., Mochizuki, A., Takada, S. and Taira, M. "Heparan sulfate nanostructures regulate extracellular distribution of Wnt and sFRP" (平良、口頭発表) International Mini Symposium, "Eco-Dev-Evo" 京都大学 (2014 年 2 月 21 日)

Satou, Y., Hosono, E., Minami, K., Yasuoka, Y., Shibano, T., Mamada, H., Takahashi, S., Asashima, M. and Taira, M. "Roles of the zinc finger protein Zbtb11 and phosphorylation modification in the regulation of Otx2 activity in early *Xenopus* eye development" (佐藤、ポスター発表) Keystone Symposium on transcription regulation, Santa Fe (2014 年 2 月 4 日~9 日)

Satou, Y., Hosono, E., Minami, K., Shibano, T., Mamada, H., Takahashi, S., Asashima, M. and Taira, M. "Roles of the zinc finger protein Zbtb11 and phosphorylation modification in the regulation of Otx2 activity in early *Xenopus* eye development" (*Xenopus* の眼の初期形成に関わる Otx2 のリン酸化修飾と活性調節における Zn フィンガー蛋白質 Zbtb11 の役割) (佐藤、口頭発表) 日本発生生物学会第 46 回大会、松江 (2013 年 5 月 28 日~31 日)

Satou, Y., Shibano, T., Mamada, H., Takahashi, S., Asashima, M. and Taira, M. "Roles of C2H2-type zinc finger proteins, Zbtb11 and Znf668, in Otx2 functions in early *Xenopus* eye development" 14th International *Xenopus* Conference, Giens Peninsula (France) (2012 年 9 月 9 日~13 日)

Satou, Y., Shibano, T., Mamada, H., Takahashi, S., Asashima, M. and Taira, M. "Roles of C2H2-type zinc finger proteins, Zbtb11 and Znf668, in Otx2 functions in early *Xenopus* eye development" 日本発生生物学会第 45 回大会、神戸 (2012 年 5 月 28 日~31 日)

[その他]

ホームページ等

http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/lmb/public_html/index.php?Home

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平良 眞規 (TAIRA, Masanori)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号: 60150083

(2) 研究分担者

三井 優輔 (MII, Yusuke)

基礎生物學研究所・分子發生學研究部門・
助教
研究者番號： 70634129