

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14532

研究課題名(和文) 局在するWntによるアクチン重合コアと形態形成運動の解析

研究課題名(英文) Localized Wnt protein and morphogenesis.

研究代表者

三井 優輔(Mii, Yusuke)

基礎生物学研究所・分子発生学研究部門・助教

研究者番号：70634129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アフリカツメガエル初期胚でのWnt11の局在性を解析したところ、以下の三点について重要な知見が得られた。1. Wnt11はWnt8とは異なる修飾状態のヘパラン硫酸鎖と共局在していた。2. Wnt11が局在する細胞辺は収縮する傾向が認められ、形態形成運動において、どの細胞辺が収縮するかをWnt11が直接的に制御している可能性が示唆された。3. 平面細胞極性に対するWnt11の働きを検討したところ、発現細胞の周囲で局所的に平面細胞極性因子の量を制御しており、Wnt11のローカルな働きが徐々に波及することで細胞極性が制御されている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：How Wnt proteins regulate morphogenesis and cell polarity is poorly understood. From visualization of Wnt11 in early *Xenopus* embryos, following possibilities are suggested. 1. Wnt11 shows different specificity for heparan sulfate from that of Wnt8. 2. Cell edges with Wnt11 accumulation tend to shrink. 3. For the regulation of planar cell polarity (PCP), Wnt11 appears to regulate amounts of core PCP components in a localized manner.

研究分野：発生生物学 細胞生物学

キーワード：Wnt 平面細胞極性 *Xenopus* ヘパラン硫酸

1. 研究開始当初の背景

原腸形成や神経管形成において見られるダイナミックな形態形成運動の理解は古くから発生学における中心的命題の一つである。分子生物学的解析や遺伝学的解析から分泌性蛋白質の Wnt が beta-catenin を介さない経路で (非標準経路)、細胞骨格のアクチンの重合等を調節し、形態形成運動を制御すると考えられている (Niehrs, *Nat. Rev. MCB.* 13:767, 2012)。しかし形態形成運動における Wnt 蛋白質の重要性は広く認識されているものの、Wnt 蛋白質そのものの分布は、可視化の技術的困難もあってか、知見が極めて乏しいのが現状である。

私はこれまで Wnt 蛋白質の細胞外分布に注目して研究を行ってきたが、おもに標準経路シグナルに関わることが知られている Wnt8 蛋白質の局在に関する自身の研究から、アフリカツメガエル (以下 *Xenopus*) 胚において過剰発現のみならず内在でも Wnt8 蛋白質は細胞間隙でドット状の分布を示し、これが糖鎖の一種であるヘパラン硫酸のクラスター構造 (HS クラスター) に起因することを見いだした。更に標準経路シグナルでは HS クラスターと Wnt のドットを核としてシグナロソーム (Bilic et al, *Science* 316:1619, 2007) 様の構造が形成されていることが示唆された (図 1、Mii et al., 2017 *Nat. Commun.* も参照)。

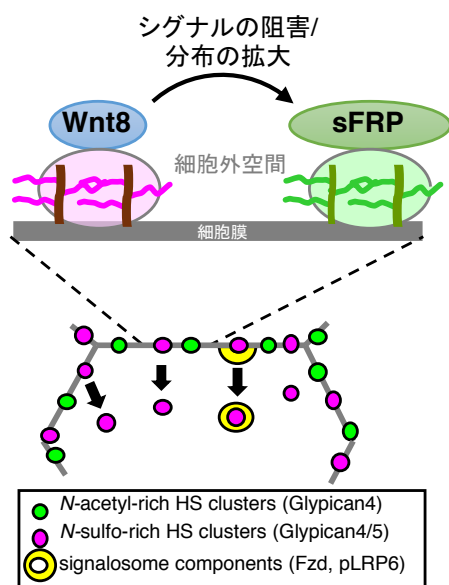


図1. HSクラスターによるWnt8の分布制御とシグナロソーム形成

2. 研究の目的

以上の独自の知見から、従来のモルフォゲンの概念 (拡散) とは対極的に、Wnt 蛋白質が局所に集積する実像が浮かび上がってきた。では形態形成や細胞極性の制御において、局在する Wnt 蛋白質は何をしているのだろうか? Wnt の非標準経路コンポーネント自体は様々なものが同定されており、

loss-of-function や gain-of-function の実験等から収斂伸長運動等における個々の因子の役割は解析されてきた (Veeman et al., *Dev. Cell* 5, 367, 2003)。しかしそもそも「Wnt の分布が細胞の形態・極性・運動と関連するのか?」もしそうだとしたら「Wnt の分布が如何に細胞極性・運動を制御するのか?」という根本的な疑問は依然残されたままである。本研究は特に Wnt の非標準経路による形態形成運動や平面細胞極性の制御の系において、Wnt 蛋白質の局在を検討し、そこから Wnt 蛋白質がいかにして形態形成や平面細胞極性 (PCP) を制御するのか、明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

この目的を達成するために、*Xenopus* の Wnt11 に対する、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を作成して、内在性の Wnt11 蛋白質の局在を解析した。また Wnt11 に EGFP を融合したコンストラクトを作成し、これを *Xenopus* 胚で発現させることで Wnt11 蛋白質の局在の動態、Wnt11 の局在性と細胞の形態変化、および平面細胞極性との関係性を解析した。

4. 研究成果

以下の三点について重要な知見が得られた。

(1) これまで Wnt8 については N-sulfation が多い HS クラスターに特異的に集積し、このことがシグナルの伝達に必要であることを示していたが、Wnt11 についても HS の N-sulfation を促進する酵素である NDST1 の過剰発現によって集積が亢進したため、Wnt8 と同様の HS に対する特異性を示すと予想した。ところが、Wnt8 とは異なり、Wnt11 は N-sulfo HS とは明確な共局在を示さなかった。NDST1 は N-sulfation 以外に脱アセチル化反応も触媒するため、Wnt11 と脱アセチル化 HS の局在性を免疫染色で検討したところ、Wnt11 と脱アセチル化 HS の共局在が認められた。さらに N-sulfation 活性を持たないと考えられる NDST1 の欠失型コンストラクトを発現させて Wnt8 及び Wnt11 の集積に与える影響を検討したところ、Wnt8 の集積は促進されないが、Wnt11 の集積は亢進した。以上より、Wnt11 の足場分子として、脱アセチル化 HS が機能していることが示唆され (図 2)、Wnt8 とは違う特異性が考えられる。

(2) EGFP 融合型の Wnt11 を発現させると、一細胞の周囲でも特定の細胞辺に Wnt11 が集積しており、このように Wnt11 が集積した細胞辺は収縮する傾向が認められた。形態形成における Wnt11 の役割を考えると、どの細胞辺を収縮されるかを Wnt11 が直接的に制御している可能性が示唆される (図 2)。

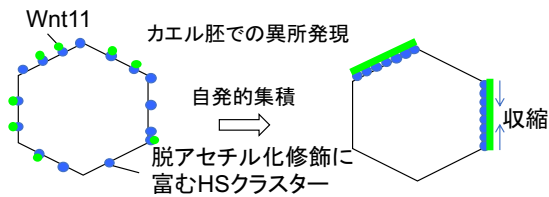


図2. Wnt11の足場構造たる脱アセチル化の多いHSクラスターとWnt11の局在化、及び細胞辺の収縮

(3) Chu & Sokol (2016)によって示された、GFP-Pk3を用いて *Xenopus* 胚で PCP を可視化する系を応用して、過剰発現させた Wnt11 と PCP 因子の局在の関係を解析したところ、Wnt11 発現細胞に隣接する細胞辺では Pk3 が少なく維持される一方、Pk3 とは逆方向の辺に局在する Fz7 は Wnt11 発現細胞に隣接する辺に集積した (図3)。

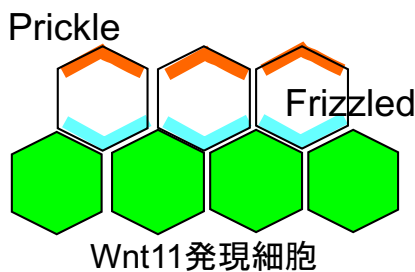


図3. Wnt11のコアPCP因子に対するローカルな作用

更に Wnt11-EGFP の分布が mCherry-Pk3 の発現に影響されるという予備的結果を得た。つまり Wnt の分布自体が PCP 因子の影響を受けることが示唆された。また拡散しないと考えられる膜結合型の Wnt11 を作成し、Pk3 の局在に与える影響を検討したところ、膜結合型 Wnt11 発現細胞から約3細胞程度離れたところまでは細胞の極性が起こることが示唆された。ただし、同じ系において、通常分泌型の Wnt11 は20細胞以上に渡って細胞の極性を揃えられることから、拡散現象の必要性も同時に示唆される。

以上より作業仮説として、以下のプロセスが考えられる。[(i) Wnt11 はローカルに発現細胞に隣接する細胞の PCP 因子の局在を制御する。 (ii) PCP 因子の相互作用によりが数細胞の範囲で波及する。 (iii) PCP 因子の効果により Wnt11 が少し離れたところに局在できるようになる。この新たに局在化した Wnt11 は (i) 同様の効果をもつ。] このモデルは (i) - (iii) が繰り返されることで、分布範囲が狭い Wnt11 蛋白質がどのようにして広い範囲の細胞極性を揃えられるのかという問題をうまく説明できる。今後は現在のところ有力な、グローバルな Wnt11 の濃度勾配によって極性が揃うというモデルを対立仮説と

して、それらのどちらが正しいかを判別できる実験を行う予定である。

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3件)

① Yoshihiro Tsuchiya, Yusuke Mii, Kazunori Okada, Mikio Furuse, Tadashi Okubo, Shinji Takada (2018)

Ripply3 is required for the maintenance of epithelial sheets in the morphogenesis of pharyngeal pouches.

Development, growth & differentiation 60 (2) 87-96

DOI: □ 10.1111/dgd.12425

(査読有)

② Yusuke Mii, Takayoshi Yamamoto, Ritsuko Takada, Shuji Mizumoto, Makoto Matsuyama, Shuhei Yamada, Shinji Takada, Masanori Taira (2017)

Roles of two types of heparan sulfate clusters in Wnt distribution and signaling in *Xenopus*.

Nature Communications 8:1973

doi:10.1038/s41467-017-02076-0

(査読有)

③ Shinji Takada, Sayumi Fujimori, Takuma Shinozuka, Ritsuko Takada, Yusuke Mii (2017)

Differences in the secretion and transport of Wnt proteins.

The Journal of Biochemistry 161 (1) 1-7.

doi:10.1093/jb/mvw071

(査読有)

[学会発表] (計9件)

① Yusuke Mii

Extracellular Behaviors of Wnt Ligands in *Xenopus* Embryo

Amphibian development, regeneration, evolution and beyond (広島大学 国際シンポジウム) 広島大学東広島キャンパス (2018年) (招待講演)

② 三井 優輔

分泌性シグナル蛋白質 Wnt8 の分布とシグナル受容を制御する HS のクラスター構造 27th Proteoglycan Forum 東京医科歯科大学湯島キャンパス (2018年) (招待講演)

③ Yusuke Mii

Roles of two distinct types of heparan sulfate clusters in Wnt distribution and signalling

Wnt 研究会 2017 神戸大学神緑会館 (2017 年)

④ 三井 優輔

ツメガエル初期胚での分泌性シグナル蛋白質 Wnt の挙動を理解する
第 9 回イメージング若手の会 光塾 山口大学吉田キャンパス (2017 年) (招待講演)

⑤ Yusuke Mii, Ritsuko Takada, Makoto Matsuyama, Shinji Takada

Spatial regulation of Wnt proteins and planar cell polarity in *Xenopus* early embryogenesis.
アフリカツメガエル初期発生における Wnt 蛋白質の空間的制御と平面細胞極性
日本発生生物学会第 50 回大会 タワーホール船堀 (2017 年)

⑥ 三井 優輔、高田 律子、松山 誠、高田 慎治

「集積する」Wnt 蛋白質と細胞極性および形態形成運動
第 2 回次世代両生類研究会 岡崎コンファレンスセンター (2016 年)

⑦ Yusuke Mii, Takayoshi Yamamoto, Ritsuko Takada, Masanori Taira, Shinji Takada

Differential modification defines discrete nano-scale clusters of heparan sulfate and coordinates gradient formation and signal reception of Wnt in *Xenopus* embryo. CDB Symposium 2016 多細胞システム形成研究センター (2016 年)

⑧ 三井 優輔

ヘパラン硫酸ナノ構造による Wnt の局在化と細胞極性 次世代両生類研究会 第一回会合 岡崎コンファレンスセンター (2015 年) (招待講演)

⑨ Yusuke Mii, Takayoshi Yamamoto, Ritsuko Takada, Masanori Taira, Shinji Takada

Spatial regulation of Wnt proteins and convergent extension movements during *Xenopus* early embryogenesis. 日本発生生物学会第 48 回大会 つくば国際会議場 (2015 年)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/cib2/>

<https://researchmap.jp/miyy/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井 優輔 (MII, Yusuke)

基礎生物学研究所・分子発生学研究部門・助教

研究者番号 : 70634129

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()