

令和元年6月6日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04797

研究課題名(和文) 左右の非対称性を使って前後方向に鏡像対称な器官を作る機構の研究

研究課題名(英文) Mechanism for mirror-symmetric organogenesis

研究代表者

澤 齊 (Sawa, Hitoshi)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・教授

研究者番号：80222024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々ヒトを含む左右相称動物は、左右で鏡像対称なボディプランを持っているが、鏡像対称な形態形成機構はほとんどわかっていない。線虫において、生殖巣は前後に鏡像対称であり、DTC細胞の鏡像対称な移動によって形成されるが、その制御機構は不明であった。DTCは、前駆細胞(Z1/Z4)の非対称分裂によって作られる。我々は、Z1/Z4の極性が、三種類のWntと、Wnt否依存的に働く受容体との冗長的機構により制御されていることを発見した。また、DTCの移動方向は、前駆細胞の極性方向によって決められることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の移動方向は、細胞外のガイダンス分子によって制御されていると考えられているが、我々の発見はそれ以外に、移動方向がその母細胞の極性によって制御される機構の存在を初めて示した。

また、三種類のWntが極性に対し異なる機能を持っていることを示した。さらに、Wntと冗長的に働くWnt受容体Frizzledが、Wnt結合ドメインである細胞外領域(CRD)否依存的に働くことを初めて発見した。Frizzled蛋白質の新たな機能を明らかにした。

Wntシグナルは哺乳類においても発生や恒常性の維持に重要であり、また癌など様々な疾患にも関与している。Wnt受容体の新たな機能の発見は社会的にも意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Most animals belonging to Bilateria have mirror-symmetric body plan along the left-right axis. However, the mechanisms to produce mirror symmetric organs are poorly understood. In *C. elegans*, gonad has mirror-symmetric structure along the anterior-posterior axis and shaped by mirror-symmetric migration of DTC cells. This mechanism has not been explored. DTCs are produced by asymmetric divisions of their precursor cells (Z1/Z4). We uncovered that polarity of Z1/Z4 is regulated redundantly by three Wnt proteins and a Wnt receptor that functions Wnt-independently. Furthermore, we showed that migratory direction of DTCs are determined by polarity orientation of their mother cells.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：細胞移動 細胞極性 非対称分裂 Wnt Frizzled *C. elegans*

## 1. 研究開始当初の背景

我々ヒトを含む左右相称動物は、左右で鏡像対称なボディプランを持っている。鏡像対称な組織においては、相同な位置にある細胞は同じ細胞運命を持つと共に、鏡像対称な極性方向を持つ必要がある。しかし、離れた場所にある細胞の極性を鏡像対称にする機構はわかっていない。線虫 *C. elegans* の生殖巣は前後方向に鏡像対称な U 字型構造を持つ。これは、生殖巣の先端にある Distal Tip cell (DTC) が、前側の DTC は前方に、後側の DTC は後方に、鏡像対称な動きをするからである。しかし、この移動方向がどのように制御されているのかはわかっていなかった。

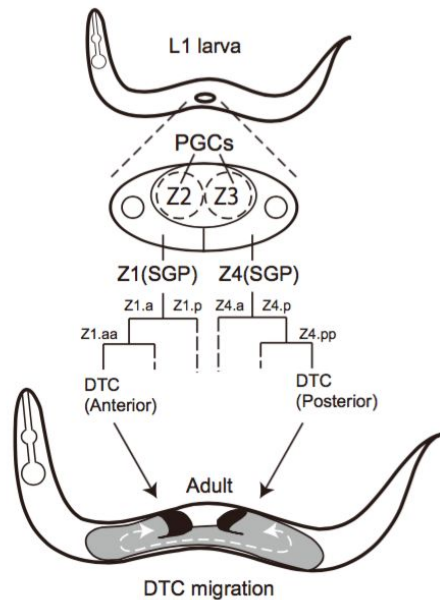


図1 *C. elegans* の生殖巣の形成

卵から孵化した L1 幼虫の生殖巣には、体細胞性生殖巣前駆細胞である SGP 細胞 (Z1/Z4 細胞) と生殖細胞 Z2/Z3 が存在する。SGP 細胞は非対称分裂を二回行い、遠位に位置する孫細胞 (Z1.aa Z4.pp) が DTC に分化する。幼虫の発生中に DTC が U 字型に移動することで生殖巣が形成される。Z1 由来の DTC と Z4 由来の DTC が反対向きの移動をする結果、生殖巣は鏡像対称な形態となる。

## 2. 研究の目的

DTC 細胞は、体細胞性生殖巣前駆細胞である SGP 細胞 (Z1/Z4 細胞) から非対称分裂によって作られる。Z1/Z4 細胞は反対向きの極性を持つことがわかってきた。鏡像対称な極性によって、Z1/Z4 細胞が作る系譜は鏡像対称になり、二つの DTC は生殖巣の Distal 側に作られる。Z1/Z4 細胞の極性方向がどのように制御されているのか、また、極性方向と DTC の移動方向に関係があるのかを、Wnt 遺伝子の動きに着目して調べた。

## 3. 研究の方法

Z1/Z4 細胞の極性は GFP::POP-1 の局在によって判定した。POP-1 は全ての細胞の非対称分裂において、Wnt シグナル経路 (Wnt カテニン非対称経路) の下流で、分裂後、非対称に核局在する。Z1 では、後方の娘細胞 Z1.p の方が、Z4 では前方の娘細胞 Z4.a の方が姉妹細胞より核濃度が高い。また DTC の移動方向は、DTC 特異的のマーカ-*mig-24::GFP* を用いて判定した。

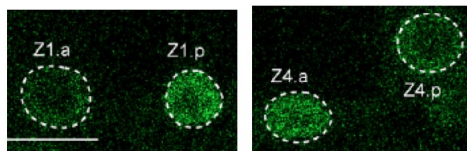


図2 SGP 分裂後の GFP::POP-1 の局在  
Z1/Z4 どちらの場合も近位側の娘細胞で POP-1 が多く、Z1/Z4 が鏡像対称な極性を持っている。

## 4. 研究成果

### (1) Wnt と Frizzled が冗長的に極性を制御する

Z1/Z4 細胞の極性は Wnt カテニン非対称経路によって制御されており、例えば、二重 Frizzled 変異体 (*lin-17 mom-5*) では完全に極性が喪失し、その結果 DTC が形成されず不妊になる。しかし、われわれはこの極性が、*C. elegans* に 5 種類存在する Wnt 遺伝子全てが変異した 5 重 Wnt 変異体でも正常であることを報告していた。また、*lin-17*/Frizzled 単独変異体では弱い極性異常しか示さない。しかし、*lin-17* 変異と、3 種の Wnt 遺伝子 (*cwn-1 cwn-2 egl-20*) を変異させる (*lin-17 cwn-1 cwn-2 egl-20* 四重変異体) と非常に強い極性異常を示すことを発見した。Wnt 遺伝子は、*lin-17* と冗長的に Z1/Z4 細胞の極性を制御していると考えられる。

### (2) 三種の Wnt は極性制御において異なる機能を持つ

3種類それぞれの Wnt (*cwn-1 cwn-2 egl-20*) の機能を調べるために、*lin-17* 変異体と組み合わせて、Z1/Z4 細胞の極性を調べた。*lin-17 cwn-1* と *lin-17 egl-20* 二重変異体では、*lin-17* 単独変異体の異常が増強されなかったが、*lin-17 cwn-2* 二重変異体では、Z1 細胞で強い、Z4 細胞で中程度の極性喪失を示した。これに対し、さらに *egl-20* を変異させると (*lin-17 cwn-2 egl-20* 三重変異体) Z1 細胞は正常とは反対向きの極性を示し、Z4 細胞の極性は回復した。この極性は、*cwn-1* に依存しており、*lin-17 cwn-1 cwn-2 egl-20* 四重変異体では消失する。

以上の結果、三種の Wnt は極性制御において異なる機能を持つことが明らかになった。*lin-17* 変異体において、Z1 細胞の極性は *cwn-2* によって、Z4 を含めた他の細胞の極性方向と反対向きの極性を持っている。*cwn-1* は *cwn-2* と異なり、Z4 などと同じ向きの極性を制御できるが、*egl-20* 存在下ではその機能が抑えられており、*lin-17 cwn-2 egl-20* 三重変異体においてのみ Z1 の極性を反転させる。

以上の結果、Z1/Z4 それぞれの細胞に対し、CWN-2 が反対向きの極性を誘導することが、これらの細胞が鏡像対称な極性を持つ大きな要因であることがわかった。

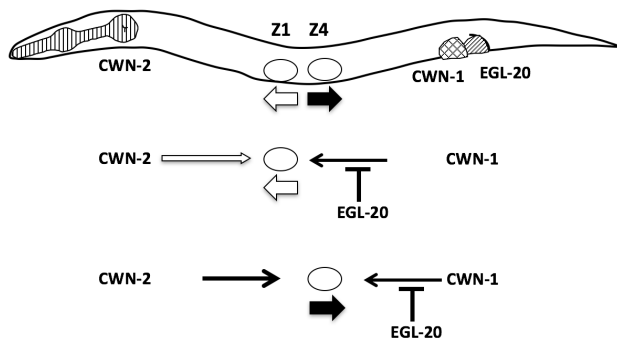


図3 三種類の Wnt による鏡像対称な極性制御機構

CWN-2 は Z1 に対しては、前向き (図中白抜き) の極性を、Z4 には後ろ向き (図中黒) の極性を誘導する。CWN-1 はどちらの細胞にも後ろ向きの極性を誘導する。EGL-20 は CWN-1 の機能を抑制している。

### (3) LIN-17 は Wnt 非依存的に極性を制御する

*lin-17* が Wnt と冗長的に働くことから、LIN-17 は Wnt に依存せずに極性を制御していることが予想される。そこで、Frizzled の細胞外の Wnt 結合ドメインである cysteine-rich-domain (CRD) を欠失した LIN-17 (CRD-LIN-17) を発現させた。その結果、CRD-LIN-17 は、*lin-17 mom-5* 二重変異体、および *lin-17 cwn-2* 二重変異体の DTC 形成異常を完全に回復させることがわかった。この結果、LIN-17 は CRD を必要とせず、Wnt 非依存的に働くことが明らかになった。Frizzled が CRD 非依存的な機能を持つ初めての発見である。

### (4) DTC の移動方向は、その母細胞の極性方向によって決まる

上記のように、*lin-17 cwn-2 egl-20* 三重変異体では、Z1 細胞の極性が逆転するが、この変異体の約半数では、Z1 由来の DTC が後方に (正常には前方) 移動することを発見した。Z1 は DTC の祖母細胞であるため、母細胞である Z1.p 細胞 (野生型では DTC の母細胞は Z1.a だが、三重変異体では、Z1 極性が逆転するため、Z1.p が母細胞) の極性を調べたところ、約半数で逆転していることがわかった。Z1.p の極性方向と DTC の移動方向の関係を調べるために 2 種類の実験を行った。

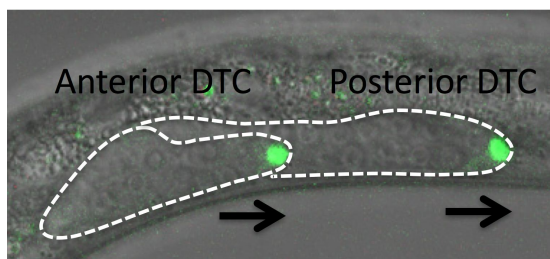


図4 *lin-17 cwn-2 egl-20* 三重変異体での DTC 移動異常

両方の DTC が後方に移動する。DTC マーカー (*mig-24::GFP*) の発現。点線は生殖巣の形を示す。

まず、Z1.p の極性を GFP::POP-1 の観察により判定した後、虫を回収し、しばらく育てた後、DTC の移動方向を観察した。その結果、Z1.p の極性が正常なら DTC 移動も正常、極性が異常なら移動方向は逆転と 7 例全てにおいて相関が観察された。なおこの実験では、Z1.p の娘細胞を確実に同定するため、Z1.a 細胞をレーザー照射により殺してから実験を行った。

次に、Z1.a を殺さずに Z1.p 娘細胞を同定するため、photo-convertible 蛍光蛋白 mkikGR を用いた。mkikGR を Z1/Z4 で発現する *lag-2* プロモーターで発現させた後、Z1.p 細胞の蛍光を緑から赤に変換させた。虫を回収し、しばらく育てた後、Z1.p 細胞の運命を観察した。*lag-2* プロモーターは Z1/Z4 でも発現するが、DTC 細胞ではさらに強く発現する。Z1.p の娘細胞が DTC に分化すれば、新たに緑色蛍光の mkikGR が発現するため、どちらの娘細胞が DTC に分化したかを判別でき、Z1.p 細胞の非対称分裂極性も判定できる。極性を判定後、虫を再び回収し、しばらく育てた後、DTC の移動方向を観察した。この実験においても、Z1.p

の極性方向と移動方向は完全に相関した。以上の結果、DTC の移動方向はその母細胞の極性方向によって決まっていることが明らかになった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Sugioka K, Fielmich LE, Mizumoto K, Bowerman B, van den Heuvel S, Kimura A, Sawa H,  
Tumor suppressor APC is an attenuator of spindle-pulling forces during C.elegans  
asymmetric cell division  
Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(5), E954-E963, 2018 査読有  
10.1073/pnas.1712052115

Ihara S, Nakayama S, Murakami Y, Suzuki E, Asakawa M, Kinoshita T, Sawa H.,  
PIGN prevents protein aggregation in the endoplasmic reticulum independently of its  
function in the GPI synthesis.  
Journal of Cell Science, 130 602-613, 2017 査読有  
10.1242/jcs.196717

Arata Y, Hiroshima M, Pack CG, Ramanujam R, Motegi F, Nakazato K, Shindo Y, Wiseman  
PW, Sawa H, Kobayashi TJ, Brandão HB, Shibata T, Sako Y  
Cortical Polarity of the RING Protein PAR-2 Is Maintained by Exchange Rate Kinetics at  
the Cortical-Cytoplasmic Boundary.  
Cell reports 16(8) 2156-2168 2016 査読有  
[10.1016/j.celrep.2016.07.047](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.047)

〔学会発表〕(計 3 件)

澤 斉、 Wnt シグナル伝達による非対称分裂の制御機構、  
第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 (招待講演)

澤 斉、 Orienting cell polarity by Wnt signaling、  
C. elegans development, cell biology and gene expression 2018 年 (招待講演)

澤 斉、 Orienting cell polarity by Wnt signaling、  
The 7th Asia-Pacific C. elegans meeting 2016 年 (招待講演)

〔その他〕

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/Nemalab/Home.html>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者  
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。