

平成 21 年 4 月 30 日 現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2005～2008

課題番号：17370074

研究課題名（和文） 小胞体内におけるシグナリング制御機構と中枢神経組織発生

研究課題名（英文） Roles of signaling regulation in the endoplasmic reticulum on the development of central nervous system

研究代表者

山本 朗仁 (Yamamoto Akihito)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号：50244083

研究成果の概要：Xenopus 原腸胚から「Wnt 及び FGF シグナルを特異的に抑制することで、頭部形成を制御する新規小胞体分子 Shisa を同定し、その分子機構を明らかにした。特定蛋白の成熟抑制という新しい小胞体機能が、胚発生に不可欠であることを世界に先駆けて明らかにした。さらに Shisa 分子ファミリーを同定し、Shisa による Wnt 及び FGF シグナル制御が、体節形成に不可欠であることを示した。また、Shisa が腫瘍細胞の浸潤・転移形質を制御することを見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	5,300,000	0	5,300,000
2006年度	3,500,000	0	3,500,000
2007年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
総計	14,400,000	1,680,000	16,080,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：Wnt, FGF, Shisa, 小胞体

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経組織発生において、様々な局面でシグナルの活性化とその抑制が重要な役割を果たす。しかしながら、シグナル構成分子の細胞膜発現を制御する分子メカニズムは多くが未知のままであった。

(2) 申請者は、脊椎動物の頭部神経組織発生を制御する新規小胞体分子 Shisa を同定した。Shisa は原腸胚期の神経後方化シグナルである、Wnt および FGF シグナル抑制分子であることが明らかとなった。

Shisa の詳細な分子機能の解明は、細胞

内小器官・小胞体の神経組織発生における新しい役割を提示する可能性がある。

2. 研究の目的

Shisa による Wnt 及び FGF レセプターの発現制御システムを解明し、神経組織発生における小胞体内シグナル制御機構の役割と分子基盤の全容を明らかにする。

3. 研究の方法

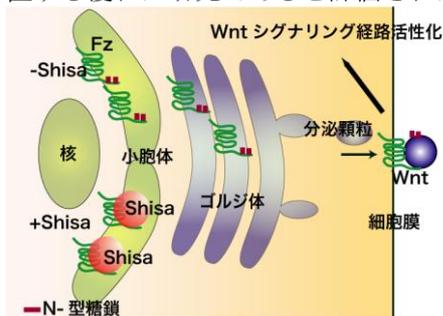
(1) Xenopus 胚やヒト培養細胞株を用いて Shisa、及び新たに同定した Shisa 分子ファミリーによる Wnt 及び FGF シグナル制御機構の詳細を検討する。(2) Shisa 遺伝子改変マウ

スを製作し、中枢神経組織発生における Shisa 機能を解析する。(3) Wnt、FGF 以外のシグナル制御における Shisa 機能をヒト細胞株や *Xenopus* 初期胚をもちいて解析する。(4) Shisa と複合体を形成しシグナル制御に機能する小胞体分子を同定する。

4. 研究成果

(1) Shisa による頭部中枢神経発生制御機構 (Cell, 2005) : *Xenopus* 原腸胚において Shisa は Wnt および FGF シグナルを抑制することで、前脳形成に必須な役割を果たす。Shisa は小胞体内において新生直後の未成熟な Wnt レセプター-Frizzled および FGF レセプターと複合体を形成し、レセプター蛋白を小胞体内に留め、タンパク成熟過程と細胞膜への輸送を阻害することでシグナルの受容を阻害する。予定頭部神経組織において Shisa の機能抑制はレセプターの細胞膜発現を促進し、予定頭部神経組織のシグナル受容能を高めた。これらの研究結果によって、細胞内小器官である小胞体が、特定タンパク質の成熟過程を制御することにより積極的にシグナリング制御にかかわること、同メカニズムが個体発生において重要な役割を果たすことを明らかとした。

本研究は Cell 誌と Developmental Cell 誌において特に注目すべき論文として紹介された (Cell 2005 120: 156-158, Developmental Cell 2005 8: 136-137)。BioMed central による Faculty of 1000 biology においても、発生生物/細胞生物学領域における発表論文中、上位 1% に位置する優れた研究であると評価された。



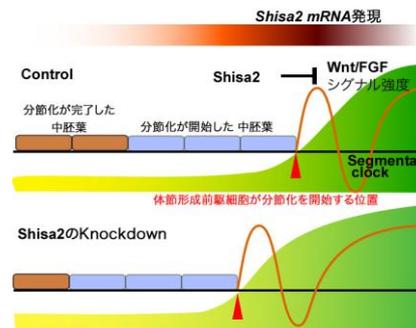
(図の説明) Shisa 分子機能の概略. Shisa により蛋白質成熟過程を阻害された Fz や FGFR は正常な三次元構造をとれず、細胞膜に発現できない。Shisa は新生タンパクのアミノ酸配列と N 型糖鎖構造を認識し複合体を形成する。

(2) Shisa 分子ファミリーの同定と機能解析 (Development, 2006) : Shisa ファミリーは Shisa と同様にレセプター分子を小胞体内

に留めることにより、Wnt および FGF シグナルを制御する。脊髄からの神経軸索形成の制御には体節構造が重要な役割を果たす。予定体節形成組織に発現する Shisa 2 の機能抑制は、Wnt および FGF シグナルの異所的活性化を引き起こし、未分化中胚葉細胞の分節形成細胞への分化を抑制した。これにより体幹部の分節構造異常が引き起こされる。Shisa 2 の機能抑制効果は、Wnt と FGF シグナルを同時に抑制したときのみ回復する。これらの研究結果は、分節形成細胞への分化が、Shisa2 による同時・独立的な小胞体内 Wnt・FGF レセプタータンパク成熟抑制で制御されていることを明らかにした。さらには、Shisa による小胞体内シグナリング制御が、頭部形成以外の多様な生命現象で機能していることが明らかとなった。

本研究は Development 誌において特に注目すべき論文として紹介された (Development 2006 133: 2301)。Faculty of 1000 Biology においても、発生生物/細胞生物学領域における発表論文中、注目すべき研究報告であると評価された。

Shisa2による分節形成制御



(図の説明) Wnt と FGF シグナルは、初期胚の後方から前方へ減少する濃度勾配を形成している (緑)。周期性のある遺伝子発現の波も後方から前方へと進む (segmental clock)。Wnt/FGF シグナル強度が、ある閾値以下となった地点で、周期的な遺伝子発現の波が、体節構造へと変換されてゆく。Shisa2 は分節開始点を覆うように発現している。Shisa2 の機能抑制は Wnt/FGF シグナルの活性化部位を前方へ拡大させる。結果、波が来ても分節構造が形成されない。Shisa2 knockdown は体節構造異常を引き起こす。

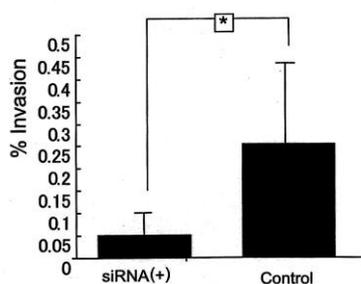
(3) Shisa遺伝子改変マウスの解析

(Developmental biology, 2007) : Shisa変異マウスは、原腸胚の頭部形成に大きな異常を示さなかった。生後、視床下部の著しい低形成を示し死亡する。一方、頭部神経発生に機能する Wnt抑制分子 DKK と

Shisaの二重変異体は、前中脳を完全に欠失することを見いだした。これらの解析結果は、原腸胚の頭部神経組織発生において、Wnt抑制分子であるShisaとDKKが相補的に機能することを明らかにした。

(4) Wnt・FGF以外のシグナル制御におけるShisa機能(N. J. medicine, 2008) : 神経系を含む、各種組織由来の腫瘍細胞株においてShisaファミリー分子群の遺伝子発現を解析した。Shisaは未分化で悪性形質の高い腫瘍細胞株に強い発現を示した。癌転移形質を示さない腫瘍細胞株にShisaを過剰発現させると癌転移形質が亢進した。一方、神経堤由来の悪性腫瘍細胞株におけるShisa機能抑制は癌転移能を著しく抑制した。Shisaは小胞体局在型および細胞外分泌型の二つの細胞内局在を示す。小胞体に局在できないShisa変異体は癌転移能に影響を与えなかった。これらの解析結果は、小胞体内においてShisaが癌転移形質の制御因子として機能することを示している。

今後、腫瘍細胞の転移形質制御におけるShisaの標的分子解明が重要な課題であると考える。



(図の説明) 悪性形質の高い神経腫瘍細胞株におけるShisaのKnockdownは、腫瘍細胞の浸潤能を抑制する。

(5) Shisa複合体の解明(論文投稿準備中): Shisaは小胞体内に局在することで様々なシグナル制御に機能する。これまでにShisaの小胞体局在化に不可欠な10アミノ酸を同定した。この10アミノ酸を欠失したShisa変異体は、Wnt・FGFシグナル制御や癌転移制御において正常型Shisaの機能抑制型変異体として機能することを見いだしている。この10アミノ酸と複合体を形成する複数の小胞体分子を同定し機能解析が終了している。

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 8 件)

1. Yingsong Zhu, Tsuchia A, Yamamoto A, Furukawa K. (10人中3番目、10番目) Expression and Roles of a Xenopus Head-Forming Gene Homologue in Human Cancer Cell Lines. Nagoya J. Med. Sci. 70: 73~82. 2008. 査読有り
2. Furushima K, Yamamoto A, Nagano T, Shibata M, Miyachi H, Abe T, Ohshima N, Kiyonari H, Aizawa S. Mouse homologues of Shisa antagonistic to Wnt and Fgf signalings. Dev Biol., 306: 480-92. 2007. 査読有り
3. Nagano T, Takehara S, Takahashi M, Aizawa S, Yamamoto A. Shisa2 controls the maturation of somitic precursors and transition to the segmental fate in *Xenopus* embryos. Development, 133: 4643-4654. 2006. 査読有り
4. Yamamoto A. Regulation of Wnt and FGF signaling within the endoplasmic reticulum for head formation. J. Oral Biosci., 48 (1): 18-21. 2006. 査読有り
5. 山本 朗仁: 小胞体内におけるWnt・FGFシグナリング制御メカニズム. 細胞工学, 25 (9), 1068-1072. 2006. 査読無し
6. 山本 朗仁: 小胞体と脊椎動物頭部形成, Shisa. 実験医学 24 (9), 1354-1356, 2006. 査読無し
7. Yamamoto A, Nagano T, Takehara S, Hibi M, Aizawa S. Shisa promotes head formation through the inhibition of receptor protein maturation for the caudalizing factors, Wnt and FGF. Cell, 120: 223-235. 2005. 査読有り
8. 山本 朗仁: 脊椎動物の頭部形成においてWntおよびFGFシグナルを抑制する新たな分子メカニズム. 実験医学 23 (10), 1555-1558, 2005. 査読無し

[学会発表](計 7 件)

1. Yamamoto A, Symposium of developmental biology (National Research Center for Environment and Health of Germany) Morphogenetic Signalling: FUNCTIONAL ANALYSIS OF SHISA GENE FAMILY, 2007, 6, 10. ミューヘン

2. 山本朗仁: 第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学:小胞体におけるWntおよびFGFシグナリング制御機構, 2007, 2, 23. 福岡
 3. 山本朗仁: 第28回日本分子生物学会大会:小胞体におけるWntおよびFGFシグナリング制御機構と脊椎動物の頭部形成, 2005, 12, 10. 福岡
 4. 山本朗仁: 第76回日本動物学会大会:脊椎動物の頭部形成においてWntおよびFGFシグナリングを抑制する新たな分子メカニズム, 2005, 10, 15. 筑波
 5. 山本朗仁: 第47回歯科基礎医学会総会:小胞体におけるWntおよびFGFシグナリング制御機構と脊椎動物の頭部形成, 2005, 9, 25. 仙台
 6. Yamamoto A.: Promotion of Xenopus functional genomics, International workshop: Regulation of Wnt and FGF signaling in the ER controls vertebrate head formation, 2005, 9, 20. 岡崎
 7. Yamamoto A.: 15th International Society of Developmental Biologists Congress, Symposium of Signal transduction: Regulation of Wnt and FGF signaling in the endoplasmic reticulum controls vertebrate head formation, 2005, 6, 10. シドニー
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
山本 朗仁 (Yamamoto Akihito)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任准教授
研究者番号: 50244083
- (2) 連携研究者
古川 鋼一 (Furukawa Koichi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 80211530