

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06324

研究課題名(和文) マウス初期胚におけるWnt/PCPシグナル経路による形態形成制御の解析

研究課題名(英文) Study of morphogenesis regulated by the Wnt/PCP pathway during early mouse embryogenesis

研究代表者

安島 理恵子 (Ajima, Rieko)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・助教

研究者番号：10615066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の発生においてWnt/PCPシグナル経路は、組織伸長と平面内極性制御という、2つのイベントを制御することで、様々な組織の形態形成を司る。しかし、その下流の分子機構は不明のままである。本研究計画では、Wnt5a刺激有無によりPCPコアタンパク質Pk, Dvlへの結合が変化する因子を複数同定し、得られたタンパク質の遺伝子欠損マウスを作製し、前後軸伸長ならびにノードにおける平面内極性の構築における表現型の解析を行った。その結果、平面内極性構築でのみ重要な役割を持つ因子を複数同定した。このことは、Wnt/PCPシグナル経路の下流では組織伸長と平面内極性制御が異なる因子により制御されることを示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Wnt/PCPシグナル経路は、様々な組織の形態形成および恒常性の維持を制御しており、その異常は遺伝疾患の原因になることが知られている。本研究で同定されたWnt5a下流因子の各組織における機能を調べることは、遺伝疾患の発症機序の解明につながると考えられる。また、再生医療の分野において、多能性細胞から分化誘導した組織が生体内で機能する上で、組織の形態と極性の制御は必須である。本研究で得られた結果は、再生医療の分野にも重要な知見をもたらすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In vertebrate development, the Wnt/PCP signaling pathway regulates the morphology of various tissues by controlling two events: tissue elongation and planar cell polarity establishment. However, the molecular mechanism underlying these events remain unclear. In this research project, we identified multiple factors that change the binding to PCP core proteins Pk and Dvl depending on the presence or absence of Wnt5a stimulation. I established gene targeted mice for the obtained proteins, and analyzed the phenotypes in anterior-posterior axis elongation and planar cell polarity establishment in the node. As a result, we identified several factors that play important roles only in planar cell polarity establishment. This indicates that tissue elongation and planar cell polarity establishment are controlled by different factors downstream of the Wnt/PCP signaling pathway.

研究分野：発生生物学

キーワード：Wnt5a 平面内極性 前後軸伸長 形態形成

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の発生において、Wnt/PCP シグナル経路は、上皮細胞の平面内極性制御と間葉系細胞の細胞運動制御を介した組織伸長という、多岐にわたる形態形成を制御している。しかし PCP コアタンパク質下流の分子経路は、未だ不明である。また平面内極性と細胞運動という異なるイベントを制御する上で、共通した分子が異なる役割を果たすのか、それぞれ全く異なる分子が働いているのか不明なままであった。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、Wnt/PCP シグナル経路で働く因子の同定とその機能解析により、哺乳類の発生における形態形成制御機構を明らかにすることである。

特にマウス初期発生において Wnt5a により制御される 2 つの形態形成イベント；前後軸伸長ならびにノードにおける平面内極性の構築を焦点に解析を行うことで、PCP コアタンパク質下流の分子経路を明らかにするとともに、細胞運動と平面内極性制御に共通した分子機構があるか否かを比較する。

3. 研究の方法

(1) Wnt5a刺激依存的にPCPコアタンパク質Pk, Dvlに結合する因子を同定する。

PCP コアタンパク質 Pk, Dvl は、平面内極性を示す細胞内で非対称に局在するため、異なる下流因子と結合する可能性が高い。Wnt5a 刺激依存的に Pk, Dvl それぞれに結合する因子を同定するために、野生型 ES 細胞と、*Wnt5a* 欠損 ES 細胞に、エピトープタグ付き Pk もしくは Dvl を導入する。次に ES 細胞を Wnt5a 発現細胞である未分節中胚葉細胞 (Presomitic mesoderm: PSM) に分化誘導し、エピトープタグの抗体で Pk もしくは Dvl を含む複合体を精製する。精製した複合体に含まれるタンパク質を MASS 解析で同定する。Wnt5a 刺激の有無で PCP コアタンパク質との結合が変動する Wnt5a 下流候補因子に着目し、機能的に細胞運動/細胞極性に関わる因子、かつマウス初期胚で PSM・ノードに発現が観察される因子に絞る。

(2) Wnt5a下流候補因子の初期発生時の形態形成制御における機能を解析する。

上記のスクリーニングで得られた Wnt5a 下流候補因子の機能解析を、遺伝子変異 (KO) マウスの表現型が不明のものに関しては CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いた F0 解析による形態形成制御解析を行う。すでに発生初期に胎生致死になることが報告されている遺伝子に関しては、前後軸伸長を担う中胚葉細胞特異的、もしくは平面内極性の解析にはノード特異的なコンディショナル KO マウスを、F0 キメラ解析により作製・解析を行う。

4. 研究成果

(1) Wnt5a 刺激依存的に PCP コアタンパク質 Pk, Dvl に結合する因子の同定。

初めにWnt5a刺激の有無によりPCPコアタンパク質Pk, Dvlへの結合が変化する因子の同定を行なった。Dvlに結合する因子には、既知の結合因子が複数含まれていた。このことは、ES細胞の中胚葉分化誘導系と結合複合体の精製が成功していることを示している。また、Dvl, Pkにはそれぞれ、機能的に前後軸伸長や平面内極性の構築に関わりが予想される複数のタンパク質が、Wnt5a刺激依存的な結合を示すことがわかった。その中でPkと Dvl両方に結合する因子、並びに他の種で前後軸伸長や平面内極性構築に関与するとの報告がある因子に焦点を絞り、生体内における機能解析を進めた。

(2) Wnt5a下流候補因子の初期発生時の形態形成制御における機能解析

まず Wnt5a 下流候補因子の初期発生時の生体内における発現パターンの解析を行い、Wnt5a 発現組織である未分節中胚葉並びにノードで発現が確認された因子に絞り、機能解析を進めた。

遺伝子変異マウスを作製・解析したところ、Pkと Dvl両方に結合する2つの因子のK0マウスが、ノードにおける平面内極性の構築に異常が生じることがわかった。このことは、本研究課題の基盤となるWnt5aの下流で働く因子が、本研究で採用した方法で同定できていることを示している。

ひとつはE3ユビキチンligaseであったため、PkもしくはDvlがこのE3ユビキチンligaseのターゲットになるか確認したところ、Pkがターゲットである可能性を見出した。さらに、このE3ユビキチンligaseのK0マウスでは、ノードにおけるPkの細胞内の非対称局在に異常が生じ、その結果他のPCPコアタンパク質の局在にも異常が生じた。これらの結果から、このE3ユビキチンligaseがノードにおける平面内極性制御に必須な因子であることが示された。

もうひとつは繊毛の基底小体を構成する因子として報告があるタンパク質である。この因子は、ノードにおいて繊毛が細胞の尾部側に偏った局在を示す機構に関与する可能性について解析を進めている。この因子の機能が明らかになることで、平面内極性の構築のメカニズムの一端を明らかにできると考えている。

K0 マウスの解析により、この2つの因子はいずれも前後軸身長には寄与しないことも併せて見出した。この結果は、平面内極性と細胞運動という Wnt/PCP シグナル経路によって制御される2つの異なるイベントが、下流で異なる分子が働くことによって制御されていることを示している。

現在、さらに複数のPk, Dvl 結合因子の遺伝子欠損マウスの作製と解析を並行して進めており、マウス初期発生においてWnt/PCPシグナル経路により制御される形態形成過程のさらなる理解を深める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakaya Masa-aki, Gudmundsson Kristibjorn Orri, Komiya Yuko, Keller Jonathan R., Habas Raymond, Yamaguchi Terry P., Ajima Rieko	4. 巻 15
2. 論文標題 Placental defects lead to embryonic lethality in mice lacking the Formin and PCP proteins Daam1 and Daam2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0232025
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0232025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Rieko Ajima
2. 発表標題 Identification and characterization of Wnt5a downstream targets during early development in mouse
3. 学会等名 53rd JSDB meeting（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rieko Ajima
2. 発表標題 Identification and characterization of Wnt5a downstream targets during early development in mouse
3. 学会等名 JSDB Online Trial meeting 2020
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rieko Ajima
2. 発表標題 Identification of Wnt5a downstream targets during early development in mouse
3. 学会等名 The 52nd JSDB meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rieko Ajima
2. 発表標題 Identification of Wnt5a downstream targets during early development in mouse
3. 学会等名 Wnt Signaling Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rieko Ajima
2. 発表標題 Identification of Wnt5a downstream targets during early development in mouse
3. 学会等名 CDBL seminar series, NCI-Frederick, NIH (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rieko Ajima
2. 発表標題 Identification of Wnt5a downstream targets during early development in mouse
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of JSDB and JSCB (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rieko Ajima
2. 発表標題 Identification of Wnt5a downstream targets during early development in mouse
3. 学会等名 Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biologists (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	相賀 裕美子 (Saga Yumiko) (50221271)	国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・教授 (63801)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------