

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21625

研究課題名（和文）新規 カテニンリン酸化動態可視化法を用いた生体内Wntシグナル調節機構の解析

研究課題名（英文）Development of visualization method of phosphorylation dynamics of beta-catenin for the study of in vivo Wnt signal regulation machinery

研究代表者

高井 啓 (Takai, Akira)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：60637205

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、新たに カテニンのリン酸化動態を可視化するプローブを開発することで、Wntシグナルを カテニンタンパク質レベルで実時間定量する方法の開発に取り組んだ。その結果、既存のプローブと比較してWntシグナルに対する応答性の高いプローブを複数開発することに成功した。今後はこれらプローブのS/Nおよび感度をより改良し、生体内Wntシグナルの定量解析とその調節機構の解析に取り組む。

研究成果の概要（英文）：In this research, we aimed to develop novel visualization probes of phosphorylation dynamics of  $\beta$ -catenin for real-time and quantitative analysis of Wnt signaling at the level of  $\beta$ -catenin protein. As a result, we succeeded in the development of several probes with higher responsiveness to Wnt signaling, compared with conventional Wnt probe. After further improvement of these probes in S/N and sensitivity, we will apply these probes to quantitative analysis of in vivo Wnt signaling and study its regulation machinery.

研究分野：発生生物学、細胞生物学

キーワード：Wntシグナル シグナル伝達 プローブ開発 発生生物学

1. 研究開始当初の背景

- (1) 脊椎動物の初期発生過程では、細胞外からの各種シグナルによって胚組織中の組織パターンが決定されると考えられている。例えば中枢神経組織の前脳・中脳・菱脳・脊髄といった前後軸に沿ったパターン形成は、Wnt や FGF などの後方化シグナルの濃度勾配によって形成されると理解されている。しかしながら細胞外のシグナル伝達物質の濃度勾配として表現された位置情報を、各々の細胞がいかに読み解き、細胞分化・組織パターン形成が進行するののかについては未だ不明な点が多い。特に細胞外の Wnt リガンドの濃度は連続的に変化する、つまり濃度は徐々に高くなったり低くなったりするはずであるが、細胞の分化運命は前脳あるいは菱脳という非連続的（閾值的）応答を示し、前脳と菱脳の間期の性質を持った細胞にはならない。これはなぜか？
- (2) 申請者はこれまでに Wnt/ $\beta$  カテニンシグナルによる脊椎動物中枢神経組織の前後軸パターン形成の制御機構について解析してきた (Takai et al., *Development* 2010)。その結果、頭側中枢神経組織において、Ror2 受容体を介したシグナル経路が前脳の運命決定に重要であることを見出した。さらなる解析の結果、Ror2 シグナルは Wnt/ $\beta$  カテニン経路を、 $\beta$  カテニタンパク質の下流で抑制していることが判明した。これはパターン形成に関わる既知の Wnt 抑制因子が細胞外レベルで作用することと対照的である。以上のこ

とから申請者は、Ror2 シグナル経路が細胞内での Wnt/ $\beta$  カテニンシグナルの”伝達過程”を fine-tuning することで、前脳・中脳などの非連続的な領域決定という”伝達出力”を生み出すのに重要な役割を担っているのではないかと、という仮説に至った (図1)。

- (3) 一方、Wnt/ $\beta$  カテニンシグナルを in vivo で定量的に解析する方法は限られており、上記仮説を検証するには技術的に困難な点がある。Wnt/ $\beta$  カテニンシグナルの最下流での標的遺伝子の発現は、レポーターアッセイでの解析例がある。しかしながらその上流の  $\beta$  カテニタンパク質レベルでの Wnt シグナル解析については、 $\beta$  カテニタンパク質のウエスタンブロットティングや免疫染色以外にこれまでに有効な解析法はほとんどなかった。

2. 研究の目的

本申請研究では、上記 Wnt/ $\beta$  カテニンシグナルの細胞内 fine-tuning 現象およびその制御機構の解析のため、Wnt シグナルを  $\beta$  カテニタンパク質で定量解析する新たなプローブを開発することを目的とする。十分な性能を持つプローブが開発できれば、次にそのプローブを Wnt/ $\beta$  カテニンシグナルの標的遺伝子レポーターと組み合わせ、Wnt/ $\beta$  カテニンシグナルをベータカテニタンパク質レベルおよび標的遺伝子発現レベルで同時解析を行うことで、fine-tuning 仮説の実証に取り組む。

3. 研究の方法

- (1) Wnt/ $\beta$  カテニンシグナルが伝達されていない状態では、その細胞内下流で GSK3  $\beta$  依存性  $\beta$  カテニタンパク質のリン酸化が生じ、リン酸化された  $\beta$  カテニンはユビキチン・プロテアソーム系によって分解され、そのタンパク質レベルは低く制御されている。一方で Wnt/ $\beta$  カテニンシグナルが伝達されると、 $\beta$  カテニタンパク質のリン酸化が抑制され、 $\beta$  カテニタンパク質レベルの増加及び核内移行が起きる。これを応用して、 $\beta$  カテニンの N 末端領域のリン酸化領域を模倣した人工ペプチドと GFP を組み合わせた GSK3 バイオセンサーが先行研究で使用されている。しかしながら GFP を計測する際の自家蛍光などが起因し、その定量性は低い。そこで本申請研究ではまず、申請者らの開発した自家蛍光のない定量性に優れた高輝度発光プローブである Nano-lantern (Takai et al., *PNAS* 2015) を応用し、新たに発光タンパク質型の GSK3 発光センサーを開発した。次にこのプローブの Wnt シグナル刺激に対する応答性を培養細胞を用いて検討した。

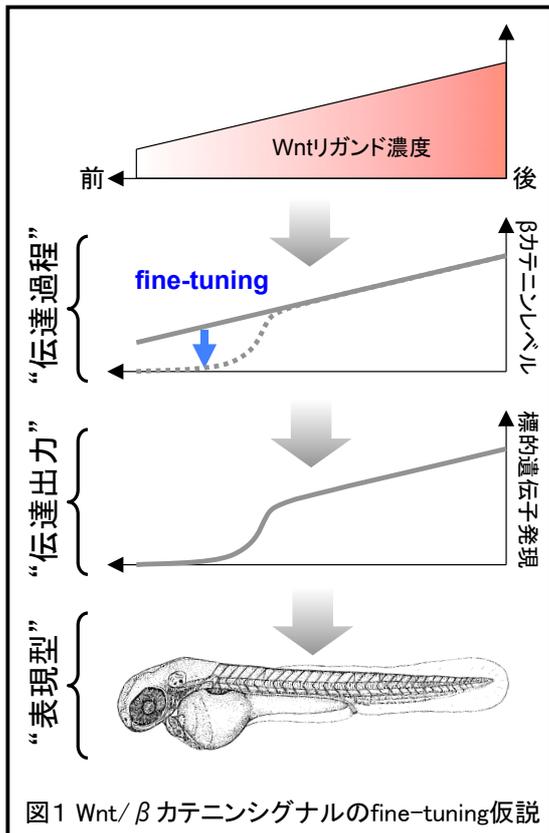
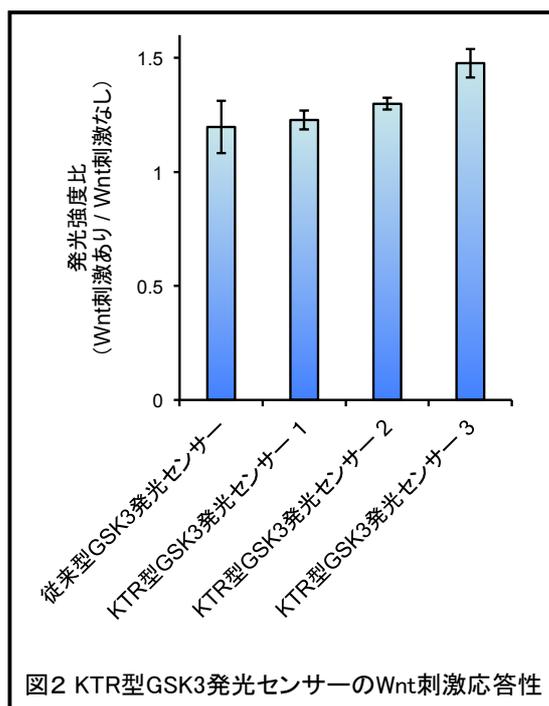


図1 Wnt/ $\beta$  カテニンシグナルのfine-tuning仮説

- (2) さらに KTR(kinase translocation reporter; Regot et al., *Cell* 2014)をβカテニンのN末端ペプチド配列に応用し、GSK3βによるリン酸化依存的に核外移行する新たなGSK3 バイオセンサーの開発を試みた。報告されているKTRのデザイン法をβカテニン N 末端領域に応用することで、4種類のKTR型GSK3 バイオセンサーペプチドをデザインした。これらバイオセンサーをNano-lanternのN末あるいはC末に融合したコンストラクト、さらにはバイオセンサーを複数タンデムに融合したコンストラクトも作製し、最終的に10種類以上のKTR型GSK3 発光センサーを作製した。次にこのプローブのWntシグナル刺激に対する応答性を培養細胞を用いて検討した。
- (3) 最後に、KTR型GSK3 発光センサーのS/Nの改善のため、Nano-lanternをN末とC末に分割したsplit Nano-lanternを応用したKTR型GSK3 分割発光センサーの開発を試みた。split Nano-lanternのC末を核移行シグナルと融合し、N末をKTR型GSK3 バイオセンサーペプチドと融合することで、Wntシグナルの伝達依存的にKTR型GSK3 分割発光センサー(N末)が核内移行し、split Nano-lanternのC末と再構成して発光するようデザインした。次にこのプローブのWntシグナル刺激に対する応答性を培養細胞を用いて検討した。

#### 4. 研究成果

- (1) まず、従来のGSK3 バイオセンサーにNano-lanternを応用した発光タンパク質型のGSK3 発光センサーを培養細胞に発現させ、Wnt刺激あり・なしの条件にお



ける発光強度を解析したところ、GFPの蛍光を用いたGSK3 バイオセンサーよりも定量性よくWntシグナル応答性を検出できることがわかった。さらに作製した10種類以上のKTR型GSK3 発光センサーを同様に解析したところ、従来型よりもWntシグナルに対する応答性に優れたセンサーが複数得られていることが判明した(図2)。またセンサーペプチド領域のタンデム化の効果も検討したところ、いくつかのペプチドについてはタンデム化によりWntシグナルに対する応答性が改善していることが判明した。

- (2) 上記の検討においてもっともWntシグナルに対する応答性の優れたセンサーペプチドについて、split Nano-lanternと組み合わせたKTR型GSK3 分割発光センサーを構築し、そのWntシグナルに対する応答性を培養細胞に発現させて検討した。その結果、Wnt刺激のない状態での発光強度が顕著に低減し、S/Nが改善していることが明らかとなった。
- (3) 最後に、本研究で開発したKTR型GSK3 発光センサーのWnt刺激依存的な局在変化を、培養細胞における1細胞イメージングで解析した。その結果、多くのKTR型GSK3 発光センサーはWnt刺激前から核内に局在していることが判明し、KTRとしての機能には改善の余地が多いことが考えられた。今後、このKTRとしての機能を改善することで、KTR型GSK3 分割発光センサーのS/NおよびWnt応答性がより改善され、生体内への応用に十分な性能を持ったプローブを開発できると期待される。

#### 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1件)

- ① 高井 啓、岡田 康志、3色の高輝度発光タンパク質プローブの開発と応用、*生化学*、第88巻、第5号、pp. 669-673 (2016)、査読有  
DOI:10.14952/SEIKAGAKU.2016.880669

[学会発表] (計4件)

- ① 高井 啓、岡田 康志、超高輝度マルチカラー発光タンパク質 Nano-lantern を用いた迅速かつ高感度な遺伝子転写活性・分子間相互作用の定量計測、第122回日本解剖学会総会・全国学術集会、長崎大学坂本キャンパス(長崎県・長崎市)、2017年3月28~30日
- ② Takai, A., Nakano, M., Saito, K., Haruno, R., Watanabe, T. M., Ohyanagi, T., Okada, Y.

and Nagai, T. An expanded color palette of super-brilliant luminescent proteins for multicolor, real-time bioluminescence imaging. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Sheraton Waikiki (Honolulu, USA), 2015 年 12 月 15～20 日

- ③ Takai, A., Nakano, M., Saito, K., Haruno, R., Watanabe, T. M., Ohyanagi, T., Jin, T., Okada, Y. and Nagai, T. Multicolor Nano-lanterns: the tricolored and super-brilliant luminescent proteins for multicolor, real-time bioluminescence imaging. 第 53 回日本生物物理学会年会、金沢大学（石川県・金沢市）、2015 年 9 月 13～9 月 15 日

- ④ 高井 啓、中野 雅裕、春野 玲弥、渡邊 朋信、大柳 達也、神 隆、岡田 康志、永井 健治、超高輝度発行タンパク質の多色化による遺伝子発現、オルガネラ動態および機能分子動態のマルチカラー・リアルタイムイメージング、第 67 回日本細胞生物学会、タワーホール船橋（東京都・江戸川区）、2015 年 6 月 30 日～7 月 2 日

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高井 啓 (TAKAI, Akira)  
理化学研究所・生命システム研究センター・基礎科学特別研究員  
研究者番号：6 0 6 3 7 2 0 5

(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 ( )