

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2016～2021

課題番号：16KT0078

研究課題名(和文) Wntによる細胞極性同調モデルの証明

研究課題名(英文) Coordinated cell polarization mediated by Wnts

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) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：動物の発生において、組織の細胞集団はしばしば同じ方向の極性を持ち、協調したふるまいや機能を発揮する。極性はWnt経路によって制御されているが、その方向の制御機構はいまだ不明である。我々は線虫の表皮幹細胞の極性方向がWntの濃度勾配依存的機構と、非依存的機構によって制御されていることを明らかにしている。Wntの受容体の一つCAM-1/Rorは体の頭側で多いという発現勾配を示すが、これを逆転させると細胞の極性も逆転する。さらに位置情報を制御するHoxの多重変異体において、極性が異常になることを発見した。Hoxが受容体の発現勾配を作り出すことで極性方向を制御していると推察される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞集団の極性が同調するいわゆるPCP制御は左右軸形成や形態形成など発生の様々な現象に重要である。Wnt濃度勾配が極性方向を制御するというこれまでのいくつかの報告では、均一なWntの発現実験により極性が異常になることを根拠にしているが、単純に過剰発現の結果である可能性を否定できない。我々の結果から他の生物においてもHoxや受容体発現勾配によって極性方向が制御されている可能性が指摘できる。

研究成果の概要(英文)：In animal development, a group of cells in a tissue are often polarized in the same orientation. Although such polarity is controlled by Wnt signaling, the mechanism regulating polarity orientation is poorly understood. We have found that polarity orientation of hypodermal stem cells in *C. elegans* is controlled by both gradient dependent and independent functions of Wnts. One of the Wnt receptor CAM-1/Ror is expressed in graded manner; higher in the anterior side of the body. Reversing this graded expression caused reversal of cell polarity. In addition, combined mutations of the Hox genes disrupted polarity. The results raised a possibility that polarity orientation is regulated by graded expression of the Wnt receptor that is established by the Hox genes.

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞極性 Wnt Hox

1. 研究開始当初の背景

正常発生や幹細胞からの自己組織化において、細胞集団の協調した振る舞いは機能的な器官構築やパターン形成に必須である。個々の細胞が同じ方向に極性化することで、秩序正しい器官形成が行われることは、様々な生物で知られている。極性同調は多くの場合 Wnt/PCP 経路によって制御されているが、それぞれの細胞の極性方向がどのように決定されるのかわかっていない。最も魅力的なモデルは、個々の細胞が Wnt の濃度勾配の方向を認識して極性方向を決める (instructive に働く) ことだが、このモデルは証明されていない。

2. 研究の目的

我々は線虫 *C. elegans* において Wnt が標的細胞 (尻尾にある T 細胞など) の隣で発現している場合は、Wnt がこの細胞の極性方向を決めることを発見した (Dev. Cell 2006)。Wnt の遠距離細胞の極性に対する効果を調べるため、頭から尻尾まで並んで位置している表皮幹細胞 (seam 細胞) の非対称分裂を調べた (図 1 A: PLoS Genet 2011)。主に 3 種類の Wnt が冗長的に極性方向を制御していること (Wnt がなくても極性化するが方向が異常: 図 1 B) から Wnt 勾配が instructive に働いていると予想したが、Wnt の異所発現でも極性方向が正常になったため (図 1 C)、Wnt は permissive に働いているように見える。また、ショウジョウバエの PCP 制御と異なり、方向情報は隣接細胞間で伝搬しない (ある細胞の極性異常は隣接細胞の極性に影響を与えない)。Wnt がどのように極性方向を制御しているか全く謎である。

PLoS Genetics への論文発表後、極性同調機構に関して以下の五つの結果を得た。

1、Wnt がないと極性は頻繁に逆転するが、LIN-17/Frizzled をさらに変異させると極性逆転は抑圧される (図 1 D)。つまり LIN-17 の活性は Wnt がいない場合、正常と反対向き directional 性を持っている。2、一分子 FISH 解析の結果、LIN-17 の発現は後ろの細胞で多いという勾配がある (図 1 A)。3、seam 細胞特異的プロモーターを用いて LIN-17 を均一に発現させ、発現勾配を壊すと、L2 期の (図 1 A 太線の分裂) 極性同調が異常になる。この結果から LIN-17 の発現勾配情報を極性方向に変換する機構が存在し、Wnt がいない場合は正常の逆向き (default)、Wnt により (その勾配と無関係に permissive に) LIN-17 もしくは別の受容体が活性化されると、default の逆になって正常方向になるというモデルが考えられた。また、4、位置情報をつかさどる Hox 遺伝子の二重変異体 (*lin-39 mab-5*) で、LIN-17 を均一発現させた場合と同様に、L2 期の極性同調が異常になることを発見しており、LIN-17 の発現勾配が Hox によって制御されていると予想している。

さらに、5、Wnt の異所発現は Wnt 変異体の異常を回復させるが (図 1 C)、*lin-17* 変異体で同様の実験を行うと、全く反対に、同じ異所発現が極性逆転を増強した (図 1 E)。この結果は少なくとも *lin-17* 変異体においては Wnt の濃度勾配が極性方向を instruct することを示している。以上の結果から、LIN-17 などの発現勾配を方向の情報として使い Wnt が勾配と無関係に permissive に働く制御と、Wnt の濃度勾配による instructive な制御によってロバストに極性が同調しているモデルが考えられる。

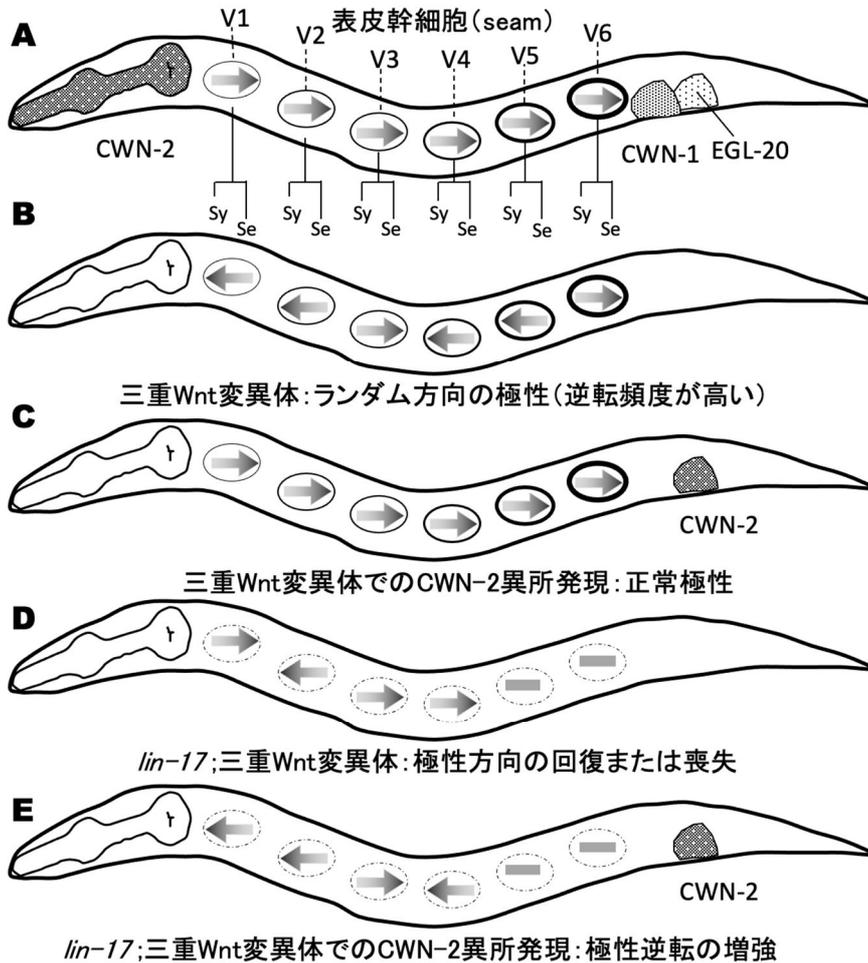


図1. 表皮幹細胞は三種類のWnt (CWN-2、CWN-1、EGL-20) の働きで同じ方向に極性化し、非対称分裂を繰り返す。細胞の輪郭の太さはLIN-17の発現量を示す。

3. 研究の方法

LIN-17 受容体に加えて、MOM-5/Fzd、CAM-1/Ror 受容体も勾配を持って発現している。これらの受容体はLIN-17と反対に、前方で発現が強い。これらの発現勾配の役割を調べるため、それぞれの受容体の勾配を反転させる。LIN-17はMOM-5受容体のプロモーターを用いて、通常とは反対に前方で強く発現させる。これとは反対に、MOM-5、CAM-1はLIN-17のプロモーターを用いて、後方で強く発現させる。

Wntが instructive および permissive な効果を与える機構を明らかにするため、内在性 Wnt および受容体の局在を、内在遺伝子に蛍光タンパク遺伝子が挿入された株を用いて明らかにする。

Hox の効果を明らかにするため、*lin-39 mab-5* に加えて、それより前方で発現する *ceh-13* も阻害する。*ceh-13* 変異体は胚性致死なため、*ceh-13* 内在遺伝子に、分解シグナル AID をゲノム編集で挿入し (*ceh-13::AID*)、胚発生後に阻害する。また同時に *lin-39 mab-5* も阻害するため、*ceh-13::AID* 株に、ゲノム編集でさらに *lin-39 mab-5* を欠失させる。

4. 研究成果

(1) 細胞極性は Wnt 受容体の発現勾配によって制御される。

受容体の発現勾配の効果調べるため前方で強く発現する *cam-1/Ror* を *lin-17* 遺伝子のプ

口モーターを用いて (*lin-17p::CAM-1*) 発現させて、発現勾配を逆転させた。野生型に発現させると seam 細胞の極性に異常が生じ、特に V3 細胞では 5 割程度の極性逆転が観察された。さらに *cam-1* 変異体で同様に発現させると、V1 V2 細胞でも極性が顕著に逆転した。つまり、*cam-1* 変異体 (これ自身では V1 細胞の極性が逆転する) で CAM-1 を発現させても、rescue されず、逆に表現型が増強する。また、*lin-17p::CAM-1* の効果が単純に過剰発現であれば、内在性 *cam-1* を変異させると、表現型は弱くなるはずだが、逆に増強される。また、異常は *lin-17p::CAM-1* の発現量の低い前側の seam 細胞 (V1-V3) で観察された。この結果は、発現勾配を逆転させたために、極性が逆転していたことを示している。受容体の発現勾配によって、極性方向が制御されていることが明らかになった。

(2) 位置情報を制御する Hox による細胞極性制御機構

Hox 遺伝子 *lin-39 mab-5* の二重変異体で、L2 期の seam 細胞の二回目の分裂において、姉妹細胞の運命が入れ替わることから、極性が逆転していることが示唆されていた。*lin-39 mab-5* 二重変異体に GFP::*POP-1/TCF* を導入して極性異常を確認した。POP-1 は Wnt シグナル伝達の下流で働く転写因子で、細胞分裂のたびごとに、前側の娘細胞の方が多いという非対称局在を示す。*lin-39 mab-5* 変異体では L2 期に加えて、L1 期でも弱い極性異常が観察された。*lin-39* より前方で働く Hox 遺伝子 *ceh-13* に、分解シグナル AID をゲノム編集で挿入し (*ceh-13::AID*)、胚発生後に CEH-13 を分解させたところ、GFP::*POP-1* の L1 期での非対称局在に弱い異常が観察された。次に *ceh-13::AID* 変異体に、さらに *lin-39* 遺伝子の変異をゲノム編集で導入したところ、前方の seam 細胞 V1-V4 において、約 3 割程度、極性の喪失が観察された。この結果から細胞極性が Hox 遺伝子によって制御されていることが明らかになった。さらに *mab-5/Hox* にも変異を導入した 3 重 Hox 変異体 (*ceh-13::AID lin-39 mab-5*) の作成に成功しており、極性異常を調べている。

以上の結果から、Wnt 濃度勾配非依存的な極性方向は、Hox 遺伝子によって制御された Wnt 受容体の発現勾配によって制御されていることが示唆される。今後は、Hox が Wnt 受容体発現勾配を制御していることを確認することで、この仮説を証明する。

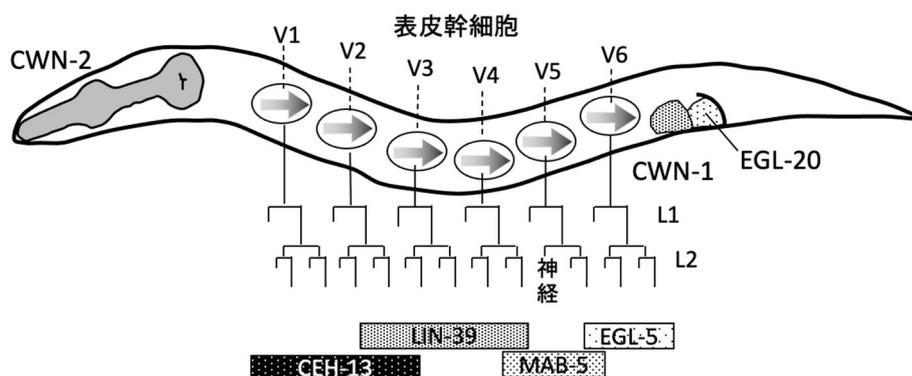


図2 表皮幹細胞系譜およびHoxとWntのおおよその発現部位

(3) Wnt と受容体局在のポジティブフィードバック機構

バージニア大学の Ariel Pani とノースカロライナ大学の Bob Goldstein との共同研究によ

り、内在性 *egl-20*/Wnt および *cwn-1*/Wnt 遺伝子の C 末に mNeonGreen をゲノム編集で挿入した strain を用いて、内在性の Wnt の局在を観察したところ、seam 細胞の後側に非対称に局在していた。定量したところ、*egl-20* 発現細胞に近い細胞 (V4 V5) だけでなく、遠い細胞 (V1 V2) でも同様の非対称局在が観察された。例えば、EGL-20 発現細胞により近い V4 細胞の前側より、V3 細胞の後側の方が EGL-20 が多いことから、単純に Wnt 濃度勾配を反映した局在ではなく、細胞の後側に Wnt を局在させる特異的な機構があることと考えられる。この EGL-20 の非対称な局在は Wnt 受容体、MOM-5/Frizzled および CAM-1/Ror の変異体で消失した。受容体が Wnt と結合して細胞膜上に固定することで非対称な局在を制御していると考えられる。またこの 2 種類の受容体も *egl-20* 依存的に細胞の後側に非対称に局在していた。以上の結果、Wnt と受容体がお互いにその局在を制御するフィードバック機構により非対称な局在が形成されていることが明らかになった。

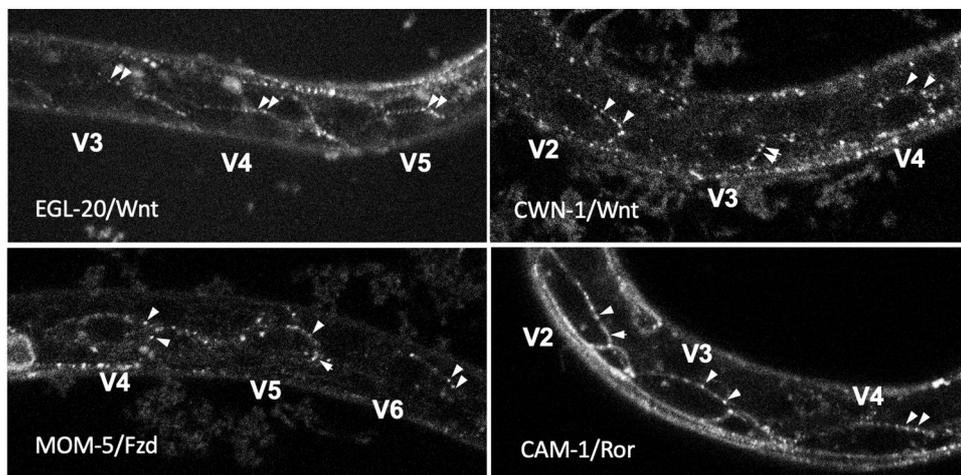


図3. L1期表皮幹細胞の分裂直前でのWntと受容体の非対称局在

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Negishi Takefumi, Kitagawa Saho, Horii Natsumi, Tanaka Yuka, Haruta Nami, Sugimoto Asako, Sawa Hitoshi, Hayashi Ken-ichiro, Harata Masahiko, Kanemaki Masato T	4. 巻 220
2. 論文標題 The auxin-inducible degron 2 (AID2) system enables controlled protein knockdown during embryogenesis and development in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/genetics/iyab218	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takefumi Negishi, Masayo Asakawa, Masato T Kanemaki, Hitoshi Sawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Modified auxin improves the auxin-inducible degradation (AID) system for laid <i>C. elegans</i> embryos	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 microPublication Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17912/micropub.biology.000190	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 -
1. 著者名 Sugioka Kenji, Fielmich Lars-Eric, Mizumoto Kota, Bowerman Bruce, van den Heuvel Sander, Kimura Akatsuki, Sawa Hitoshi	4. 巻 115
2. 論文標題 Tumor suppressor APC is an attenuator of spindle-pulling forces during <i>C. elegans</i> asymmetric cell division	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E954 ~ E963
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1712052115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ihara S, Nakayama S, Murakami Y, Suzuki E, Asakawa M, Kinoshita T, Sawa H.	4. 巻 130
2. 論文標題 PIGN prevents protein aggregation in the endoplasmic reticulum independently of its function in the GPI synthesis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 602-613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.196717	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hitoshi Sawa
2. 発表標題 Reciprocal control of Wnt and Frizzled asymmetry during cell polarization
3. 学会等名 22nd International C. elegans Conference (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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------