

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17082012

研究課題名（和文）分泌性シグナルタンパク質の細胞外環境における動態とその作用機構

研究課題名（英文）Movement and function of secreted signaling proteins in the extracellular environment

研究代表者

高田 慎治（TAKADA SHINJI）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：60206753

研究成果の概要（和文）：動物の発生や恒常性の維持には、分泌性シグナルタンパク質は重要な働きをする。シグナルタンパク質により制御される現象が秩序正しく起きるためには、シグナルタンパク質の分泌と細胞外での拡散が精密にコントロールされる必要がある。本研究では、代表的なシグナルタンパク質である Wnt に着目し、その分泌の関わる脂肪酸修飾機構について詳細に明らかにするとともに、経時的観察等により Wnt の拡散の様子を明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Secreted signal proteins transmit their signals locally, presumably since their secretion and transport are under tight control. We found that murine Wnt-3a is modified with a mono-unsaturated fatty acid, palmitoleic acid, at a conserved Ser residue, and showed that this modification is required for secretion. We expect that the discovery of this unexpected lipid modification might provide a clue regarding the higher-order structure of secreted Wnt proteins and strict control of their extracellular spreading.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	24,300,000	0	24,300,000
2006年度	20,400,000	0	20,400,000
2007年度	20,400,000	0	20,400,000
2008年度	19,500,000	0	19,500,000
2009年度	19,500,000	0	19,500,000
総計	104,100,000	0	104,100,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学、細胞生物学

キーワード：発生・分化、遺伝子、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

動物の発生過程の様々な局面において、Wnt, BMP, FGF といった分泌性のシグナルタンパク質が重要な働きを演じている。これらのタンパク質は産生細胞自身および周囲の細胞に対して働きかけるが、その拡散距離や分泌量に応じて作用を受ける細胞の数や反応のしかたが変わってくるのが考えられる。特に、受容する細胞が分泌タンパク質の濃度に応じて作用を異にする場合、すなわち組織の部域化、もしくはパターンニング、と呼ばれるような現象が引き起こされる場合には、その濃度勾配の傾斜と広がりの方が組織の形態形成や機能分化に大きな意味をもつ。したがって、分泌性シグナルタンパク質が細胞外環境へどのように分泌され、その環境下でどのように拡散が制御されるのかといったことは、動物の発生メカニズムを理解する上で本質的な問題であるが、その理解は研究開始当初はあまり進んでいなかった。

本研究で注目した Wnt の場合、ショウジョウバエ、線虫を用いた遺伝学的解析から、その分泌には Porcupine (Porc) と呼ばれる小胞体に局在する膜タンパク質が必要であることが示唆されていた。また、Porc がアシル基転位酵素と構造的に相同であることが示され、その酵素活性による脂質修飾が Wnt タンパク質の分泌に関わることが提唱されていた。しかしながら、他のグループによる先行研究では、Wnt が飽和脂肪酸であるパルミチン酸により修飾されるものの、その修飾は分泌には必要がないことが示され、脂質修飾と分泌の関連性は混沌としていた。

その一方で、ショウジョウバエにおいては分泌された Wnt タンパク質が脂質小胞により細胞間を移動することが示唆されていた。脂質小胞への Wnt の取り込みに脂肪酸修飾が関与するかどうかは明らかではないものの、Wnt に見られる特殊な修飾や細胞外輸送形態の存在は、Wnt タンパク質が通常の分泌タンパク質とは異なる機序により分泌、拡散されることを強く示唆していた。そして、そのような特殊な機序が Wnt タンパク質の拡散パターンの制御に重要ではないかと考えられていたが、Wnt の分泌・拡散に関わる分子メカニズムについては多くのことが未解決のまま残されていた。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、Wnt タンパク質の分泌、拡散の機構の解明に向けて、脊椎動物に存在する多種類の Wnt の中でもタンパク化学的解析が比較的進んでいた Wnt3a に注目し、Wnt3a タンパク質の分泌機構および分泌されたタンパク質の分子実体をおもに培養細胞系、さらには個体を用いた実験により明ら

かにしていくことを目的とした。それと同時に、脊椎動物の初期胚において Wnt や FGF といった分泌性シグナルが高レベルで分泌される尾芽に着目し、そこから発生する主要な組織である体節の発生過程におけるこれらシグナルの作用機構についても明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) Wnt タンパク質の分泌・拡散機構と分泌された Wnt タンパク質の解析

培養細胞を用いた *in vitro* の実験とアフリカツメガエルとゼブラフィッシュ胚を用いた *in vivo* の実験からこの問題に取り組んだ。Wnt の分泌に関わる Porc がアシル基転位酵素であることから、マウス L 細胞の培養上清に分泌された Wnt-3a の脂肪酸修飾を LC/MS/MS 法等で解析した。さらに、脂肪酸修飾の意義を調べるため、脂肪酸修飾部位に変異を導入した Wnt-3a の挙動を L 細胞ならびにアフリカツメガエルとゼブラフィッシュ胚を用いて解析するとともに、修飾酵素である Porc の阻害実験を L 細胞とゼブラフィッシュ胚において行った。L 細胞の場合は siRNA を、ゼブラフィッシュ胚の場合はモルフォリノアンチセンスオリゴを用いて発現の阻害を行った。

また、Wnt タンパク質の細胞外での動きをモニターするため、Wnt と GFP の融合タンパク質をアフリカツメガエル胚で発現させ、その動きを経時的に観察した。

(2) 尾芽におけるシグナル分子の作用機構の解析

ゼブラフィッシュを用いて、FGF シグナルの応答機構に異常を呈する突然変異体の表現型を種々のマーカー遺伝子を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション等により解析するとともに、突然変異体の原因遺伝子をポジショナルクローニングにより同定した。

4. 研究成果

(1) Wnt において発見された新たな脂肪酸修飾とその意義

培養細胞から分泌された Wnt-3a タンパク質の脂肪酸修飾を LC/MS/MS 法により解析した結果、これまでに知られていたパルミチン酸による修飾とは異なる様式の修飾が発見された。その特徴は、モノ不飽和脂肪酸であるパルミトレイン酸がセリン残基に特異的に結合していることである (図 1)。これはモノ不飽和脂肪酸がタンパク質に特異的に結合することが示された初めての例であり、セリン残基への脂肪酸の修飾という点においても本例の他には過去に一例 (グレリン) の報告があるにすぎない。

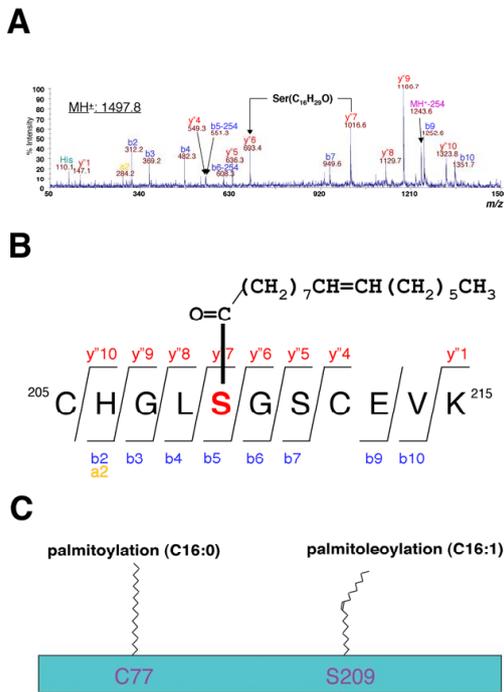


図1 Wnt に見いだされた特殊な脂肪酸修飾 (A) Wnt の脂肪酸修飾を解析した MASS スペクトルのデータ。(B) A の結果等により明らかになった新たな脂肪酸修飾。セリン残基にモノ不飽和脂肪酸であるパルミトレン酸が付加する。(C) Wnt に見られる2つの脂肪酸修飾。先行研究により見つけられた Cysteine(C77)へのパルミチン酸修飾に対し、我々が発見した報告したパルミトレン酸による修飾には Porc が必要である。

このような特異的な脂肪酸修飾が持つ生理的意義を探るため、脂肪酸修飾部位であるセリン残基をアラニンに置換した変異 Wnt-3a を培養細胞である L 細胞ならびにアフリカツメガエル胚で発現させたところ、この変異 Wnt-3a は小胞体にトラップされ、分泌されなかった (図 2)。したがって、本研究で新たに発見された特異な脂肪酸修飾は Wnt の分泌に必要なことが明らかになった。

この脂肪酸修飾に、脂肪酸修飾酵素である Porc が関わるかどうかを確かめるため、L 細胞を用いてその発現を阻害したところ、Wnt-3a の脂肪酸修飾が低下し、分泌が抑えられたことから、Porc がこの特異な脂肪酸修飾に関わることが示された。さらに、Wnt-3a だけでなく、Wnt-5a の分泌も Porc が必要であることを示し、少なくとも L 細胞においては Porc はさまざまな Wnt の分泌に必要であると結論した。

以上の研究成果は、これまで不確かであった Wnt の脂肪酸修飾と分泌の関係を明確に示した点、Porc が Wnt の分泌に必要なことを明確に示した点でシグナルタンパク質の分泌

機構の理解に大きく貢献した。このような脂肪酸修飾がなぜ分泌に必要なのかということは興味深い問題であり、この特殊な分泌機構が分泌された Wnt タンパク質の高次構造や細胞外での拡散にどのように関連するのかといったことがこれから明らかにすべき新たな問題として浮かび上がった。また、ここで見いだされた脂肪酸修飾の様式はこれまでに報告のない新奇なものであり、タンパク質の翻訳後修飾の新たな様式を提示した点においても注目された。

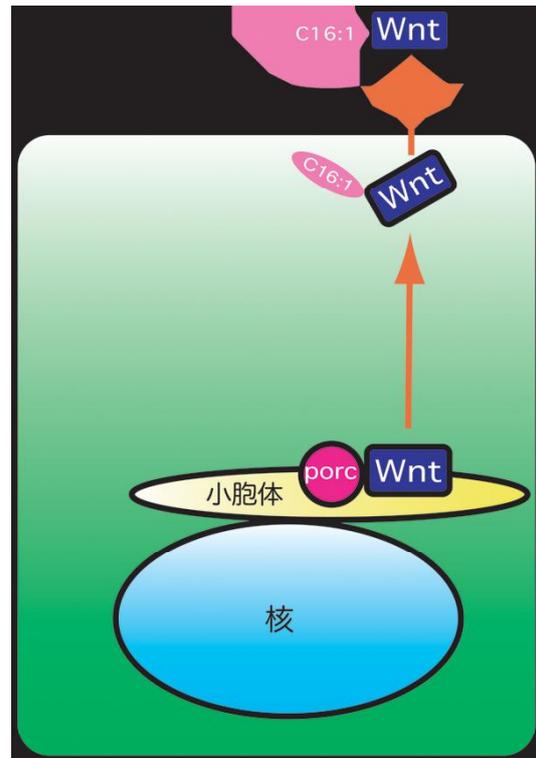


図2 Wnt タンパク質の分泌における Porc の役割

Wnt タンパク質は小胞体でアシル基転移酵素である膜タンパク質 Porc により特異な脂肪酸修飾(16:1)を受けた後、小胞体からの分泌経路によって細胞外へと運搬される。

(2) 発生過程における脂肪酸修飾酵素の特異的作用

一方、このような脂肪酸修飾がすべての Wnt において同様の生理的意義を持つのか、また脂肪酸修飾酵素 Porc は Wnt 以外にも作用しうるか等の問題を明らかにするため、ゼブラフィッシュをモデルに生体内における Porc の役割を検討した。ゲノムデータベースを検索したところゼブラフィッシュには他の動物の Porc と構造的に類似なタンパク質をコードする遺伝子が2つ存在することがわかったが、このうち Porc の機能を有するのは片方のみであることが明らかになり、そちらに注目して研究を進めた。

ゼブラフィッシュの *Porc* は母性 mRNA が初期卵割期にすでに存在しているが、その発現パターンはユビキタスではなく、発生の進行とともに中枢神経系等に強く発現するようになる。このことは *Porc* による Wnt の分泌の制御が細胞ごとに異なる、即ち Wnt の分泌プロセスそのものが発生過程で調節されていることを示唆している。一方、*Porc* 機能阻害胚では、収斂伸長運動と呼ばれる原腸陥入運動の異常が認められた (図3)。これは非古典的 Wnt 経路の異常で起きることが知られている表現型であり、*Porc* が非古典的 Wnt 経路を活性化する Wnt の機能に必要であることを示唆している。

QuickTimey C?
TIFF (LZW) 8LIEÉvÉcÉOÉaÉÁ
Ç™Ç±ÇÀÉsÉNE'ÉÉÇ%â@ÇÉÇZÇ¼Ç...ÇÖIKóvÇ-ÇÁE

QuickTimey C?
TIFF (LZW) 8LIEÉvÉcÉOÉaÉÁ
Ç™Ç±ÇÀÉsÉNE'ÉÉÇ%â@ÇÉÇZÇ¼Ç...ÇÖIKóvÇ-ÇÁE

図3 Porc 阻害胚における原腸形成運動の異常 コントロールゼブラフィッシュ胚(A), *Porc* 阻害胚(B) *Porc* 阻害胚では原腸形成期における収斂伸長運動運動に異常が生じ、体幹部の長さが短くなる。

一方、古典的 Wnt 経路の異常として知られているいくつかの表現型は *Porc* 阻害胚では認められず、古典的 Wnt シグナルにより活性化される遺伝子の発現が抑制されることもなかった。さらに、いくつかの Wnt タンパクの分泌を *Porc* 阻害胚で調べたところ、非古典経路を活性化する Wnt-5 の分泌は抑制されるものの、古典的 Wnt 経路を活性化する Wnt-3a の分泌は阻害されなかった。以上のことから、発生過程の生体内では *Porc* は Wnt の機能発現に関わるものの、その作用には Wnt に対する特異性があることがわかった。

以上の研究成果から、*Porc* は生体内においても Wnt の分泌を制御していることが示されると同時に、*Porc* は Wnt の種類により選択的に作用する可能性が示唆された。このような *Porc* の機能の特異性は、Wnt の種類により分泌様式が異なる可能性を示唆しており、Wnt

の機能制御を考える上における分泌機構の重要性が新たに浮き彫りになった。

(3) 細胞外における Wnt の挙動

細胞外に分泌された Wnt タンパク質の挙動を時間経過とともに観察するため、アフリカツメガエル胚に GFP を融合させた Wnt-3a を発現させタイムラプス観察を行った。細胞外に分泌された Wnt-3a はドット状の集合体として観察され (図4)、比較的長時間安定に存在し続けた。さらに、Wnt-3a が集合体を形成する上で関与する因子を同定した。以上のことから、細胞外に分泌された Wnt タンパク質は均一に拡散するわけではなく、むしろ細胞膜の局所に局在して存在し易い傾向にあること、そしてそのような局在化には他の分子との相互作用が関与することが示唆された。

このような局在化の持つ意義を明らかにすることが今後の大きな問題であり、生理的条件下でこのような局在化が起きるかという問題も含め、本研究成果は Wnt シグナルの研究に新たな問題を提示することになった。

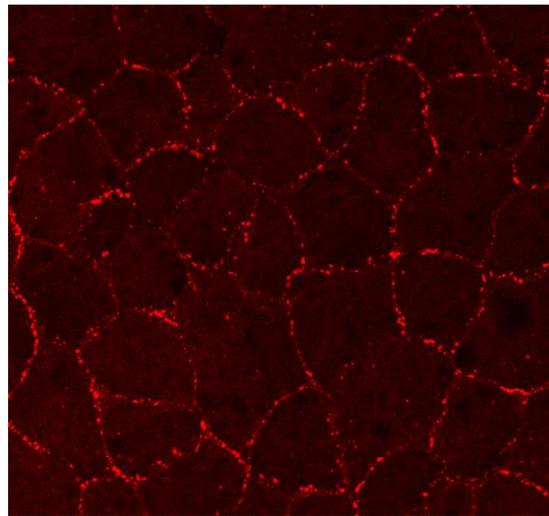


図4 細胞外に分泌された Wnt タンパク質 アフリカツメガエル胚の上皮細胞に発現させた Wnt-3a タンパク質 (赤い点) の挙動を解析した。分泌された Wnt-3a タンパク質は均一に拡散するのではなく細胞膜上の局所にドット状に局在した。

(4) 尾芽におけるシグナルの認識機構

尾芽での FGF シグナルの認識機構に焦点を当て、FGF シグナルによる誘導機構に異常を示す変異体ゼブラフィッシュの原因遺伝子を同定した。胚の後端に位置する尾芽から末分節中胚葉領域にかけて FGF シグナルは濃度勾配を形成するが、この FGF により発現が誘導される遺伝子として転写抑制因子である *Her13.2* をすでに同定していた。*Her13.2* の機能阻害胚では体節の分節異常を引き起こすことから、同様の異常を呈するゼ

ブラフィッシュ突然変異体の探索を行い、kt280 と命名した突然変異体において Her13.2 の発現量の低下ならびに FGF シグナル伝達に関わる ERK のリン酸化の低下が認められた (図 5)。それに対して FGF そのものの発現には異常は認められなかった。そこで、この変異体においては FGF シグナルに対する応答機構のどこかに異常があるものと考え、ポジショナルクローニングにより原因遺伝子の同定を行った。同定された遺伝子は RNA の核外輸送因子をコードしており、FGF シグナルの認識機構に関わる遺伝子の RNA 輸送が選択的に制御されている可能性が示唆された。

これは、RNA 輸送に関わる因子の異常がシグナルの認識もしくは伝達に特異的に影響を与えるということを示唆した初めての例であり、そのような特異性がいかにして生み出されるのかということに興味を持たれる。

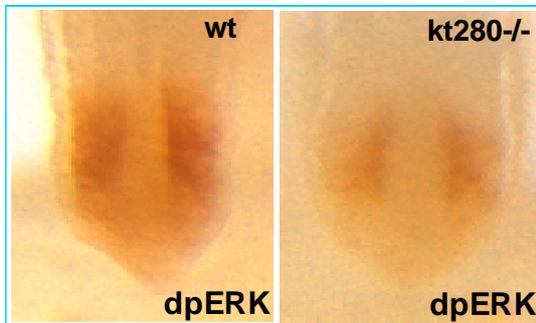


図 5 FGF シグナル認識機構に異常を呈する突然変異体
野生型(wt)に対して凸園変異体(kt280^{-/-})では、ERK のリン酸化に代表される FGF シグナル伝達の低下が認められる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 6 件)

- ① Agalliu D, Takada S, Agalliu I, McMahon AP, & Jessell TM. (2009) Motor neurons with axial muscle projections specified by Wnt4/5 signaling. *Neuron* 61, 708-720 (査読有)
- ② Alvarez-Medina, R., Cayuso, J., Okubo, T., Takada, S., & Marti, E. (2008) Wnt canonical pathway restricts graded Shh/Gli patterning activity through the regulation of Gli3 expression *Development* 135, 237-247 (査読有)
- ③ Akanuma, T., Koshida, S., Kawamura, A., Kishimoto, Y., & Takada, S. (2007) Paf1 complex homologues are required for Notch-regulated transcription during somite segmentation. *EMBO Rep*, 8, 858-863 (査読有)

- ④ Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., & Takada, S. (2006) Monounsaturated fatty acid modification of Wnt proteins: Its role in Wnt secretion. *Dev. Cell* 11, 791-801 (査読有)
- ⑤ Yamaguchi Y., Yonemura, S., & Takada, S. (2006) Grainyhead-related transcription factor is required for duct maturation in the salivary gland and the kidney of the mouse. *Development* 133, 4737-4748. (査読有)
- ⑥ Takada, R., Hijikata, H., Kondoh, H., & Takada, S. (2005) Analysis of combinatorial effects of Wnts and Frizzleds on b-catenin/armadillo stabilization and Dishevelled phosphorylation. *Genes Cells* 10, 919-928 (査読有)
- ⑦ Kawamura, A., Koshida, S., Hijikata, H., Sakaguchi, T., Kondoh, H., & Takada, S. (2005) Zebrafish Hair/Enhancer of split protein links FGF signaling to cyclic gene expression in the periodic segmentation of somites. *Genes Dev.* 19, 1156-1161 (査読有)

〔学会発表〕 (計 1 5 件)

- ① Chen Q. & Takada S. “Roles of Porcupine in Zebrafish Development” in 2009 Wnt Meeting, Washington DC (USA) 6/12 (2009)
- ② Takada S. “Specific lipidation and structure of secreted Wnt proteins” in “OIST symposium on Gradient and Signalling: from chemotaxis to development”, 沖縄, 11/19 (2008)
- ③ Takada S. “Wnt protein requires an unexpected type of lipid modification for its secretion.” 日本発生物学会、日本細胞生物学会合同年会、福岡、5/30 (2007)
- ④ 高田慎治 Wnt タンパク質の脂質修飾、分泌、細胞外輸送、日本分子生物学会 2006 フォーラム、名古屋 12/6 (2006)

〔その他〕

新聞発表

- ① 「Wnt タンパク質の脂肪酸修飾に関する成果」
日経産業新聞 2006年12月6日掲載、
科学新聞 2006年12月15日掲載
- ② 「Wnt タンパク質の発生過程における機能の解析に関する成果」
日経産業新聞 2006年11月9日掲載

ホームページ

<http://www.nibb.ac.jp/cib2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 慎治 (TAKADA SHINJI)
大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授
研究者番号：60206753

(2) 研究分担者

越田 澄人 (KOSHIDA SUMITO)
基礎生物学研究所・分子発生学研究部門・
准教授
研究者番号：40342638
(H17→H19)

赤沼 啓志 (AKANUMA TAKASHI)
大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特別協力研究員
研究者番号：50450721
(H19→H21)

(3) 連携研究者

高田 律子 (TAKADA RITSUKO)
大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特別協力研究員
(H20→H21)
研究者番号：40450720

陳 秋紅 (CHEN QUIHONG)
大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特別協力研究員
(H20)

矢部泰二郎 (YABE TAIJIRO)
大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特別協力研究員
(H20)
研究者番号：30470074