

令和 4 年 10 月 24 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07427

研究課題名(和文) 神経管形成に必要な平面内極性を制御する内的小胞および機械的刺激の解析

研究課題名(英文) Analysis of the internal or mechanical cues to regulate planar polarity for the neural tube formation

研究代表者

西村 珠子(Nishimura, Tamako)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：40415261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 神経管形成において神経上皮細胞層が陥入する際には、平面内極性分子Celsr1が背腹軸方向の細胞間接着に分布しアクチン繊維を極性収縮させるが、Celsr1を極性分布させる上流シグナルは不明である。そこで、細胞に加わる機械的刺激や、Wnt等の内的刺激が関与する可能性を検討した。その結果、Wnt分子の一部が、細胞膜由来の細胞外小胞であるマイクロベシクルを介して分泌され、受容体を活性化すること、またその分泌に、細胞膜を变形・切断するI-BARタンパク質が関与する可能性を新たに見出した。今後は、これらの現象がCelsr1の極性分布に関与するかを解明する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内的刺激因子Wntは、これまでタンパク質複合体やエンドソーム系細胞外小胞エクソソームを介して分泌されると考えられており、細胞突起由来のマイクロベシクルを介して分泌されうことを示したのは我々が初めてである。I-BARタンパク質MIMは神経管形成への関与が報告されており、その作用がCelsr1の極性分布を介する可能性がある。神経管の異常形成は新生児の先天性疾患で2番目に多く、Celsr1の様々な変異が報告されている。Celsr1を介したシグナル伝達の解明により、異常の原因解明や予防・治療につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： When the neuroepithelial layer is invaginated during the neural tube closure, a planar polarity protein Celsr1 is distributed to the cell-cell contacts along the dorsoventral axis and contracts actin filaments in that direction. However, upstream signals that polarize Celsr1 are unknown.

Therefore, we investigated the possibility that mechanical stimuli added to cells or internal stimuli such as Wnt might be involved in the process. As a result, some of the Wnt molecules were secreted through microvesicles, which are extracellular vesicles derived from the plasma membrane, and activated the Wnt receptor. Furthermore, I-BAR proteins, which deform and cleave the plasma membrane, were found to be involved in the Wnt secretion.

We would like to elucidate next whether these phenomena are involved in the polar-polarized distribution of Celsr1.

研究分野：Cell biology, Developmental biology

キーワード：Celsr1 neural tube Wnt I-BAR

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

平面内極性 (planar cell polarity, PCP) は、平面内における細胞や構造物の方向性、および細胞の収縮や伸長の方向性を制御し、器官形成において重要な役割を担っている。例えば、ハエ羽の剛毛や脊椎動物の体毛・繊毛の方向、神経管・脊索・卵管の形成や伸長が、PCP による制御を受ける。

PCP シグナル系では、5 種類の制御分子が細胞間接着部に特定の方向性を持って濃縮し、下流分子に方向性情報を伝達する。一方、PCP 制御分子を極性分布させるための上流メカニズムについては、これまで殆ど未解明であった。最近、ハエ羽や脊椎動物体毛の PCP 形成において隣接組織による機械的刺激が関与する可能性<sup>(1)</sup>、およびマウス体軸伸長の PCP 形成において制御分子 Frizzled に結合する液性因子 Wnt5a および Wnt11 が関与する可能性<sup>(2)</sup>が報告された。

我々は、脳・脊髄の前駆体である神経管が形成される際に、細胞間接着の制御を介して神経上皮細胞層の陥入が起こる機構を研究してきた<sup>(3-6)</sup>。そして、神経上皮の細胞間接着が背腹軸方向に収縮することが細胞層陥入に必須であり、その機構として PCP 制御分子で細胞間接着分子の Celsr1 が背腹軸方向の細胞間接着に特異的に分布し、下流シグナル系を介して背腹軸方向のアクチン収縮を活性化することを見出した<sup>(5,6)</sup>。しかしながら、神経上皮細胞層において Celsr1 を背腹軸方向の細胞間接着に分布させるための上流シグナルは明らかではない。

一方、BAR ファミリータンパク質は、脂質膜に結合して多量体を形成し、膜の突出構造や陥入構造を形成する<sup>(7)</sup>。中でも、細胞膜の突出構造を形成する I-BAR タンパク質は、細胞突起を介した Wnt8a の細胞間情報伝達および発生時の脳のパターンニングに関与し<sup>(8)</sup>、また神経管形成にも関与することが報告されている<sup>(9)</sup>。

### 2. 研究の目的

本研究では、神経上皮細胞層で Celsr1 を背腹軸方向に分布させる際の、機械的刺激及び液性因子 Wnt の役割について検証し、神経管における PCP の形成メカニズムを追究することを目指した。また、Celsr1 の極性分布における BAR ファミリータンパク質の関与の可能性についても、検討することとした。

### 3. 研究の方法

#### (1)培養細胞

本研究では、イヌ腎細胞株 MCDK-II 細胞、ヒト胎児腎細胞株 HEK293 FreeStyle (FS)細胞、Ror2-LRP6 および Super TOP FLASH を安定に発現するチャイニーズハムスター卵巢由来細胞株 CHO/Ror2-LRP6/Super TOP FLASH (大阪大学の菊池章先生より分与)を用いた。培地は、MCDK-II 細胞は 10% fetal bovine serum (FBS)を含む DMEM-F-12 medium (WAKO)、HEK293FS 細胞は FreeStyle293 Expression Medium (Thermo Fisher)、CHO/Ror2-LRP6/ Super TOP FLASH 細胞は 10% FBS を加えた F-12 medium (Nacalai) を用いた。

#### (2)PEI によるトランスフェクション

HEK293FS 細胞は、トランスフェクション 2 日前にフラスコに  $2.0 \times 10^5$  cells/ml, 30ml で播種した。プラスミドを、培地中での濃度が  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  でかつ 30ml culture あたり全部で 1ml になるように Opti-mem (Thermo Fisher) で希釈を行い、更にプラスミドの 3 倍量の PEI を 30ml culture あたり全部で 1ml となるように Opti-mem で希釈を行った。室温で 5 分間のインキュベーションを行い、その後、プラスミド溶液を PEI 溶液とピペティングによって混ぜた。室温で 30 分間インキュベーションを行った後に、プラスミド/ PEI 混合溶液を細胞に添加した。37、135rpm、8% CO<sub>2</sub> で 48 時間振盪培養した後、細胞外小胞の調製に使用した。

#### (3)細胞外小胞の調製

トランスフェクション後 48 時間の HEK293FS 細胞培養液 30ml を 1000g、5min で遠心し、細胞ペレットと培養上清を回収した。細胞ペレットは発現確認に使用した。次に、培養上清を 3000g、10min で遠心し、死細胞を沈殿させた。次に、上清を 16500g、20min、4 で遠心した。ペレットは PBS で懸濁し 1.5ml チューブに移し、16500g、20min、4 で再び遠心し、マイクロベシクル画分とした。上清は、超遠心分離機 (Optima L-90K Ultra, Beckman 45Ti Rotor) にて、120000g、70 min、4 で遠心した。遠心後、ペレットを PBS で懸濁し、超遠心機 (Optima TLX, Beckman TLA 120.2 rotor) にて、120000g、70min、4 で遠心し、ペレットをエクソソーム画分とした。

#### (4)HEK293FS 細胞の免疫染色

Collagen I-C (新田ゼラチン)/1mM HCl (pH3) をカバーガラス (MATSUNAMI) に塗り広げてドライアップし、培地で 3 回洗った後、24well plate へ移した。そして各 DNA をトランスフェクションした HEK293FS 細胞を播種し、8% CO<sub>2</sub> インキュベータで 37、24 時間培養した。その後、細胞培養液を除去し、4% PFA/PBS で室温 20 分間、細胞を固定した。細胞に 0.5% Triton-X100-PBS を入れ、室温で 20 分振盪した後、PBS-T (0.1% Triton-X100) で 1 回洗浄した。その後 3% BSA/10% goat serum/PBS で室温 1 時間ブロッキングを行い、PBS-T で 1 回洗浄した。次に、Blocking 液で希釈した一次抗体を室温で 2 時間反応させた後、PBS-T で 10 分間 × 3 回洗浄した。その後、Blocking 液で希釈した二次抗体を室温で 1 時間反応させ、PBS-T で 10 分間 × 3 回洗浄した。こ

のようにして得られたカバーガラスを ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI (molecular probes) 20  $\mu$ l でスライドガラスにマウントした。その後、共焦点顕微鏡 (Olympus FV1000, UPlanSApo x100/1.4 oil lens) で観察した。

#### (5) Wnt-PCP 経路活性測定のリポーターアッセイ

リポーターアッセイには CHO/Ror2-LRP6/Super TOP flash 細胞<sup>(10)</sup>を用いた。この細胞は、Wnt5 受容体 Ror2 の細胞外ドメインと LRP6 の細胞内ドメインのキメラタンパク Ror2-LRP6、および TCF/LEF 結合領域をルシフェラーゼ遺伝子の上流にもつ Super TOP flash レポーターが安定導入されている。測定を行う 1 日前に、CHO/ Ror2-LRP6/ Super TOP flash 細胞を 96 well white plate (Thermo Fisher) にて  $1.38 \times 10^4$  cells/ well で播種し、37  $^{\circ}$ C で一晩培養した。翌日、細胞培養上清から調製したマイクロベシクル画分またはエクソソーム画分を添加し、37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 存在下インキュベータにて 8 時間培養した。細胞に One-Glo EX Luciferase assay 試薬 (Promega) を等量添加し、室温、3 分間振盪した後、マルチプレートリーダー (BERTHOLD TECHNOLOGIES) にてルシフェラーゼによる化学発光を測定した。

### 4. 研究成果

(1) Celsr1-EGFP を安定発現する培養上皮細胞株を作製した。この細胞を伸縮性チャンバー上で培養し、その細胞層を細胞伸展器により一方向に伸展させた。しかしながら、チャンバーの伸展方向と Celsr1-EGFP の分布との明らかな相関は認められなかった。

(2) 培養上皮細胞系において Wnt 発現が Celsr1 の極性分布を引き起こすか検討した。C 末端に HA タグを付加した Wnt を Dox 誘導性に発現する MDCK-II 株を作製し、Celsr1-EGFP を安定発現する細胞株と混合培養 (細胞数: Celsr1 細胞 >> Wnt 細胞) して、Wnt 発現を誘導した際に Celsr1-EGFP が再配列するかを調べたが、Celsr1-EGFP の明らかな配列変化は認められなかった。

(3) 脂質膜に結合して多量体を形成することで膜の形態を制御する I-BAR タンパク質の一種が、神経管形成に関与することが報告されていたため、ニワトリ神経管凍結切片における様々な BAR ファミリータンパクの分布を、免疫染色により調べた。その結果、数種の BAR タンパクが形成中の神経管の apical 面に濃縮することが分かった。

(4) 数種類の Wnt について、内部 HA タグを付加した発現プラスミドを構築した。これらを HEK293FS 細胞にトランスフェクションし、その培養上清から細胞外小胞を調製し、ウエスタンブロッティングで解析した。その結果、Wnt 分子は、報告されているように大部分がエクソソーム画分に検出されたものの、少量がマイクロベシクル画分に検出された。

(5) Wnt 分子のマイクロベシクルを介した分泌における I-BAR タンパク質の関与について検討を行った。その結果、一部の Wnt 分子を活性化型 I-BAR タンパク質と HEK293FS に共発現すると、脂質膜に結合しない I-BAR タンパク質を共発現した場合と比較して、マイクロベシクル画分への分布量が増加した。また、免疫染色を行った結果、これらの Wnt 分子は細胞突起に分布し、かつ細胞突起において活性化型 I-BAR タンパク質と共局在した。

(6) 細胞外小胞に分泌された Wnt のレセプター活性化能をリポーターアッセイにより調べた。その結果、マイクロベシクルの Wnt は Wnt 受容体のシグナル伝達を活性化した。

以上の検討により、今回行った検討条件では、機械的刺激および N 末端タグの Wnt による Celsr1 の極性分布は認められなかったものの、新たな知見として、Wnt の少なくとも一部がマイクロベシクルを介して分泌されて Wnt 受容体を活性化すること、その分泌に I-BAR タンパク質が関与することが示唆された。今後はこれらの現象が、Celsr1 の極性分布に関与するかどうかを解明していきたいと考えている。

#### < 引用文献 >

1. Aw WY. et al. Current Biology, 26, 2090-2100 (2016)
2. Andre P. et al. Development, 142, 1516-1527 (2015)
3. Nishimura, T. New Principles in Developmental Processes (Springer), 123-136 (2014)
4. Nishimura, T. et al. Journal of Cell Biology, 215:4, 559-573 (2016)
5. Nishimura, T. and Takeichi, M. Development, 135:8, 1493-1502 (2008)
6. Nishimura, T., Honda, H. and Takeichi, M. Cell, 149:5, 1084-1097 (2012)
7. Nishimura, T. Morone, N. and Suetsugu, S. Biochem. Soc. Trans., 46:2, 379-389 (2018)
8. Stanganello, E. et al. Nature communications, 6, 5846 (2015)
9. Liu, W. et al. Development, 138:10 2035-2047 (2011)
10. Harada, T. et al. Cancer science, 108:1, 42-52 (2017)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hanawa-Suetsugu K*, Itoh Y*, Ab Fatah M*, Nishimura T*, Takemura K, Takeshita K, Kubota S, Miyazaki N, Wan Mohamad Noor WNI, Inaba T, Nguyen NTH, Hamada-Nakahara S, Oono-Yakura K, Tachikawa M, Iwasaki K, Kohda D, Yamamoto M, Kitao A, Shimada A, Suetsugu S (*equally contributed)	4. 巻 10
2. 論文標題 Phagocytosis is mediated by two-dimensional assemblies of the F-BAR protein GAS7	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-12738-w	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 西村 珠子, 末次 志郎	4. 巻 69
2. 論文標題 BARドメインタンパク質と細胞骨格による細胞膜の構造構築	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 203-207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Shoko Ito, Satoru Okuda, Masako Abe, Mari Fujimoto, Tetsuo Onuki, Tamako Nishimura and Masatoshi Takeichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Induced cortical tension restores functional junctions in adhesion-defective carcinoma cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-01945-y	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 Tamako Nishimura, Nobuhiro Morone and Shiro Suetsugu	4. 巻 46
2. 論文標題 Membrane re-modelling by BAR domain superfamily proteins via molecular and non-molecular factors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical Society Transactions	6. 最初と最後の頁 379-389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BST20170322	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12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中村 暢明、西村 珠子、末次 志郎
2. 発表標題 Wntのマイクロベシクル局在におけるI-BARドメインタンパク質の役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村珠子、大山 拓也、Hu Hooi Ting、塙 京子、末次 志郎
2. 発表標題 I-BARタンパク質MIMを介したマイクロベシクルの形成機序
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 末次 志郎、西村 珠子、重根 桂、日朝 祐太、大竹 義人、佐藤 嘉伸
2. 発表標題 細胞生物学研究者による細胞生物学におけるデータサイエンスの試み
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 茉奈美、西村 珠子、塙 京子、末次 志郎
2. 発表標題 細胞突起形成タンパク質IRSp53のドメイン依存的な分泌制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hooi Ting Hu, Tamako Nishimura, Shiro Suetsugu
2. 発表標題 The interaction between I-BAR domain proteins and ALIX in the formation and release of extracellular vesicles
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重根 桂、西村 珠子、日朝 祐太、大竹 義人、佐藤 嘉伸、末次 志郎
2. 発表標題 機械学習を用いたタンパク質局在に基づく細胞形態の記述の試み
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsuo Osuga, Tamako Nishimura, Shiro Suetsugu
2. 発表標題 Development of the Green Photoswitchable Fluorescent Protein with Fixation Resistance, a Variant of Eos Fluorescent Protein.
3. 学会等名 ASCB/EMSO 2019 meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wan Nurul Izzati Wan Mohamad Noor, Tamako Nishimura, Shiro Suetsugu
2. 発表標題 In-vitro FRET Analysis of Growth Arrest-Specific Protein 7 (GAS7).
3. 学会等名 ASCB/EMSO 2019 meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村珠子、末次志郎
2. 発表標題 I-BARタンパク質MIMによる細胞膜切断を介したマイクロベシクル形成機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会年大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村珠子、末次志郎
2. 発表標題 I-BARドメインタンパク質IRTKSの細胞間接着における役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大菅光雄、西村珠子、末次志郎
2. 発表標題 固定耐性を持つ点滅蛍光タンパク質の開発の試み
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大菅光雄、西村珠子、末次志郎
2. 発表標題 固定耐性を持つ点滅可能蛍光タンパク質の開発
3. 学会等名 科学研究費補助金・新学術領域「数理シグナル」第二回公開シンポジウム「数理シグナル 学術領域の新展開」
4. 発表年 2018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
---------	---------