

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08633

研究課題名(和文) 分泌性糖タンパク質Wnt5aの生体内動態及び動態制御機構の解明

研究課題名(英文) In vivo imaging of a secreted glycoprotein, Wnt5a

研究代表者

原田 武志 (Harada, Takeshi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30362768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体内におけるWnt5aタンパク質の動態を明らかにするため、マウスWnt5a遺伝子にVenus遺伝子をノックインしたマウス(Venus-Wnt5a KI)をCRISPR/Cas システムを用いて作製した。内在性のWnt5aが発現していることが報告されている組織において、Venus-Wnt5aが発現していることをウェスタンブロットや免疫染色により確認した。しかしながら、Venus-Wnt5a KIのホモ接合体は胎生致死となることから、Venus-Wnt5aが生体内においてWnt5aとして機能しないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではCRISPR/Cas システムを用いることにより従来のES細胞を用いる方法と比べて大幅に短期間でVenus-Wnt5a KIを作製することが出来た。Venus-Wnt5aはin vitroではWnt5aとしてシグナルを伝えられたが、生体内において機能しなかった。実際にノックインマウスを作製することにより初めてVenusのような分子量の大きい蛍光タンパク質はWntタンパク質のタグとしては不適切であることが明らかとなった。この事実は今後の分泌タンパク質の動態研究を行う上で非常に重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the kinetics of Wnt5a protein in vivo, we generated Venus-Wnt5a knock-in mouse (Venus-Wnt5a KI) using CRISPR/Cas system. We confirmed that Venus-Wnt5a was expressed in lung, heart, stomach and kidney same as the endogenous Wnt5a protein. Because the homozygote of Venus-Wnt5a KI was embryonic lethal, we revealed that Venus-Wnt5a did not work in vivo.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Wnt5a ライブイメージング 線維芽細胞 シングルセル解析

1. 研究開始当初の背景

Wnt は線虫やショウジョウバエからヒトに至るまで高度に保存された分泌性の糖タンパク質であり、ヒト・マウスにおいては19種類存在する。Wnt が細胞膜上の受容体に結合した後に活性化される細胞内シグナル伝達機構には β -カテニン経路と β -カテニン非依存性経路が存在する。 β -カテニン経路は Wnt1 や Wnt3a などが Fz および共役受容体 LRP5/6 に結合することにより活性化され、細胞質の β -カテニンが安定化する。細胞質内で蓄積した β -カテニンは核内に移行した後、転写因子 Tcf と複合体を形成し、種々の標的遺伝子の発現を促進して、その結果、細胞の増殖や分化を制御する。一方、 β -カテニン非依存性経路は、Wnt5a や Wnt5b などにより活性化され、少なくとも平面内細胞極性 (Planar cell polarity:PCP) を制御する PCP 経路と Ca^{2+} の細胞内動員を促進する Ca^{2+} 経路が存在し、細胞骨格や細胞運動を制御する。 β -カテニン非依存性経路を活性化する代表的リガンドである Wnt5a は胎生期において肢芽や顔面、腸管など伸長する組織に高発現し (図1)、Wnt5a ノックアウトマウスは体軸、肢芽、腸管等の伸長抑制を伴い胎生致死となることが報告されている。これまでに申請者が所属する研究室では、Wnt5a は胃癌と前立腺癌で高発現し、悪性化および予後不良と関連することを見出した。加えて、申請者は Wnt5a ファミリー分子である Wnt5b が膀胱癌や大腸癌由来の癌細胞においてエクソソームと呼ばれる細胞外小胞と共に分泌され、癌細胞の運動能及び細胞増殖能を促進することを最近、明らかにした。一方、Wnt5a シグナルは炎症反応との関連も示唆されてきた。結核菌感染患者の末梢血由来のマクロファージや関節リウマチ患者における滑膜細胞、アテローム性動脈硬化患者のマクロファージ集積部位のような炎症部位で Wnt5a が発現するという報告や、ヒトのマクロファージや単球を Wnt5a で刺激すると炎症性サイトカインの発現が亢進するといった報告がされている。申請者が所属する研究室でもデキストラン (DSS) 誘導性腸管炎症モデルにおいて、DSS 投与後の腸管炎症病態の進行に伴い Wnt5a の発現が大腸潰瘍部線維芽細胞で上昇することを見出した。また、同様の Wnt5a の発現は、ヒトの潰瘍性大腸炎 (UC) や Crohn 's 病患者由来の潰瘍部間質領域においても観察された。以上のように Wnt5a は胎生期から成体期まで様々な生命現象に関与することが明らかとなってきたが、細胞外に分泌された Wnt5a タンパク質の検出が困難であったため、生体内で分泌された後どの程度の範囲まで移動しているかという動態はほとんど明らかになっていない。また Wnt5a シグナルについてはマーカーとなるような標的遺伝子が知られていないため、シグナルを受容している細胞を特定することも難しかった。Wnt5a の生体内における機能の全貌を明らかにするためにはそのタンパク質の動態を知ることが必須であると考えられる。

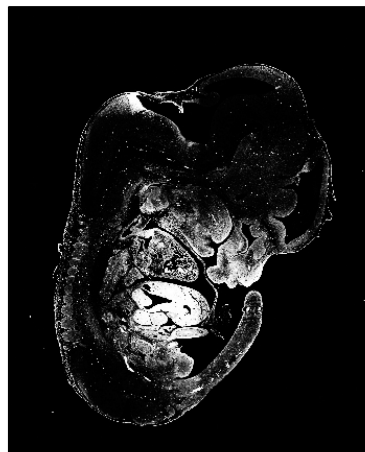


図1 マウス12.5日胚におけるWnt5aの発現

2. 研究の目的

本研究では蛍光標識した Wnt5a を発現するノックインマウスを CRISPR/Cas システムを用いて作製し、Wnt5a タンパク質の生体内動態及び動態制御機構明らかにすることを目的に下記の研究を遂行する。

- ・ Venus-Wnt5a ノックインマウスの作製
- ・ 胎生期における Wnt5a タンパク質の生体内動態及び動態制御機構
- ・ 炎症病態下の組織における Wnt5a タンパク質の生体内動態及び動態制御機構

3. 研究の方法

- ・ Venus-Wnt5a ノックインマウスの作製

マウス Wnt5a 遺伝子の 57 番目のメチオニン残基と 58 番目のセリン残基をコードする exon3 に Venus 遺伝子をノックインしたマウス (Venus-Wnt5a KI) を CRISPR/Cas システムを用いて作製する。具体的な方法としては、Wnt5a の exon3 に対するガイド RNA (gRNA)、gRNA の標的配列の前後の部分のアームとしたターゲティングベクターを構築し、Cas9、sgRNA を発現するベクターと共にマウス受精卵にインジェクションする。得られたファウンダーマウスを野生型マウスと交配して得られるヘテロ接合体の F1 マウスで、内在性の Wnt5a が発現していることが報告されている組織 (肺、心臓、胃、腎臓) において、Venus-Wnt5a が発現していることをウェスタンブロットにより確認する。

- ・ 胎生期における Wnt5a タンパク質の生体内動態及び動態制御機構

胎児の肢芽や顔面、腸管など Wnt5a が高発現することが報告されている組織において Venus-Wnt5a の発現を蛍光実体顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、Wnt5a タンパク質の濃度勾配が存在するの否かについて検証する。次に胎生 11.5 日の Venus-Wnt5a KI の胎児から単離した線維芽細胞を in vitro で培養し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて線維芽

細胞が分泌する Venus-Wnt5a のライブイメージングを行う

・炎症病態下の組織における Wnt5a タンパク質の生体内動態及び動態制御機構

成体では DSS 投与後の腸管の大腸潰瘍部線維芽細胞で Wnt5a の発現が大きく上昇する。Venus-Wnt5a KI に DSS を投与して、Venus-Wnt5a の発現がこれらの内在性の Wnt5a の発現と同様に大腸潰瘍部線維芽細胞で上昇するか否かをまず確認する。発現の誘導を確認した後、Venus-Wnt5a KI に DSS を投与して腸管炎症を引き起こす。腸管炎症を起こしたマウスの腸管を麻酔下で取り出し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察する。

4. 研究成果

・Venus-Wnt5a ノックインマウスの作製

Wnt5a の exon3 に対するガイド RNA (gRNA)、gRNA の標的配列の前後の部分をアームとしたターゲティングベクターを構築し、Cas9、sgRNA を発現するベクターと共にマウス受精卵にインジェクションした。22 匹得られた産仔の中に PCR によりノックインされた個体があることが確認された(図2)。得られたファウンダーマウスを野生型マウスと交配して得られたヘテロ接合体の F1 マウスで、内在性の Wnt5a が発現していることが報告されている組織(肺、心臓、胃、腎臓)において、Venus-Wnt5a が発現していることをウェスタンブロットにより確認した(図3)。また胎生 14.5 日齢の胎児において内在性の Wnt5a が高発現している四肢や顔面の先端において Venus-Wnt5a が発現していることを免疫染色により確認した。次にヘテロ接合体の F1 マウス同士を交配させてホモ接合体の F2 マウス (Venus-Wnt5a KI/KI) を得ようとしたが、生後 3 週間まで生存した産仔 50 匹の中にホモ接合体はいなかった。Wnt5a ノックアウトマウスは胎生致死となることから、Venus-Wnt5a が生体内において Wnt5a として機能していない可能性が示唆された。そこで、胎生 14.5 日齢の胎児を取り出して解析したところ、Venus-Wnt5a KI/KI は四肢の形成不全など Wnt5a ノックアウトマウスと同様の表現型を示すことが明らかとなった。

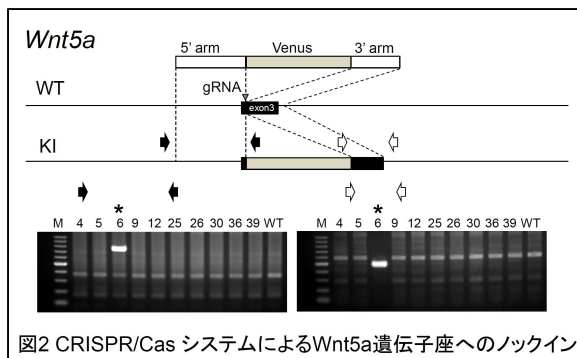


図2 CRISPR/Cas システムによるWnt5a遺伝子座へのノックイン

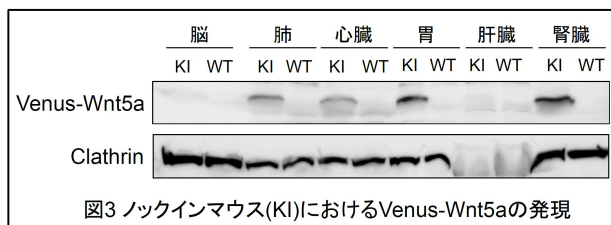


図3 ノックインマウス(KI)におけるVenus-Wnt5aの発現

・胎生期における Wnt5a タンパク質の生体内動態及び動態制御機構

胎生 14.5 日齢の胎児において内在性の Wnt5a が高発現している四肢や顔面の先端において Venus-Wnt5a が発現していることを免疫染色により確認した。次に、胎生 13.5 日の Venus-Wnt5a KI の胎児から線維芽細胞を単離し、培養を行った。私共はマウスの胎児線維芽細胞は Wnt5a を分泌し、オートクラインに働いて Dvl のリン酸化を引き起こすことをこれまでに見出していたので、Venus-Wnt5a KI 由来の胎児線維芽細胞における Wnt5a の発現量と分泌量、Dvl のリン酸化レベルをウェスタンブロットにより野生型マウスと比較した。胎児線維芽細胞において Wnt5a の発現量および分泌量は KI/KI の方が野生型よりも多かったが、Dvl のリン酸化レベルは野生型と Venus-Wnt5a KI で有意な差はなかった。また胎児線維芽細胞を Wnt の分泌を阻害する IWP2 の処理することにより、Wnt5a 依存的な Dvl のリン酸化は野生型と Venus-Wnt5a KI 共に抑制された。次に Venus-Wnt5a KI 由来の胎児線維芽細胞を用いて、in vitro でのライブイメージングを試みた。抗 Venus 抗体を用いた免疫染色により、細胞内の分泌される前の Venus-Wnt5a は観察出来たが、細胞外に分泌された Venus-Wnt5a の観察は出来なかった(図4)。

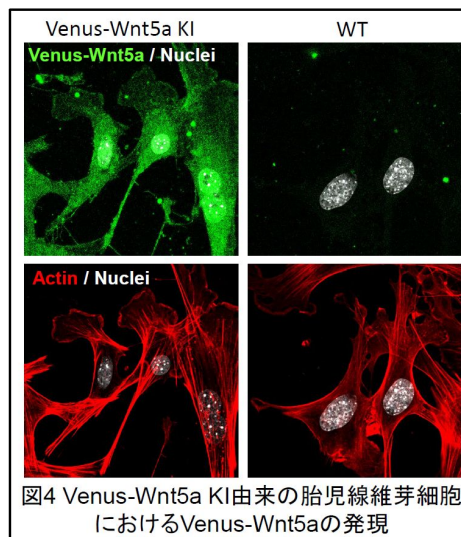


図4 Venus-Wnt5a KI由来の胎児線維芽細胞におけるVenus-Wnt5aの発現

・炎症病態下の組織における Wnt5a タンパク質の生体内動態及び動態制御機構

Venus-Wnt5a ノックインマウスに DSS を投与して、Venus-Wnt5a の発現が内在性の Wnt5a の発現と同様に大腸潰瘍部線維芽細胞で上昇することを Venus にする免疫染色により確認し

た。次に、Venus-Wnt5a KI に DSS を投与し腸管炎症を引き起こしたマウスの腸管を麻酔下で取り出し、セルソーターを用いて Venus の蛍光により Venus-Wnt5a 高発現線維芽細胞の単離を試みたが Venus-Wnt5a の蛍光が弱すぎたため、単離が困難であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 1件）

1. 著者名 Harada Takeshi, Sada Ryota, Osugi Yoshito, Matsumoto Shinji, Matsuda Tomoki, Hayashi-Nishino Mitsuko, Nagai Takeharu, Harada Akihiro, Kikuchi Akira	4. 巻 133
2. 論文標題 Palmitoylated CKAP4 regulates mitochondrial functions through an interaction with VDAC2 at ER-mitochondria contact sites	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs249045
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.249045	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 Kimura Kenji, Matsumoto Shinji, Harada Takeshi, Morii Eiichi, Nagatomo Izumi, Shintani Yasushi, Kikuchi Akira	4. 巻 111
2. 論文標題 ARL4C is associated with initiation and progression of lung adenocarcinoma and represents a therapeutic target	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 951～961
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14303	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 Harada Takeshi, Matsumoto Shinji, Hirota Suguru, Kimura Hirokazu, Fujii Shinsuke, Kasahara Yuuya, Gon Hidetoshi, Yoshida Toshihiko, Itoh Tomoo, Haraguchi Naotsugu, Mizushima Tsunekazu, Noda Takehiro, Eguchi Hidetoshi, Nojima Satoshi, Morii Eiichi, Fukumoto Takumi, Obika Satoshi, Kikuchi Akira	4. 巻 18
2. 論文標題 Chemically Modified Antisense Oligonucleotide Against ARL4C Inhibits Primary and Metastatic Liver Tumor Growth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 602～612
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1535-7163.MCT-18-0824	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 Kimura Hirokazu, Yamamoto Hideki, Harada Takeshi, Fumoto Katsumi, Osugi Yoshihito, Sada Ryota, Maehara Natsumi, Hikita Hayato, Mori Soichiro, Eguchi Hidetoshi, Ikawa Masahito, Takehara Tetsuo, Kikuchi Akira	4. 巻 25
2. 論文標題 CKAP4, a DKK1 Receptor, Is a Biomarker in Exosomes Derived from Pancreatic Cancer and a Molecular Target for Therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1936～1947
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-18-2124	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 Kumita Wakako, Sato Kenya, Suzuki Yasuhiro, Kurotaki Yoko, Harada Takeshi, Zhou Yang, Kishi Noriyuki, Sato Kengo, Aiba Atsu, Sakakibara Yasubumi, Feng Guoping, Okano Hideyuki, Sasaki Erika	4. 巻 9
2. 論文標題 Efficient generation of Knock-in/Knock-out marmoset embryo via CRISPR/Cas9 gene editing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-49110-3	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 原田武志、佐田僚太、大杉祥仁、松本真司、菊池章
2. 発表標題 バルミトイル化CKAP4はVDAC2を介してミトコンドリア機能を制御する
3. 学会等名 第93回 日本生化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田武志、松本真司、大杉祥仁、菊池章
2. 発表標題 CKAP4-VDAC2相互作用によるミトコンドリア機能の制御
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 原田武志、大杉祥仁、松本真司、菊池章
2. 発表標題 小胞体 ミトコンドリア連携ゾーンにおけるII型膜タンパク質CKAP4の機能解析
3. 学会等名 第91回日本生化学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田武志
2. 発表標題 Wnt5b含有エソソームは癌細胞の増殖及び運動能を亢進させる
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017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
---------	---------