

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2023

課題番号：17K15593

研究課題名（和文）Wnt/PCP経路による微小管の平面内極性化機構の解析

研究課題名（英文）Planar polarity of microtubules

研究代表者

高岸 麻紀（Takagishi, Maki）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（薬学）・助教

研究者番号：10723918

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脳の中央部分にある脳室内では、常に脳脊髄液が産生され、一つの出口から流出している。脳室表面は運動性の多繊毛に覆われており、オールを漕ぐように、脳室の出口方向へ向かって波打ち運動している。脳室表面の運動性多繊毛の協調的な波打ち運動が、脳脊髄液の流れを促している。脳室表面の運動性多繊毛が脳室出口方向へ波打つためには、繊毛の根元の突起が出口方向へ向く必要があり、繊毛細胞の表層部では平面軸に沿った細胞骨格微小管の非対称な配向（平面内極性化）が繊毛の根本の方向性を決めていた。本研究では、細胞骨格である微小管が平面軸に沿った非対称な配向をする分子機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、脳室内の繊毛の向きが揃うメカニズムを解明しました。脳室内の繊毛の向きが揃うことで、脳脊髄液が脳室出口に向かって流れることができます。繊毛の向きを決定する因子に異常があると、繊毛が同じ方向へ波打つことができず、脳脊髄液の流れが乱れてしまいます。出口方向へ流出できなかった脳脊髄液は脳室内に停滞し、脳室が拡張して水頭症となります。水頭症は脳実質を圧迫して発達障害や認知症をもたらします。本研究で発見した細胞内分子機構によって、水頭症の発症機序や原因遺伝子の解明につながると期待されます。

研究成果の概要（英文）：Cilia are docked on apical cell surfaces, and their orientation is determined by planar polarity at the apical cell cortex. Coordinated beatings of multiple motile cilia with coordinated orientation generate directional fluid flow on the tissue surface. Microtubules, a principal component of the cytoskeleton, asymmetrically localize to the apical cell membrane of multi-ciliated ependymal cells lining the lateral ventricular wall on the side that contacts cerebrospinal fluid flow. Individual ependymal cells have planar polarized microtubules that connect ciliary base to coordinate cilia orientation. We found that cytoplasmic dynein is anchored to the one side of cell cortex that regulates microtubule dynamics. This is required for coordinated cilia orientation on the LV wall.

研究分野：細胞生物学

キーワード：微小管 平面内細胞極性 繊毛

1. 研究開始当初の背景

(1) Wnt/Planar Cell Polarity (PCP) 経路と繊毛細胞の平面内極性

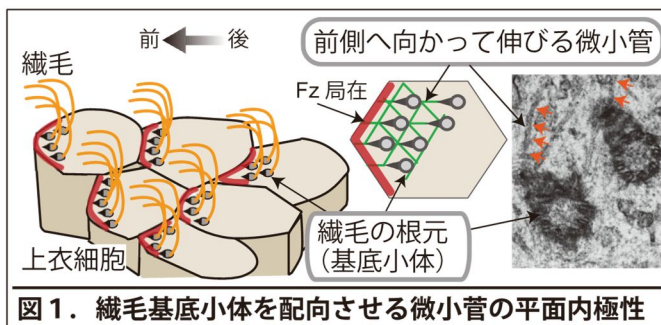
Wnt/PCP 経路は、Wnt の受容体 Fzd が平面内で非対称的に膜局在することで、細胞骨格の非対称な配向 (平面内極性化) をもたらし、組織全体として方向性や軸を形成する。Wnt/PCP 経路は脳室壁上衣細胞繊毛や内耳有毛細胞不動毛などの繊毛の向きを決定し、その変異や異常によって水頭症や難聴をもたらす。しかし、Wnt/PCP 経路が繊毛を配向させる分子機構は未解明であった。

(2) Wnt/PCP 経路制御分子 Daple

申請者らは以前に、Wnt 刺激によって細胞室内足場蛋白 Dvl が Daple (Dvl-associating protein with a high frequency of leucine residues) と結合し、aPKC による Rac の活性化を誘導し、細胞骨格を制御することを報告した (Ishida-Takagishi et al, *Nat Commun.* 2012)。Daple 遺伝子欠損 (ノックアウト) マウスは脳室壁上衣細胞や気管支上皮細胞、内耳有毛細胞の繊毛方向が乱れていたことから、Wnt/PCP 経路による細胞骨格の配向や繊毛方向を決める分子機構を解明する手がかりとなると考えた。

(2) 繊毛細胞の平面内における微小管の配向

繊毛細胞表層部の平面内では、繊毛の根元である基底小体から脳室前側 (Fz が局在する側) に向けて、微小管が伸びていることがわかってきた (図 1)。Fzd 側に微小管の成長端 (プラス端) が集まっていた。しかし、微小管がどのような分子機構によって



平面内で極性化するのか、微小管がどのように繊毛を配向させるのかは未解明だった。

2. 研究の目的

PCP 関連分子や微小管制御分子の欠損による繊毛方向の異常がそれぞれ報告されているが、基底小体を配向する微小管の極性化機構や、Wnt/PCP 関連分子と微小管の関連は未だ不明である。本研究では、Wnt シグナル PCP 経路の制御分子 Daple の微小管への制御機能を解析し、Wnt/PCP 経路による微小管の平面内極性化機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Wnt/PCP 経路の異常を示す Daple ノックアウトマウスの上衣細胞における微小管の配向を解析する。Daple ノックアウトマウスの脳室壁上衣細胞の表層部で平面方向へ配向する微小管の異常を、脳室組織免疫染色の共焦点顕微鏡による 3D イメージングや、初代培養上衣細胞のライブイメージングにて解析する。

(2) Daple が相互作用する微小管関連分子による微小管の平面内細胞極性化への影響を解析する。以前にスクリーニングした Daple 結合分子の中から、微小管制御分子として報告されている分子をピックアップし、上衣細胞での局在や遺伝子抑制した場合の微小管の配向を解析する。

4. 研究成果

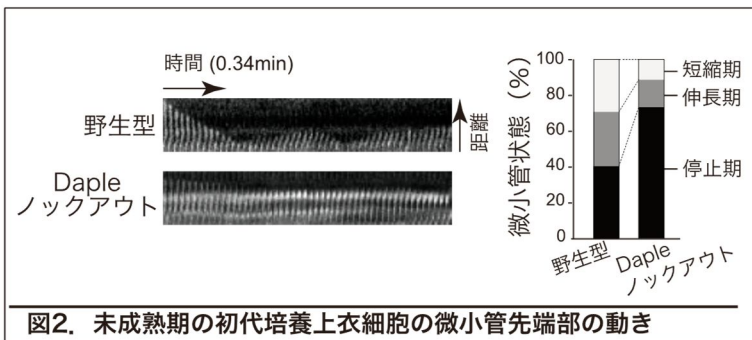
(1) Daple 遺伝子欠損マウスは微小管の平面内極性化を制御することを発見

Daple ノックアウトマウスの脳室組織を微小管と Wnt/PCP 経路受容体 Fzd6 の抗体で組織染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて上衣細胞表層部を連続撮影したところ、脳室組織の前側に Fzd が局在しているにもかかわらず、基底正体から伸びた微小管プラス端が Fzd 局在部位に接続せず、さ

らに繊毛の向きも乱れていた。このことから、Daple が Fzd と微小管のプラス端を接続する役割があると考えられた（文献 1、2）。

（2）Daple が微小管ダイナミクスに必要なことを証明

Daple ノックアウトマウスから初代培養した未成熟期の上皮細胞に微小管のマーカである EMTB-EGFP を低発現させて、微小管ダイナミクスをライブイメージングにて解析した。野生型上皮細胞では、時間経過とともに微小管の先端部が伸長と短縮を繰り返しているのに対し、Daple ノックアウトした上皮細胞では、



クアウトした上皮細胞では、微小管の伸長も短縮も少なく停止し、ダイナミクスが低下していることがわかった（図 2；文献 2）。上皮細胞に微小管阻害剤を処理すると、微小管ダイナミクスが阻害されて繊毛の向きが乱れる

ことから、Daple は微小管ダイナミクスを介して繊毛の向きを揃えていると考えられる。

（3）細胞質ダイニンが微小管の平面内極性化や繊毛の配向に重要だということを報告

上皮細胞で Daple が結合する微小管関連因子を探した結果、細胞質ダイニンが Daple によって Fzd 側の細胞膜下に局在することがわかった。野生型マウスでは、ダイニンは Fzd 側に局在したが、Daple のノックアウトマウスでは、ダイニンは Fzd 側に局在できなかった（文献 2）。また、脳室壁組織を培養してダイニン阻害剤を添加すると、微小管の Fzd 側への伸長が減り、基底小体の向きも乱れてしまった。このことから、Fzd 側に架橋されたダイニンは微小管の成長端をキャプチャして基底小体の向きを揃えていることがわかった。

分裂細胞においては、細胞膜下に架橋された細胞質ダイニンは、キネトコア微小管プラス端をキャプチャし、微小管ダイナミクスが生じた際にキネトコア微小管を引っ張ることが知られている。これらのことから、Daple はダイニンを Fzd 側に架橋する役割があり、Fzd 側に留めら

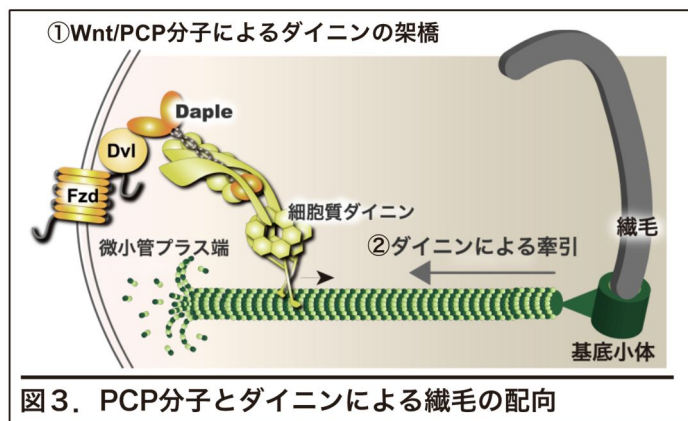


図 3. PCP分子とダイニンによる繊毛の配向

れたダイニンが基底小体からのびた微小管のプラス端をキャプチャし、Daple が微小管ダイナミクスを誘導することで、微小管が引っ張られ、基底小体が Fzd 側に引き寄せられることで、Fzd 側に配向するようになると考えた（図 3；文献 2）。これらの研究結果は国際科学誌に掲載され、Wnt/PCP 経路の変異によって繊毛病が生じる分子機構を示すことができた。

<引用文献>

（1）Takagishi M, et al. (2017) “Daple Coordinates Planar Polarized Microtubule Dynamics in Ependymal Cells and Contributes to Hydrocephalus” *Cell Rep.* vol. 20, 4, p960-972.

（2）Takagishi M, et al. (2020). “Cytoplasmic Dynein Functions in Planar Polarization of Basal Bodies within Ciliated Cells” *iScience.* Vol.23,6. 101213.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Ozono Yoshiyuki, Tamura Atsushi, Nakayama Shogo, Herawati Elisa, Hanada Yukiko, Ohata Kazuya, Takagishi Maki, Takahashi Masahide, Imai Takao, Ohta Yumi, Oshima Kazuo, Sato Takashi, Inohara Hidenori, Tsukita Sachiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Daple deficiency causes hearing loss in adult mice by inducing defects in cochlear stereocilia and apical microtubules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96232-8	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 Nakayama Shogo, Yano Tomoki, Namba Toshinori, Konishi Satoshi, Takagishi Maki, Herawati Elisa, Nishida Tomoki, Imoto Yasuo, Ishihara Shuji, Takahashi Masahide, Furuta Ken'ya, Oiwa Kazuhiro, Tamura Atsushi, Tsukita Sachiko	4. 巻 220
2. 論文標題 Planar cell polarity induces local microtubule bundling for coordinated ciliary beating	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202010034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202010034	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 Takagishi Maki, Esaki Nobutoshi, Takahashi Kunihiro, Takahashi Masahide	4. 巻 23
2. 論文標題 Cytoplasmic Dynein Functions in Planar Polarization of Basal Bodies within Ciliated Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101213 ~ 101213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101213	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 Esaki Nobutoshi, Enomoto Atsushi, Takagishi Maki, Mizutani Yasuyuki, Iida Tadashi, Ushida Kaori, Shiraki Yukihiro, Mii Shinji, Takahashi Masahide	4. 巻 532
2. 論文標題 The Daple-CK1 complex regulates Dvl2 phosphorylation and canonical Wnt signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 406 ~ 413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.08.066	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 Hori Kiminori, Ajioka Kasumi, Goda Natsuko, Shindo Asako, Takagishi Maki, Tenno Takeshi, Hiroaki Hidekazu	4. 巻 9
2. 論文標題 Discovery of Potent Disheveled/Dvl Inhibitors Using Virtual Screening Optimized With NMR-Based Docking Performance Index	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 983
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2018.00983	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 Shindo Asako, Audrey Anastasia, Takagishi Maki, Takahashi Masahide, Wallingford John B., Kinoshita Makoto	4. 巻 131
2. 論文標題 Septin-dependent remodeling of cortical microtubule drives cell reshaping during epithelial wound healing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.212647	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 Maki Takagishi, Masato Sawada, Shinya Ohata, Naoya Asai, Atsushi Enomoto, Kunihiko Takahashi, Liang Weng, Kaori Ushida, Hosne Ara, Shigeyuki Matsui, Kozo Kaibuchi, Kazunobu Sawamoto, and Masahide Takahashi.	4. 巻 20
2. 論文標題 Daple Coordinates Planar Polarized Microtubule Dynamics in Ependymal Cells and Contributes to Hydrocephalus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 960-972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.06.089.	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 Liang Weng, Yi-Peng Han, Atsushi Enomoto, Yasuyuki Kitaura, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai, Naoya Asai, Jian An, Maki Takagishi, Masato Asai, Shinji Mii, Takashi Masuko, Yoshiharu Shimomura, Masahide Takahashi.	4. 巻 16
2. 論文標題 Negative regulation of amino acid signaling by MAPK-regulated 4F2hc/Girdin complex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS Biology	6. 最初と最後の頁 e2005090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.2005090.	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Maki Takagishi
2. 発表標題 Kif6 regulates cilia motility and polarity in ependymal cells
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Maki Takagishi
2. 発表標題 Planar polarity of ependymal cilia in the mouse brain
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia Conferences Cilia & Centrosome (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maki Takagishi
2. 発表標題 Dvl binding protein Daple regulates planar cell polarity in the multiple-ciliated cells
3. 学会等名 European Wnt Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Maki Takagishi
2. 発表標題 Planar polarized microtubule dynamics and coordinated ciliary beatings in the lateral ventricular wall
3. 学会等名 EMBO EMBL Symposia Tissue Self-Organisation: Challenging the Systems (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Maki Takagishi
2. 発表標題 Planar polarized microtubule dynamics in ependymal cells contributes to hydrocephalus
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高岸麻紀
2. 発表標題 Planar cell polarity regulates the orientation of multiple motile cilia in the ependymal cell
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Maki Takagishi
2. 発表標題 Planar polarized microtubule dynamics and coordinated ciliary beating in the lateral ventricular wall
3. 学会等名 EMBO/EMBL symposium: Tissue Self-Organisation: Challenging the systems (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高岸麻紀、高橋雅英	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 75
3. 書名 医学のあゆみ特集細胞の極性化がもたらす生命現象 多繊毛細胞における平面内細胞極性	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Wntシグナル伝達系阻害剤、該阻害剤を有効成分として含む医薬組成物	発明者 廣明秀一、天野剛志、進藤麻子、高岸麻紀、堀公法	権利者 名古屋大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-235036	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究協力者	高橋 雅英 (Takahashi Masahide)		
研究協力者	高橋 邦彦 (Takahashi Kunihiko)		

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