

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 8 月 26 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14720

研究課題名(和文) Wntと平面細胞極性因子の相互作用による細胞極性の形成

研究課題名(英文) Establishment of cell polarity by interactions between Wnt and PCP factors.

研究代表者

三井 優輔(Mii, Yusuke)

基礎生物学研究所・分子発生学研究部門・助教

研究者番号：70634129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：平面細胞極性(PCP)は動物に広く保存され、多くの組織で見られる「細胞の方向性」の情報である。分泌性シグナル蛋白質Wntは平面細胞極性を方向づけることが示されている。これまで、Wntの濃度勾配が存在し、個々の細胞がそこから極性の情報を読み取る可能性が考えられているものの、そもそも濃度勾配が存在するのか否か、という根幹において情報が欠如している。本研究では平面細胞極性に関与が知られるWnt蛋白質の分布を可視化し、必ずしも濃度勾配的に分布しているわけではないことを明らかにした。さらにその分布に「コアPCP因子」と呼ばれる平面細胞極性の必須因子群が関わることを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、分泌性のシグナル蛋白質であるWntは濃度勾配によって位置情報を与える物質「モルフォゲン」の一種と捉えられており、この文脈にそって、組織平面内の細胞の方向性である「平面細胞極性」もWntの濃度勾配によって向きが揃えられていると考えられてきた。しかし、本研究からWnt蛋白質の分布が必ずしも濃度勾配的ではないことが判明し、さらに平面細胞極性の必須因子であるコアPCP因子はWntの分布に関与することが示された。これは従来のモルフォゲンの範疇にとどまらないWntの作用機序に対する理解を大きく前進させるものである。

研究成果の概要(英文)：Planar cell polarity is the directionality of cells within a tissue plain, which is widely conserved among animals. A family of secreted signaling proteins, Wnt has been considered as a directional cue for PCP, supposedly by forming a concentration gradient as a morphogen. However, this model is not directly examined because visualization of Wnt ligands are still lacking. In this study, we found that a subtype of Wnt proteins involved in PCP did not show graded distributions, based on visualization of Wnt proteins. Furthermore, we found that core PCP components, which are essential for PCP formation, are involved in the distribution of the Wnt protein.

研究分野：発生生物学

キーワード：Xenopus アフリカツメガエル Wnt モルフォゲン 平面細胞極性 PCP

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の発生では、秩序だった細胞の移動や変形が見られるが、それらを制御する方向性の情報、あるいは細胞の極性を理解することは発生生物学において中心的命題の一つである。特に平面細胞極性 (planar cell polarity, PCP) はショウジョウバエからヒトに到るまで広く保存された機構であり、その分子メカニズムが活発に研究されてきた。平面細胞極性においては保存された、Prickle (Pk), Van Gogh-like (Vangl), Frizzled (Fz), Dishevelled (Dvl)等のいわゆるコア PCP 因子

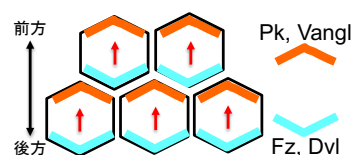


図1. 平面細胞極性(矢印)とコアPCP因子

が一細胞内でも偏った局在を示し、極性情報を検知、あるいは保持するうえで重要な役割を担うと考えられている (図 1)。しかしながら、何を手がかりにしてどのように細胞や組織に極性の情報が与えられるのか、すなわち directional cue についての理解は未だ不十分である。それを説明する様々なモデルが提案されているが、近年の研究により分泌性シグナル蛋白質の Wnt の濃度勾配がショウジョウバエ及びアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 胚において共通の directional cue である可能性が提示されている (Wu et al., *Nat. Cell Biol.* 15:1045, 2013; Chu & Sokol, *eLife* 5:e16463, 2016)。これらの研究においては Wnt の発現と PCP の間の因果関係は明確であるが、Wnt 蛋白質の可視化が不足していることもあり、そもそも Wnt 蛋白質がグローバルな濃度勾配を作っているか否か、自体が不明である。また細胞内のシグナル伝達系はよく研究されているにも関わらず、Wnt 蛋白質がどのように PCP を方向づけているのか?はほとんど全く分かっていない。

2. 研究の目的

上記の問題を解決すべく、研究代表者が内在性の Wnt11 を *Xenopus* 胚で免疫染色して可視化したところ、Wnt11 蛋白質は、収斂伸張運動が見られる神経板において、胚の左右方向の細胞辺上に多く、前後軸方向の細胞辺には少ないという、極性パターンをもって分布していた。更にこの神経板領域で GFP-Pk3 を用いて平面細胞極性を可視化したところ、同じ領域の広い範囲で平面細胞極性が揃っていた。さらに Chu & Sokol によって示された、GFP-Pk3 を用いて *Xenopus* 胚で PCP を可視化する系を応用して、過剰発現させた Wnt11 と PCP 因子の局在の関係を解析したところ、コア PCP 因子の発現が Wnt11 の分布に影響を与えることが示唆された。

このような独自の知見に基づいて、研究代表者は、組織全体に広がるグローバルな Wnt11 の濃度勾配により、トップダウン的に細胞の極性化が起こるという従来受け入れられてきたモデル (図 2 左、例えば Yang & Mlodzik, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 31:623, 2015) に疑問を持つに至った。本研究は従来のモデルとは反対に、分布が狭い分泌性蛋白質である Wnt11 がローカルに働いて分泌源近傍の極性化を引き起こし、PCP 因子間の相互作用 (Chen et al., *Cell* 133:1093, 2008) と新たに示唆された PCP 因子から Wnt11 の局在への作用により、作動距離の短い Wnt11 が組織の広い範囲の極性を揃える、という新たな仮説に基づき、その検証を行うことを目的とした。特に Wnt11 蛋白質を可視化し、その局在と平面細胞極性の関係性を明らかにすることで、Wnt がどのようにして PCP を制御するか、またコア PCP 因子がどのように Wnt の局在性を制御するかを分子・細胞レベルで理解することを目指した。

3. 研究の方法

(1) *Xenopus* 胚で内在性あるいは過剰発現した Wnt11 やコア PCP 因子 (Pk, Vangl, Fz, Dvl など) を可視化し、それぞれの局在の間の関係性を解析することを基本に、コア PCP 因子の過剰発現あるいは発現阻害が Wnt11 の局在性に影響を与えるか否かを検討した。

(2) コア PCP 因子が複合体を形成する際、同じ因子の組み合わせでもトポロジーの違い、すなわち同一細胞上 (シス) の複合体と隣接細胞間 (トランス) の複合体では Wnt11 に対する反応が違うのではないかと仮説を立て、*Xenopus* 胚での割球打ち分け実験で人為的にトポロジーを揃えて、Wnt11 に対する応答を検討した。

(3) コア PCP 因子複合体のトポロジーを超解像イメージングなどにより直接解析することができれば、Wnt がコア PCP 因子に及ぼす影響を理解できるのではないかと考え、stimulated emission depletion (STED) 法や新たに導入した spinning disc 式共焦点顕微鏡を用いて super resolution radial fluctuation (SRRF) 法により、コア PCP 因子などの局在性を検討した。

(4) 主に (2) で得られた知見を元に基礎生物学研究所の小山博士らと数理モデルを作成し、その挙動を検討した。

4. 研究成果

(1) Wnt11 とコア PCP 因子の局在性を同時に解析することは本研究の課題を遂行する上で極めて重要である。これまで、コア PCP 因子の可視化には主に GFP-Pk3 を用いてきた。一方、Wnt11-EGFP は GFP-Pk3 を極性化させる活性を持つものの、同一の蛍光タンパク質を用いているため、

同時にそれらの局在を解析することは不可能だった。この点を解決すべく、他の蛍光タンパク質を用いて Wnt11 を可視化することを検討した。この結果、青色蛍光タンパク質の一種を用いることで、GFP-Pk3 を極性化させる十分な活性をもつコンストラクトの作成に成功した。

また内在性のコア PCP 因子の一つを神経板領域で発現阻害したところ、内在性の Wnt11 の分布に影響を及ぼしたことからコア PCP 因子が、Wnt11 の細胞外分布の際の足場形成に必要であることが示唆された。

(2) コア PCP 因子複合体のトポロジーを割球打ち分けによって検討したところ、特定の因子の組み合わせにより、Wnt11 の足場が形成されるのに十分であることが示された。また同一因子間の複合体でもトポロジーの違いにより、Wnt11 に対するコア PCP 因子の応答が異なることが示唆された。

(3) 超解像イメージングの予備的データとして、細胞膜トレーサーの membrane-GFP および membrane-RFP の mRNA を *Xenopus* 胚の同一割球、あるいは別割球に顕微注入して、原腸胚、あるいは神経胚まで培養し、ホルマリン固定後 SRRF 法で観察を行った。その結果、同一細胞で発現させた membrane-GFP と membrane-RFP は大部分重なり、画像上でほとんど分離しなかったが隣接細胞で発現させたそれらの膜トレーサーは画像上で分離が認められた。このときの各トレーサーの画像上の重心位置を定量したところ、同一細胞での発現時、隣接細胞での発現時の間で統計的に有意な差が見られた。ここから SRRF 法がコア PCP 因子のトポロジー解析に有効であることが示唆された。さらに予備的データながらコア PCP 因子間で割球打ち分け実験などから隣接細胞間に亘って形成される（トランス複合体）と推測される二つの因子を SRRF 法で解析したところ、局在の分離が見られ、トランス複合体の存在が支持された。

(4) コア PCP 因子のトポロジーを考慮した数理モデルを構築した。現在のところ、一次元に単純化したモデルを作成しているが、今後二次元平面でのモデル化を進める予定である。

以上より、Wnt11 によるコア PCP 因子の制御、およびコア PCP 因子による Wnt11 の局在性の制御の一端が明らかになり、本研究課題の目標は概ね達成されたと考えている。

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 4件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Mii Yusuke, Nakazato Kenichi, Pack Chan-Gi, Ikeda Takafumi, Sako Yasushi, Mochizuki Atsushi, Taira Masanori, Takada Shinji	4. 巻 10
2. 論文標題 Quantitative analyses reveal extracellular dynamics of Wnt ligands in <i>Xenopus</i> embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e55108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/elife.55108	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 該当する
1. 著者名 Feng Di, Wang Jin, Yang Wei, Li Jingyu, Lin Xiaochen, Zha Fangzi, Wang Xiaolu, Ma Luyao, Choi Nga Ting, Mii Yusuke, Takada Shinji, Huen Michael S. Y., Guo Yusong, Zhang Liang, Gao Bo	4. 巻 7
2. 論文標題 Regulation of Wnt/PCP signaling through p97/VCP-KBTBD7-mediated Vangl ubiquitination and endoplasmic reticulum-associated degradation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 abg2099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abg2099	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 該当する
1. 著者名 Matsuda Shinya, Schaefer Jonas V., Mii Yusuke, Hori Yutaro, Bieli Dimitri, Taira Masanori, Pluckthun Andreas, Affolter Markus	4. 巻 12
2. 論文標題 Asymmetric requirement of Dpp/BMP morphogen dispersal in the <i>Drosophila</i> wing disc	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-26726-6	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 該当する
1. 著者名 Yamamoto Kei, Miura Haruko, Ishida Motohiko, Mii Yusuke, Kinoshita Noriyuki, Takada Shinji, Ueno Naoto, Sawai Satoshi, Kondo Yohei, Aoki Kazuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Optogenetic relaxation of actomyosin contractility uncovers mechanistic roles of cortical tension during cytokinesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-27458-3	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 Mii Yusuke, Takada Shinji	4. 巻 8
2. 論文標題 Heparan Sulfate Proteoglycan Clustering in Wnt Signaling and Dispersal	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.00631	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 Uda Youichi, Miura Haruko, Goto Yuhei, Yamamoto Kei, Mii Yusuke, Kondo Yohei, Takada Shinji, Aoki Kazuhiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Improvement of Phycocyanobilin Synthesis for Genetically Encoded Phytochrome-Based Optogenetics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 2896 ~ 2906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.0c00477	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 Mii Yusuke	4. 巻 32
2. 論文標題 Heparan Sulfate Clusters Regulate Distribution and Signaling of Wnt Morphogens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E205 ~ E211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.2006.7e	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 Takada Ritsuko, Mii Yusuke, Krayukhina Elena, Maruyama Yuusuke, Mio Kazuhiro, Sasaki Yoshikazu, Shinkawa Takao, Pack Chan-Gi, Sako Yasushi, Sato Chikara, Uchiyama Susumu, Takada Shinji	4. 巻 1
2. 論文標題 Assembly of protein complexes restricts diffusion of Wnt3a proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-018-0172-x	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 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Mii Yusuke、Nakazato Kenichi、Pack Chan-Gi、Ikeda Takafumi、Sako Yasushi、Mochizuki Atsushi、Taira Masanori、Takada Shinji
2. 発表標題 Dynamic exchange of abundant scaffold-bound and rare freely diffusing ligands forms Wnt gradient.
3. 学会等名 日本発生生物学会第54回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Minako Suzuki, Shinji takada, Yusuke Mii
2. 発表標題 Feedback regulation among heparan sulfate proteoglycans, Wnt11, and core PCP components are involved in organization of planar cell polarity.
3. 学会等名 日本発生生物学会第54回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三井 優輔
2. 発表標題 Wnt11とコアPCP因子の相互的制御による平面細胞極性（PCP）の形成
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三井優輔、高田律子、松山誠、高田慎治
2. 発表標題 Wntによる平面細胞極性の方向づけの分子メカニズム
3. 学会等名 第53回日本発生生物学会大会（誌上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yusuke Mii
2. 発表標題 Mutual interactions of Wnt11 and core PCP components organize PCP and spatial distribution of Wnt11
3. 学会等名 遺伝研研究会 Wnt研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木美奈子、高田慎治、三井優輔
2. 発表標題 平面細胞極性におけるWnt11の局在化メカニズムの解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三井優輔、高田律子、松山誠、高田慎治
2. 発表標題 Local and mutual regulations between Wnt and planar cell polarity components propagate global coordination of the planar cell polarity.
3. 学会等名 第52回日本発生生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Mii, Takayoshi Yamamoto, Ritsuko Takada, Shuji Mizumoto, Makoto Matsuyama, Shuhei Yamada, and Masanori Taira & Shinji Takada
2. 発表標題 Two types of heparan sulfate clusters differently regulate Wnt distribution and signaling in Xenopus embryos.
3. 学会等名 11th International Conference on Proteoglycans (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三井 優輔
2. 発表標題 Local and mutual regulations between Wnt and planar cell polarity propagate global coordination of cell polarity throughout the tissue.
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Mii
2. 発表標題 How does Wnt11 direct the planar cell polarity?
3. 学会等名 119th International Tissue Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

分子発生学研究部門 https://www.nibb.ac.jp/cib2/researchmap 三井 優輔 https://researchmap.jp/miiy 分子発生学研究部門 http://www.nibb.ac.jp/sections/developmental_biology/takada/ 分子発生学研究部門（高田研究室） http://www.nibb.ac.jp/cib2/

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	小山 宏史 (Koyama Hiroshi) (10530462)	基礎生物学研究所・初期発生研究部門・助教 (63904)	

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			
韓国	University of Ulsan College of Medicine			
スイス	Biozentrum, University of Basel			
中国	The University of Hong Kong			