

機関番号：16301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590172

研究課題名 (和文) 平面内細胞極性形成を制御する細胞膜タンパク質の同定

研究課題名 (英文) Trial to identify membranous protein(s) regulating the planar cell polarity

研究代表者

小林 直人 (KOBAYASHI NAOTO)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50234836

研究成果の概要 (和文)：

平面内細胞極性形成シグナルは、細胞膜上に存在する Frizzled-1 受容体を中心に構成されるが、この受容体と結合するリガンド分子は不明である。本研究では未知のリガンド分子の同定を目的とし、培養細胞を用いて受容体とリガンド分子との結合の評価系を確立した。種々の膜タンパク質をコードする遺伝子を細胞株で発現させるコンストラクトも構築中であり、これらの膜タンパク質と同受容体との結合について検討を進める。

研究成果の概要 (英文)：

Planar cell polarity is known to be established mainly by the signals originated from the Frizzled-1 receptor localized on the plasma membrane, although available information on the ligand molecule for Frizzled-1 is still limited. The present study has aimed to reveal the unknown ligand molecule(s) using *Drosophila* cell culture system coupled with chimeric molecule (Frizzled-1-Frizzled-2 chimeras) technique. We have established culture cell-based assay system of the target molecules, together with the constructs enabling to express various membranous receptor molecules reported in *Drosophila*. We are trying to survey receptor molecules to reveal the Frizzled-1-ligand in question.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：分子発生学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般

キーワード：発生・分化、平面内細胞極性、平面内細胞極性形成シグナル伝達、Frizzled受容体、Frizzledリガンド、ショウジョウバエ S2 細胞株、キメラ受容体分子

## 1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は、頂部から基部に至る細胞軸上に沿った極性を持っているが、これと直行する平面内にもう一つの極性を形成しており、これは平面内細胞極性 (planar cell polarity) と呼ばれている。平面内細胞極性は、腎臓、心臓をはじめとする臓器や神経系の形成に重要な役割を担うことが知られており、平面内細胞極性を形成するためのシグナル伝達経路の解明は生物学的見地からのみでなく、医学的見地からも極めて重要である。

平面内細胞極性形成シグナルは、細胞膜上に存在する Frizzled-1 (Fz-1) 受容体を中心に構成されるが、この Fz-1 受容体と結合し活性を制御するリガンド分子に関しては不明の部分が多い。しかしながらこの未知の分子は、平面内細胞極性を形成する個々の細胞に位置情報を提供するという極めて重要な役割を持つ、細胞膜上のタンパク質あるいは細胞外分泌性タンパク質であると考えられた。この未知のリガンド分子を同定することで得られる生物学的な知見は大きく、研究の成果が期待された。

### 未知のリガンド (青)

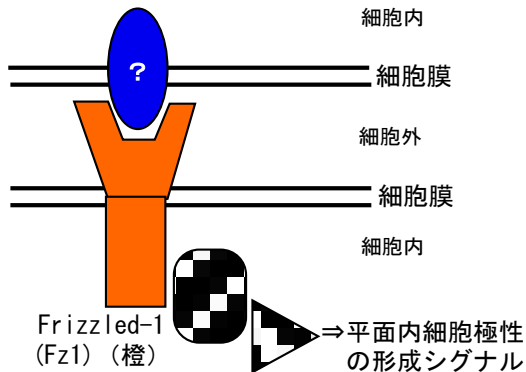


図1 本研究で探索する Frizzled-1 (Fz-1) 受容体未知のリガンド分子の機能

## 2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエの培養細胞系を用いて、Fz-1 受容体の未知のリガンドを同定するための評価系を樹立し、その分子の平面内細胞極性形成における役割を明らかにすることを目的とする。哺乳類ではなくショウジョウバエの系を用いた理由は、研究分担者の濱田が長年ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析に携わってきたこと、さらにショウジョウバエの変異体を用いて分子・細胞レベルから個体レベルの解析までが可能になること、にある。

## 3. 研究の方法

リガンド分子が未知であることもあり、Fz-1 とリガンドとの結合を評価する方法は未だ確立されていない。そこで Frizzled-1 (Fz-1) の関連分子であり、評価系が確立されている Frizzled-2 (Fz-2) 受容体の細胞内ドメインと、Fz-1 の細胞外ドメインからなるキメラ受容体 (Fz-1/Fz-2 キメラ受容体) を用いることにより、Fz-1 とリガンドとの結合を、Fz-2 からの細胞内シグナルを検出することによって評価する系の樹立を試みた。

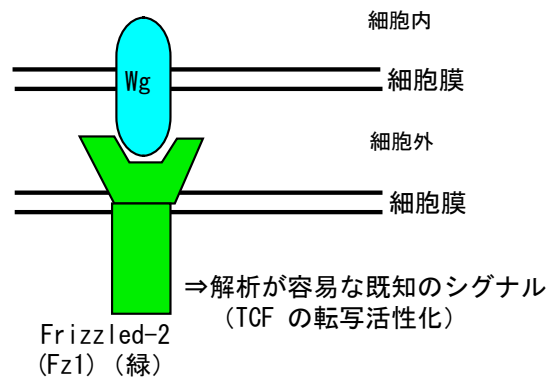


図2 既に評価法の確立されている Frizzled-2 (Fz-2) 受容体による細胞内シグナル伝達

### 未知のリガンド (青)

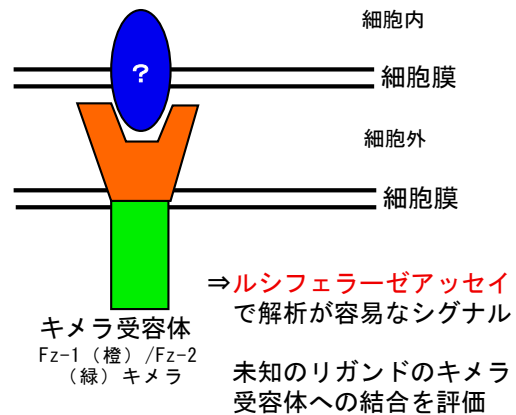


図3 本研究で作成するキメラ受容体分子を使った評価系の概念図

そのために本研究では、Frizzled-2 (Fz-2) 受容体のリガンド分子である Wingless (Wg、ショウジョウバエの Wnt) シグナルを伝達する主要な細胞内コンポーネントがすべて発現しており、かつ Fz-1 および Fz-2 が両者とも無視できる程度しか発現していないことが知られているショウジョウバエ細胞株 S2 を用いることとし、この細胞株に種々の遺伝子コンストラクトを発現させて、培養細胞を用いた評価系を作成することとした。

#### (1)Fz-1/Fz-2 キメラ受容体の構築とその発現細胞株の確立

遺伝子組替えの定法を用いて、Fz-1 受容体の細胞外ドメイン（リガンドに結合するドメイン）と、Fz-2 の細胞内ドメイン（細胞内定法伝達系を活性化するドメイン）からなるキメラ受容体、「Fz-1/Fz-2 キメラ受容体」をコードするコンストラクトを作成した。またコントロールとして、「Fz-1 受容体のみ」および「Fz-2 受容体のみ」、さらに細胞外ドメインが Fz-2 由来で細胞内ドメインが Fz-1 由来のキメラ受容体、「Fz-2/Fz-1 キメラ受容体」（実験群とは逆の組み合わせのキメラ分子）をコードするコンストラクトも作成した。その後、これらの遺伝子を過剰発現する細胞株を確立した。具体的には、これらの受容体タンパク質をコードする遺伝子を発現ベクター（ネオマイシン耐性遺伝子を持つ）に組み込み、これを S2 細胞株に導入した後、ネオマイシン存在下に長期培養することにより、発現細胞株を得た。それぞれのタンパク質の発現は、Western blotting または細胞の免疫染色によって確認した。その結果として発現量の多い細胞株を選択し、以後の実験に用いた。

#### (2)Fz-1/Fz-2 キメラ受容体を過剰発現する細胞株の細胞凝集実験

まず、上述の方法によって樹立した培養細胞株を用いて細胞の凝集実験が可能かどうか、言い換えれば受容体とリガンド分子の結合が正常に行われるかどうかを確認する実験を行った。具体的には、キメラ受容体分子を発現する細胞株と Wg タンパク質を発現する S2 細胞株とを共培養し、細胞塊が形成されるかどうかを観察した。この場合、Fz-2 受容体ないし Fz-2/Fz-1 キメラ受容体を発現する細胞株で細胞膜上に十分な Fz-2 の発現が得られれば、Wg との結合により細胞の凝集が顕微鏡下に確認できる。同時に、Fz-1 受容体または Fz-1/Fz-2 キメラ受容体を発現する細胞では、受容体とリガンド分子がマッチしないため、細胞凝集塊を形成しないことを確認する。これにより、得られた細胞株が機能的に有効なキメラ受容体を発現していることを確認した。

#### (3)ルシフェラーゼ活性の測定によって Fz-1 とリガンドとの結合を評価する系の樹立

上述の通り Frizzled-2 (Fz-2)は分泌型成長因子 Wingless (以下 Wg) の受容体であるが、Wg シグナル伝達経路の活性化、言い換えれば Fz-2 と Wg との結合は、このシグナル伝

達経路の最下流に位置する転写因子 TCF (T cell factor) の活性化によって評価できる。そこで、Fz-1/Fz-2 キメラ受容体を発現するショウジョウバエ S2 細胞に、TCF 結合配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポータープラスミド TOPFLASH または LEF-luciferase reporter を導入した細胞を使用し、ルシフェラーゼ活性を測定することによって、Fz-1 とリガンドとの結合を評価する系を樹立した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Fz-1/Fz-2キメラ受容体を過剰発現する細胞株の細胞凝集実験の結果

Western blotting および免疫染色による評価の結果、ショウジョウバエS2 培養細胞株において、Fz-1/Fz-2 キメラ受容体を過剰発現する細胞株、Fz-2/Fz-1キメラ受容体、Fz-1受容体、Fz-2 受容体を十分量発現する細胞株をそれぞれ樹立できた。また、Wgタンパク質を培養液中に分泌する S2 細胞株 (S2-HS-wg) も別途樹立した。

次に、キメラ受容体分子を発現する細胞株と S2-HS-wg とを共培養し、リガンド結合による細胞塊の形成実験を行った。その結果、Fz-2 受容体ないしFz-2/Fz-1 キメラ受容体が発現する細胞株では、Wg と受容体分子の結合により細胞塊の形成が確認された。一方、Fz-1受容体ないしFz-1/Fz-2 キメラ受容体が発現する細胞は、ほとんど細胞塊を形成しなかった。

この結果、強制発現させたキメラ受容体分子の細胞外ドメインが、リガンドとの結合において期待通りの機能を発揮していることを確認できた。

##### (2)ルシフェラーゼ活性の測定によって Fz-1 とリガンドとの結合を評価する実験の結果

ルシフェラーゼ遺伝子の upstream に Wg シグナル伝達経路の転写因子 TCF の DNA-binding motif を複数持つコンストラクトを発現する S2 細胞株を確立した。Fz-2 受容体が発現する細胞株では Wg との結合によりルシフェラーゼ活性が上昇することが確認された。この結果、強制発現させたキメラ受容体分子の細胞内ドメインが、リガンド結合後の細胞内シグナル伝達において期待通りの機能を発揮していることを確認できた。

これにより、当所計画した Frizzled-1 (Fz-1)の未知のリガンド分子を探索する評価系が樹立できた。

### (3) 今後の研究の発展

ゲノム情報データベースの検索から、ショウジョウバエには約 150 種類の膜型タンパク質をコードする遺伝子が存在することが明らかになっている。これまでに機能が判明している膜型タンパク質を除く約 120 種類について、S2 細胞株で過剰発現するプラスミドの構築を行う。これらの細胞質内ドメインには Flag-tag を付加しておき、抗 Flag 抗体を用いた Western Blotting あるいは細胞の免疫染色によって、それぞれのタンパク質の発現量及び発現部位を確認する。さらにこれらの 120 種類の膜型タンパク質を発現する細胞株と、本研究によって樹立された Fz-1/Fz-2 キメラ受容体発現細胞株とを共培養し、細胞塊形成の観察、および TCF を介する転写活性を測定する。これにより、Fz-1 のリガンド候補を同定する。

現在、ショウジョウバエの約 80 種類の膜タンパク質をコードする遺伝子を S2 細胞株で発現させるためのコンストラクトを構築中であり、並行してこれらの膜タンパク質と Fz-1 受容体との結合について検討を進めている。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Zhang X-J, Li C, Gao H-L, Nabeka H, Shimokawa T, Wakisaka H, Matsuda S, Kobayashi N: Rho kinase inhibitors stimulate the migration of human cultured osteoblastic cells by regulating actomyosin activity. *Cellular and Molecular Biology Letters* (査読あり), 162:279-295, 2011

2. Taniue K, Nishida A, Hamada F, Sugie A, Oda T, Ui-Tei K, Tabata T, Akiyama T: Sunspot, a link between Wingless signaling and endoreplication in *Drosophila*. *Development* (査読あり), 137:1755-1764, 2010

3. Miguchi Y, Takata H, Doihara T, Miyawaki K, Shimokawa T, Hamada F, Kobayashi N, Matsuda S: Morphological maturation level of the esophagus is associated with the number of circumesophageal muscle fibers during archenteron formation in the starfish

*Patiria (Asterina) pectinifera*.

*Biological Bulletin* (査読あり), 219:12-16, 2010

4. Doihara T, Miguchi Y, Miyawaki K, Shimokawa T, Hamada F, Kobayashi N, Matsuda S.: Spatiotemporal distribution patterns of oligosaccharides during early embryogenesis in the starfish *Patiria pectinifera*. *Development Genes Evolution* (査読あり), 219:199-206, 2009

5. Tran H, Hamada F, Schwarz-Romond T, Bienz M: Trabad, a new positive regulator of Wnt-induced transcription with preference for binding and cleaving K63-linked ubiquitin chains. *Genes and Development* (査読あり), 22:528-542, 2008

6. Hattori M, Akioka Y, Chikamoto H, Kobayashi N, Tsuchiya K, Shimizu M, Kagami S, Tsukaguchi H: Increase of integrin-linked kinase activity in cultured podocytes upon stimulation with plasma from patients with recurrent FSGS. *American Journal of Transplantation* (査読あり), 8:1550-1556, 2008

7. Chen J, Saito S, Kobayashi N, Sato K, Terashita T, Shimokawa T, Mominoki K, Miyawaki K, Sano A, Matsuda S: Expression patterns in alternative splicing forms of prosaposin mRNA in the rat facial nerve nucleus after facial nerve transection. *Neuroscience Research* (査読あり), 60:82-94, 2008

[学会発表] (計 3 件)

1. 濱田文彦、鍋加浩明、H. Tran, M. Bienz, 小林直人、松田正司: Wnt シグナル伝達経路を制御する新規 ubiquitin ligase の機能解析、日本解剖学会・第65回九州支部学術集会、H21年11月7日、那覇

2. 鍋加浩明、濱田文彦、宮脇恭史、下川哲哉、小林直人、松田正司: Wnt シグナル伝達経路を制御する新規 ubiquitin ligase の機能解析、日本解剖学会・全国学術集会、H21年3月30日、岡山

3. 濱田文彦、鍋加浩明、H. Tran, M. Bienz, 小林直人、松田正司: Wnt シグナル伝達経路を制御する新規 ubiquitin ligase の機能解析、日本解剖学会総会・

全国集会、H20年3月28日、大分

[その他]

ホームページ等

<http://kenqweb.office.ehime-u.ac.jp/Profiles/0008/0000359/profile.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 直人 (KOBAYASHI NAOTO)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50234836

### (2) 研究分担者

濱田 文彦 (HAMADA FUMIHIKO)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：70252707