

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790177

研究課題名（和文） 薬剤誘導性遺伝子ノックアウト法を用いた細胞極性制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis for cell polarity regulation by using drug inducible gene-knock-out system.

研究代表者

中谷 雅明 (NAKAYA MASA-AKI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70422095

研究成果の概要（和文）：

本研究では aPKC と Daam1 の 2 種類の細胞極性関連遺伝子のコンディショナル・ノックアウトマウスを用いて、薬剤誘導下で遺伝子ノックアウトが可能な実験系を構築した。マウスの発生過程での表現型解析、上皮の初代培養系における解析を行い、aPKC-Daam1 の遺伝学的な相互作用を検出した。さらにアフリカツメガエルを用いた遺伝子ノックダウン・レスキュー法を用いた解析により aPKC の作用点が Daam1 の下流であることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we constructed novel experimental system, which enable us to disrupt gene function under the control of Tamoxifen by using Cre-loxP technology. We focused on two polarity related genes, aPKC(atypical Protein kinase C) and Daam1(Deshevelled associated activator of morphogenesis), and successfully detected genetic interaction and cellular phenotype. Further, we confirmed this results by using Xenopus injection experiment and found the possibility that aPKC acts as down stream of Daam1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：形態形成学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞極性、Cre-loxP、発生生物学、形態形成学、分子細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

aPKC(atypical Protein kinase C) が種間保存された極性シグナル複合体を形成し、1 細胞の極性制御に関与している事を示してきた。さらにツメガエルを用いて aPKC の機能破壊実験を行い、aPKC が 1. 欠失により致死 となること、2. 頭部形成に必須である こと、3. Convergent Extension (CE) と呼ばれるツ

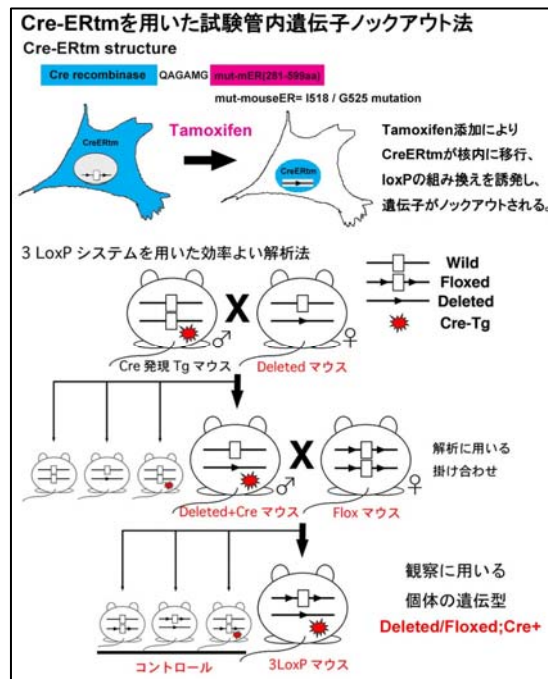
メガエル外殖体の伸長運動を制御していることを明らかにした。意外なことに、これらの表現型は細胞集団の極性を制御する、平面極性制御(PCP:Planar Cell Polarity) 遺伝子群に共通に見られるものであった。この PCP シグナルは Wnt によって制御されており、軸に沿った細胞集団の極性形成に関与している。そこで申請者は、Wnt シグナル経路にお

いて共通に用いられる Deshevelled の新規結合タンパク質として **Daam (Deshevelled associated activator of morphogenesis)** 遺伝子を同定し、ツメガエルにおける機能破壊実験により平面極性制御の表現型を示すことを確認してきた。また哺乳類には Daam1/2 の 2 種類の遺伝子が存在すること、ノックアウト (KO) マウスを作製して表現型を解析した結果、Daam1KO マウスは胎生致死であるが、Daam2KO マウスには明らかな表現型が見られないことを明らかにした。さらに、本研究の遂行のために、申請者自ら Daam1 遺伝子のコンディショナル・ノックアウトマウスを作製し、本研究のために備えてきた。

2. 研究の目的

本研究では、aPKC (1 細胞) と Daam1 (細胞集団) の 2 種類の細胞極性関連遺伝子のコンディショナル・ノックアウトマウスを用いて、マウスの初期発生過程での表現型解析、上皮の初代培養系における解析、を同時進行で行う予定であった。本研究の目的のために、薬剤 (タモキシフェン) 誘導下で遺伝子ノックアウト出来る実験系を構築し、この実験系を用いて、aPKC 単独、Daam1 単独、aPKC/ Daam1 ダブルノックアウトを行い、その表現型を比較検討することで、細胞極性制御機構を解析した。

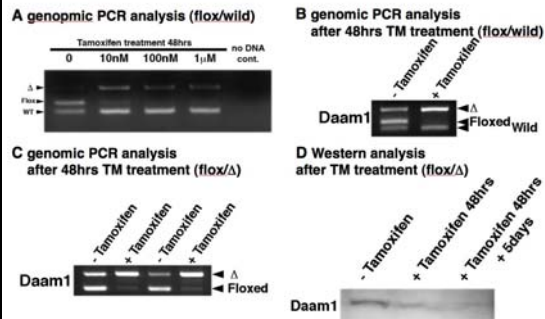
3. 研究の方法



本研究では薬剤 (タモキシフェン) を投与することで、時と場所を選ばずに遺伝子ノックアウトを行う目的で、Cre-loxP を用いたコンディショナル・ノックアウトマウスを用い

て実験系を構築した。Cre-ERTm は、Cre-loxP を用いたコンディショナル・ノックアウト法で重要な働きをする Cre リコンビナーゼを、エストロゲン・レセプター (ER) のリガンド結合領域変異体と融合させた人工タンパク質で、内因性エストロゲンに反応せず、外来性エストロゲン・アゴニストであるタモキシフェンに特異的に反応する。Cre-ERTmTg マウスと aPKC/ Daam1 ダブルヘテロマウスを掛け合わせることで、3LoxP システムによる解析を行った。(図参照) 3LoxP システムとは染色体上の Cre リコンビナーゼの標的配列である LoxP の数を遺伝学的に減らすことで、コンディショナル・ノックアウトの効率を少なくとも 2 倍に上昇させるために考案された方法であり、世界中の研究で一般的に用いられている方法である。本研究では、上記の組み換えの効率と、タンパク質レベルの消失時期のギャップを把握する目的で、aPKC/ Daam1 ダブルノックアウトマウス作成過程に得られる不要な遺伝型のマウスから初代培養により細胞を採取し、PCR 法、ウエスタンブロット法により解析を行い、タモキシフェン添加後のゲノム DNA の組み換え状態、タンパク質の挙動を実際にモニターした。その結果、タモキシフェン添加時間は 48 時間、その後培地を交換し 3-5 日の段階でタンパク質も消失することが確認できた。(下図参照)

1 μ M Tamoxifen(TM) treatment for 48hours can induce genomic DNA recombination, and Daam1 protein was disappeared 5 days after TM treatment

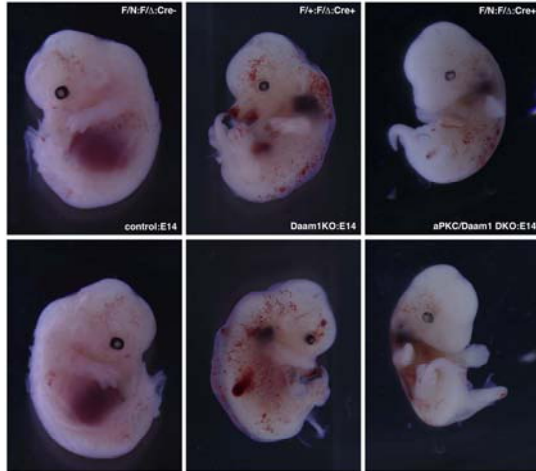


初期発生過程における表現型の解析として、胎生致死となる時期 (胎生 10 日) 以降に薬剤を投与し、胎児における表現型を解析した。この方法を用いることで、従来得ることの出来なかった、胎生致死期以降の形態形成に関する新たな知見が得られることが予測された。

初代培養法による解析としては、腎臓の上皮細胞を単離し、培地に薬剤を加えることで、細胞生物学的・生化学的解析を行った。

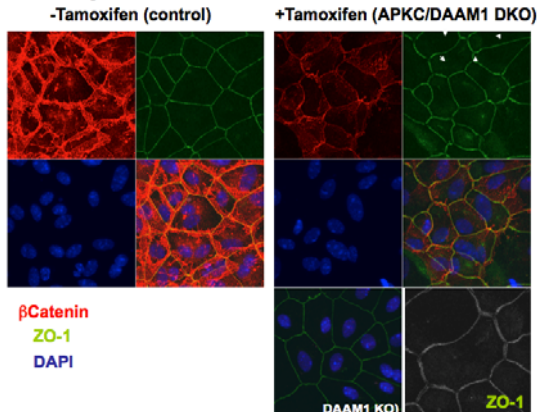
4. 研究成果

初期発生過程での解析の結果、aPKC/ Daam1 ダブルノックアウトマウスでは、平面極性異常を示す変異マウスが共通に示す kinked tail の表現型が高率 (6/8) に見られることが判明した。この表現型は aPKC 単独ノックアウト (3/14) や、Daam1 単独ノックアウト (2/10) でも見られたが、発現頻度の差から遺伝学的な相互作用が強く示唆された。

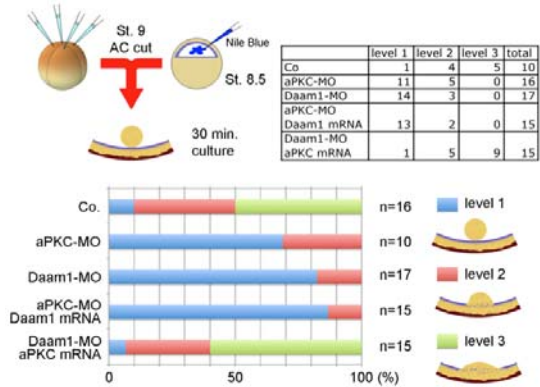


初代培養法による解析の結果、aPKC 単独ノックアウトでは細胞接着がほぼ完全に破綻するが、aPKC/ Daam1 ダブルノックアウトでは細胞接着が弛み細胞接着関連分子の局在に変化が見られた。これらの現象は Daam1 単独ノックアウトでは見られなかった。(図参照)この結果は、aPKC と Daam1 の間にシグナル優位性があることを強く示唆している。すなわち、Daam1 がシグナル上位に位置し、aPKC を介することで平面極性制御に関与している可能性を示唆する。すなわち、1細胞極性の制御に関与するとされてきた aPKC が、細胞集団の極性制御のエフェクターとして Daam1 と協調して機能していることを意味する。

Cellular genetic interaction between aPKC and Daam1



aPKC-Daam1 の遺伝学的相互作用の結果を検証する目的で、アフリカツメガエルを用いたノックダウン・レスキューの解析系を用いて検討した結果、Daam1 ノックダウンの効果は aPKC でレスキューされるが、aPKC ノックダウンの効果は Daam1 ではレスキューされない事が判明した。この結果は aPKC の作用点が Daam1 の下流であることを示唆する。



アフリカツメガエルを用いたノックダウン・レスキューの実験系は、マウスの遺伝学で行うことが非常に困難であるが、同遺伝子の機能を他の生物種で解析できる点で優れている。本研究で得られた成果は、マウスの発生過程、初代培養細胞、アフリカツメガエルと少なくとも3種の異なる解析系により得られた結果で、科学的に信憑性が高いものと言える。

今後は、さらなる統計学的解析、分子生物学的・生化学的解析を行うとともに、aPKC と Daam1 が協調して平面極性制御に関わることを主張する論文を作成する。

また、本研究の成果により薬剤誘導性遺伝子ノックアウト法が有効な解析手段であることが明らかになったので、本方法を用いてノックアウトマウスより ES 細胞を誘導し、3次元での組織構築における細胞極性制御の意義を明らかにしたい。さらに、現在のところ不明のままである細胞極性制御におけるエフェクター分子としての aPKC のターゲットの探索にも挑戦し、近未来の創薬ターゲットとなり得るかも検討したい。

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)

[学会発表] (計 2 件)

1. 中谷雅明、井関尚一

The role of aPKC and Daam in cell polarity regulation.

第116回日本解剖学会総会・第88回日本生理学会大会全国学術集会合同大会

平成23年3月30日、神奈川県

学会中止のため

The journal of Physiological Science vol.61 supplement 1, 2011, S261, P3-055 誌上発表

2. 中谷雅明

薬剤誘導性遺伝子ノックアウト法を用いた細胞極性制御機構の解析

日本解剖学会第 69 回中支部学術集会

平成21年10月10日、静岡県・浜松医科大学

[その他]

ホームページ等

http://kurt.kanazawa-u.ac.jp/souran_ku/info.php?teacher_id=858

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 雅明 (Nakaya Masa-aki)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70422095

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし