

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570206

研究課題名（和文） シグナル分子Wntの細胞内での局在と、細胞内での機能についての研究

研究課題名（英文） Studies on the localization of the signaling molecule Wnt and its function in the cell

研究代表者

坂井 雅夫(SAKAI MASAO)

鹿児島大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：40162268

研究成果の概要（和文）：

本研究は、アフリカツメガエルの初期発生で背側形成に重要な役割を果たす背側決定因子を代替する分子である Xwnt8 が、従来の常識に反して細胞内だけに局在し、細胞内で働くことを、胚の形態、免疫組織化学、lineage tracing、in situ hybridization などを用いて示したものである。本研究はシグナル伝達物質が細胞内でシグナル伝達をおこなうことを世界で初めて示した。

研究成果の概要（英文）：

The aim of the present study is to show that Xwnt8, which has been shown to substitute the dorsal determinant in Xenopus early development, can act within the cell which inherit it. This study was carried out using morphological, immunohistochemical, lineage tracing and in situ hybridization techniques. We have shown, for the first time, that the signal transduction can occur within the cell, in a cell autonomous manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：(1) アフリカツメガエル (2) Wnt (3) 小胞体 (4) lineage tracer (5) KDEL (6) chordin (7) シグナリング

1. 研究開始当初の背景

(1) アフリカツメガエルの初期発生における背側形成は2種類の細胞質ドミナントの相互作用によって引き起こされる。Wnt/b-catenin 経路はこの過程に関わっていると考えられている。Xwnt8 は初期卵割期の胚には存在しないが、背側ドミナントを代替すると考えられて来た。背側ドミナントは細胞自律的に(それが存在する細胞の中で)働くが、Wnt タンパク質は非細胞自律的に細胞表面で働くと考えられてきた。

(2) 私達は、Wnt はアフリカツメガエルの背側化過程では細胞内で細胞自律的に(その分子が存在する細胞内だけで)働くのではないかという仮説を立て、これを検証しようとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Xwnt8 が細胞外からシグナルを細胞内に伝えるのではなく、細胞内でシグナルを伝えることを示す事である。いわゆるシグナル伝達は細胞間で起こると考えられてきたが、細胞内でシグナルを伝えることがあることが示されることは、シグナル伝達概念を拡張するものとなる。また、アフリカツメガエルの細胞質ドミナントの作用機作の点でも、これが細胞内で機能することを示すということになり、意義は大きい。このような、細胞内シグナル伝達は、実は進化的に見てより古いものであることが示される。

3. 研究の方法

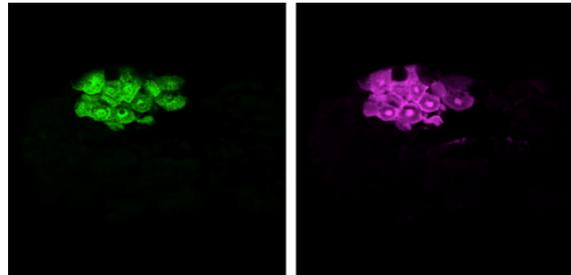
研究の方法は次の3つである。

- (1) Wnt タンパク質の局在をタグをつけた mRNA を細胞内に注入し、タグに対する抗体で染色することによって調べる。
- (2) 小胞体貯留シグナルである KDEL を Wnt につけて、その時の背側化能、タンパク質の局在を調べる。
- (3) Wnt mRNA を lineage tracer と共に卵割球に注入し、オーガナイザー遺伝子で in situ hybridization によりはっきりと発現がわかる chordin の局在と lineage tracer の局在を比較する。

4. 研究成果

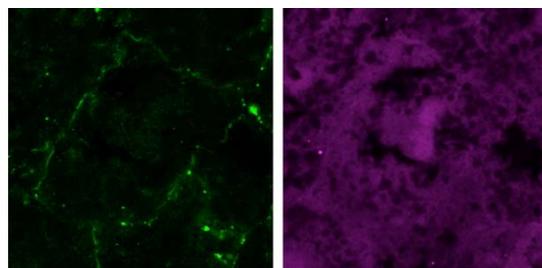
- (1) Xwnt8 に HA タグをつけた mRNA を、我々が開発したアフリカツメガエルの卵片、

PBE (Permanent Blastula-type Embryo) の4細胞期に lineage tracer Alexafluor 647 dextran と共に注入した。この胚を4000細胞期に固定し、抗体染色によって Xwnt8-HA を検出した。



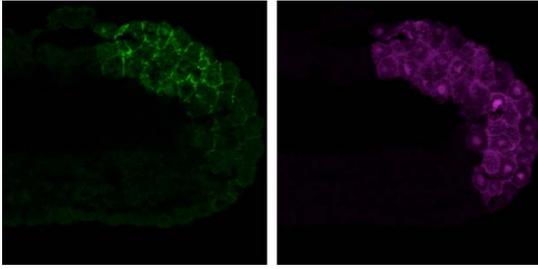
左：Xwnt8-HA。右:Alexafluor647。染色細胞は完全に重なっていて、核は Alexa では染まっており、HA では染まっていない。

- (2) Xwnt8-HA に小胞体貯留シグナルである KDEL を付加した mRNA を作製し、これを PBE に VegT mRNA と共に注入した。胚の背側化は KDEL 付加によって阻害されなかった。このことは、Xwnt8 が小胞体で機能するというアイデアを支持する。
- (3) 当初の実験では、上記の抗体染色は、固定後メタノールで3日程度保存した後に行っていた。しかし、他の研究者達による先行研究では、Wnt タンパク質は主に細胞表面に局在していた。これらの研究ではメタノール保存のプロセスは使われていなかった。そこで我々の実験でもメタノール保存を行わないで抗体染色を行ってみたところ、先行研究と同様に細胞の周辺で強い染色が見られた。



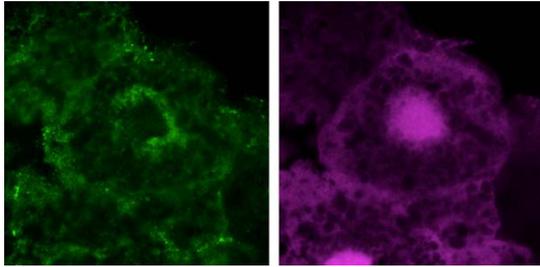
左：Xwnt8-HA。右:Alexafluor647。メタノール処理なし。HA は主に細胞の周辺で染まっていた。

- (4) しかしながら、この場合でも、HA 染色領域は lineage tracer で染まる領域と完全に重なっており、この領域外への拡散は見られなかった。



メタノール処理なしでも HA 染色領域は lineage tracer と完全に重なっていた。

- (5) また、KDEL を付加した Xwnt8 では、そもそも細胞境界での染色は見られなかった。

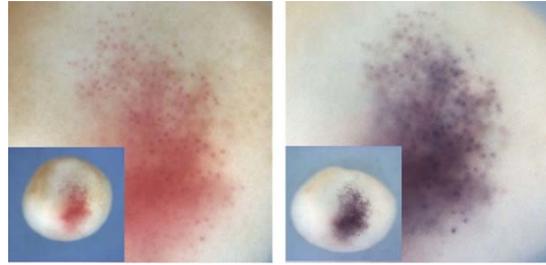


左 : Xwnt8-HA-KDEL。右 : Alexafluor 647 dextran。Xwnt8-HA-KDEL の染色は細胞周辺で見られなかった。

- (6) これらのことは、Xwnt8 が細胞内、おそらくは小胞体で働くことを強く示唆するが、非常に少量の Xwnt8 タンパク質が細胞外にでて、それが隣の細胞の Wnt リセプターに結合して背側化を引き起こすことは除外できない。この可能性を除外するために、Xwnt8 mRNA を注入した細胞でだけ背側化が起きていることをオーガナイザー因子である chordin の in situ hybridization と lineage tracing を併用して示そうとした。当初の何回かの実験では、lineage tracer と chordin の in situ パターンは非常によく一致した。これは複数の実験例で完全に重なっていたので、これが偶然の一致であるとは思われなかった。

- (7) しかしながら、実験を繰り返すうちに、lineage tracer で染まる領域の外側で chordin の発現が見られる例も見られた。これは、注入した tracer と Xwnt8 mRNA の dose と関わりがあるように思われた。つまり、tracer の濃度がある程度低いと、これが検出されない領域で、Xwnt8 の濃度が chordin の発現を導くのに必要な濃度に達するのではないか、ということである。現在、lineage tracer を別のもの

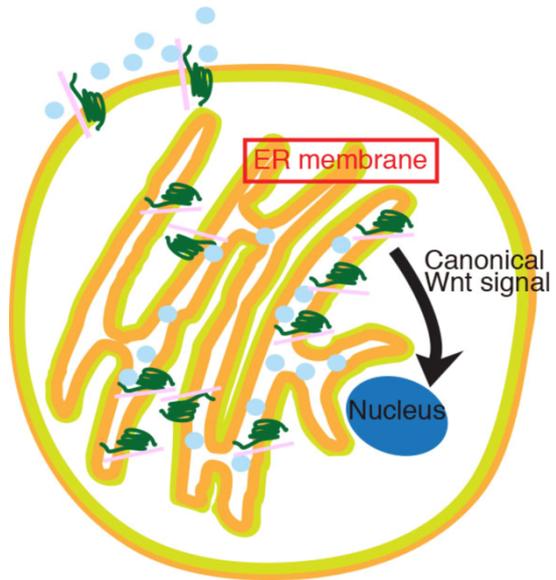
に変更して、さらに濃度の設定を変えることにより、再現性よく tracer と chordin の発現が一致するという結果が得られつつある。



左 : lineage tracer の染色。右 : chordin の in situ hybridization による染色。両者は細胞 1 個のレベルで完全に一致した。

- (8) 本研究で我々が示すモデルは以下のものである。通常の Wnt シグナリングモデルでは、Wnt タンパク質は細胞外で働くが、我々のモデルではそれは細胞内で、小胞体内で働く。小胞体と細胞膜の連続性を考慮すると、細胞外は小胞体内と共通の性質を持つに違いない。

Proposed model



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

1. Makoto Yanagisawa, Keiko Kashiwagi, Hideki Hanada, Tadashi Shinkai, Satoshi Yoshitome, Hideo Kubo, Masao Sakai, Hirotsada Fujii, Masamichi Yamashita,

Akihiko Kashiwagi, Nobuaki Furuno, Minoru Watanabe, Analysis of Head-Defects Caused by Hypergravity in Early *Xenopus* Embryos, Biological Sciences in Space, Vol. 26, pp. 1-6 (2013) 査読有.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/bs/26/0/26_1/_pdf

2. Masaaki Koga, Takuro Nakashima, Shintaro Matsuo, Ryu Takeya, Hideki Sumimoto, Masao Sakai, Hiroshi Kageura, High cell-autonomy of the anterior endomesoderm viewed in blastomere fate shift during regulative development in the isolated right halves of four-cell stage *Xenopus* embryos, Development Growth and Differentiation, Vol. 54, No. 7, pp. 717-729 (2012) 査読有.
doi: 10.1111/j.1440-169X.2012.01372.x.

[学会発表] (計 6 件)

1. Masao Sakai, Eriko Motomura, Tomohiro Narita, Shin-ichiro Nishimatsu, Tsutomu Nohno, Is chordin expressed only in the cells that received *Xwnt8* mRNA?, 14th International *Xenopus* Conference, 2012 年 9 月 12 日 (フランス).

2. Hirotaka Kato, Ayumi Horai, Eriko Motomura, Masao Sakai, Isolated ectoderm is fated to die in early *Xenopus* embryos, 44th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2011 年 5 月 20 日 (沖縄).

3. Eriko Motomura, Tomohiro Narita, Shin-ichiro Nishimatsu, Susumu Nohno, Masao Sakai, Expression of chordin in inverted embryos of *Xenopus*, 44th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2011 年 5 月 20 日 (沖縄).

4. Masao Sakai, Ayumi Horai, Hirotaka Kato, Yusuke Higashi, Eriko Motomura, Lonesome death of ectoderm, 13th International *Xenopus* Conference, 2010 年 9 月 14 日 (カナダ).

5. Eriko Motomura, Narita Tomohiro, Shin-ichiro Nishimatsu, Tsutomu Nohno, Masao Sakai, Dorsalization by Wnt signaling occurs cell-autonomously in early *Xenopus* embryo, 13th International *Xenopus* Conference, 2010 年 9 月 14 日 (カナダ).

[その他]
ホームページ
<http://www.sci.kagoshima-u.ac.jp/~garu/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

坂井 雅夫 (SAKAI MASAO)

鹿児島大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号 : 40162268