

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82648

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370094

研究課題名(和文) 分泌性シグナル分子の不均衡分散を生み出す分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis underlying distribution of secreted signaling proteins

研究代表者

高田 慎治 (TAKADA, Shinji)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：60206753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：分泌性シグナルタンパク質は様々な生命現象に重要な役割をはたすが、それらが空間的にどのように分布し、その分布がどのように制御されるか、という問題は実験方法の制約もありほとんど理解が進んでいない。それに対して本研究では、組織免疫染色方法を改良して生理的条件下でのWnt-3aタンパク質の空間分布をマウス胚脊髄神経管をモデルに解析するとともに、アフリカツメガエル初期胚においてWntタンパク質の空間分布を制御する因子を同定し、発生過程における作用を明らかにした。さらに、生化学的解析によりWntタンパク質に性状の異なるさまざまなフォームが存在し、細胞極性や細胞種によりそれらの分泌が異なることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Secreted signaling proteins play various roles in many biological phenomena. However, important questions, such as how these proteins are distributed and how their distribution is regulated, still remain to be elucidated probably because of limitation of sensitivity of experimental analyses. As one of the several approaches to answer these questions, we carefully examined spatial distribution of Wnt-3a proteins in developing mouse spinal cord by modified immunohistochemistry, identified a molecule that regulates spatial distribution of Wnt proteins using Xenopus embryo as an assay system, and examined its function in embryos. Furthermore, we also revealed that Wnt proteins are secreted in different forms according to cell types and cell polarity. These results reveal heterogeneity of Wnt proteins in spatial distribution and secreted forms.

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：シグナル伝達 発生・分化 遺伝子 Wnt

1. 研究開始当初の背景

Wntをはじめとする分泌性シグナル因子が様々な発現現象に重要なことは、動物個体を用いた分子遺伝学的解析などにより精力的に示されてきた。ではそこから一歩進んで、各々の器官の発生において、いかにして固有のかたちが形成され、特徴的な領域化のパターンが確立するのかということを理解するためには、それらのプロセスに関わる分泌シグナルが空間的にどのように分布し、その分布がどのように制御されるか、という根本的な問題を解明することが重要となる。しかしながら、この問題に対する研究はあまり進展していない。その理由の一つは、細胞外に分泌されたタンパク質そのものを「見る」方法が十分に整備されていなかったことにある。

それに対して、イメージング技術などの観測や光学機器等による測定技術の発達は、組織内での分泌性シグナル因子の可視化や、分泌性シグナル因子の動的な挙動の変化の追跡を可能にするものとして大いに注目される。一方、そのような技術を用いて行う観測や測定は、方法上の制約から生理的な状態からはかけ離れた条件で行われることもあり、生理的条件下にあるタンパク質の実態をどの程度反映しているのかということは常に考慮に入れることが重要である。したがって、分泌タンパク質の生体内での動的実態を理解するためには、発達の目覚ましい上記の観測・測定技術の利用とともに、それを補う方法をカップルさせて研究を進めて行く必要があるものと思われる。

生理的条件下での分泌タンパク質の実態を解析する有効な方法の一つは、特異的抗体を用いた内在性タンパク質の検出である。しかしながらWntの場合、30年を超える研究の歴史があるにもかかわらず、信頼に足る組織免疫染色が可能な抗体は極めて少ない。そこで我々は、研究開始時まで抗Wnt-3a抗体の調製をさまざまな方法で試み、内在性Wnt-3aタンパク質を高感度に検出できるモノクローナル抗体の作製に成功した。Wnt-3aはマウス胎生7.5日胚から原条において発現し、その後、尾芽や神経管の最背側(蓋板:roof plate)でも発現するが、この抗体による免疫組織染色では、それらの組織においてWnt-3a発現細胞だけでなく周囲の領域に分布するWnt-3aをも検出できることを確認している。

これらの発現組織のうち、神経管は組織の領域化パターンが比較的シンプルであり、かつWnt-3aの発現細胞が最背側に位置することなどから、Wntの空間分布を観察する上で適している。マウスの脊髄神経管においては、Wnt3aはWnt1とともに、神経堤細胞の増殖や分化、神経前駆細胞の運命決定や増殖など、幅広い役割を果たすことを我々を含む多くの

研究グループが明らかにしている。このようなWntの多様な機能がどのように秩序正しく制御されているのかは重要な問題であり、Wntタンパク質の空間動態がその制御に大きく関わる可能性も十分に考えられることから、神経管発生はWntの局在化の生理的意義を検討する系として興味を持たれる。

神経管に着目した研究は、生理的条件下での内在性Wntタンパク質の分布を追うことができる反面、その空間分布の制御機構やそのダイナミズムを調べることにはあまり適していない。そこで、我々はもう一つの準備として、マウス胚よりも操作性が高く、細胞が比較的大きくて観察がしやすいアフリカツメガエル初期胚上皮組織を用いて、ライブイメージングによるWnt分布の解析系の確立を試みてきた。アフリカツメガエル初期胚上皮組織では、強制発現したWnt-3aタンパク質やその受容体は細胞の周囲にドット状に局在化している。このようなWntと受容体をとともに不均一に分布させる分子機構は興味を持たれるところであり、生理的条件下でも同様の不均一化が起きるのか、またその生物学的意義は何かといったことも興味を持たれるところである。

Wntタンパク質の空間動態の制御機構を理解するためには、Wntタンパク質そのものの特質の理解も重要である。細胞外に分泌されたWntタンパク質は脂肪酸による修飾を受けており、そのために、リポタンパク質との複合体として分泌されるといったモデルや脂質2重膜からなる小胞にのって拡散するといったモデルが提唱されていた。しかしながらWntタンパク質の蛋白質化学的解析はさまざまな理由からあまり進展しておらず、そのことがWntタンパク質の細胞外動態を理解する上での障害となっている。したがって、生理的条件下でのWntタンパク質の空間局在や、Wntのイメージングとともに、蛋白質化学的解析も含めた総合的な解析の必要性が高まっていた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、Wntの分布の不均一化のプロセスとそれを作り出す分子基盤を理解することを目指し、主に次の4点を明らかにする。

- (1) 内在性Wnt-3aタンパク質の空間局在をマウス神経管を中心に解析し、生理的条件下におけるWntの分布の実態を明らかにする。
- (2) アフリカツメガエルを用いた解析により、Wntの局在化の制御に関わる分子の同定と、局在化が進む過程を明らかにする。
- (3) マウスの神経管における内在性Wntの局在化に、(2)により明らかにされたWnt局在化に関わる分子が実際に関わるかどうかを

明らかにする。それとともに、局在化がもたらす意義について明らかにする。

(4) これらと平行してWntタンパク質の高次構造などの性状の解析を行い、空間局在に関わるような特性がWnt自身にあるかどうかを検討する。

これまで、細胞外での Wnt タンパク質の拡散制御の実態についてはショウジョウバエを用いた遺伝学的な解析がなされてきたが、その不均一局在に着目して進められた研究は報告がない。また、Wnt シグナルが細胞分裂を介した不均等分配に関わることは、線虫での研究や幹細胞制御における Wnt の重要性などからも示唆されているが、そこでの Wnt の空間分布を含めた分子機構の実態は十分に明らかにされていない。我々が作製した抗体はこの問題にアプローチする上での有効な手段であり、アフリカツメガエルのライブイメージング系と併用することで、Wnt の細胞外分布の特殊性とそれにより巧妙に制御される生命現象を解明できることが期待できる。本研究は、シグナルタンパク質の細胞外局在の不均一性に着目して、器官形成を含むさまざまな生命現象の制御機構を解明する第一歩になるものであり、ここで得られる成果は今後さまざまな発生現象や幹細胞分化の制御の理解に影響を及ぼすものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 神経管におけるWnt-3aタンパク質の不均一分布の形成過程の観察

① マウス胚の脊髄神経管に着目し、Wnt-3a タンパク質がその産生細胞である蓋板(roof plate)およびその近傍にどのように分布するのかを免疫組織染色により解析した。まず、免疫染色の条件を慎重に検討し、至適条件を設定した。9.5日胚から1日おきに脊髄神経管ならびに脳神経管の組織切片を作製し、抗Wnt-3a抗体による免疫組織染色を行った。なお、コントロールとしてWnt-3a変異体マウスを用いてシグナルがWnt3a特異的であることを確認した。

② 抗Wnt-3a抗体による免疫組織染色は内在性Wntタンパク質の局在化を調べる上で有効であるが、その局在化プロセスを時空間的に解析する上では、マウス胚そのものを用いたWnt-3aのライブイメージングが必要である。そこで、EGFP-Wnt3aをWnt-3a遺伝子座に組み換えたノックインマウスの作製を行った。具体的には、ノックインコンストラクトを作製した後、理化学研究所、発生・再生科学総合研究センターに依頼して、ノックインES細胞クローンのスクリーニングとキメラマウスの作成を行った。キメラマウス作製後は、交配を繰り返し、ノックインアレ

ルをホモまたはヘテロに持つマウスで神経管の観察を行った。

③ アフリカツメガエル胚での研究から、高度に硫酸化修飾を受けたヘパラン硫酸とWntの局在化との関連が示唆された。そこで、マウス神経管におけるヘパラン硫酸の分布を抗体染色により解析した。さらに、ヘパラン硫酸の生合成酵素であるExt1 (exostosin glycosyltransferase 1)を蓋板特異的にノックアウトしたマウス胚を作製し、Wnt3aタンパク質の分布を解析した。

(2) アフリカツメガエル胞胚上皮系を用いたWnt不均一局在の解析

① 研究開始時までの予備実験から、アフリカツメガエル胞胚上皮細胞で強制発現させたGFP-Wnt3aは細胞の周辺でクラスターを形成してドット状に点在することを見いだしていた。そこで、本研究ではこのアフリカツメガエル胚の系を Wnt の不均一局在の基本過程を解析するモデル系として捉え、まずライブイメージングによる詳細な Wnt の挙動の観察を行った。さらに、アフリカツメガエルの複数種の Wnt タンパク質に対するポリクローナル抗体をウサギに免疫をして調製し、内在性 Wnt タンパク質の空間局在についても検討した。

② Wntのクラスター形成に関わる分子群を探索するため、2重抗体染色法により共局在性を検討した。受容体クラスター構成要素のDvlを含むいくつかの抗体による探索を行った結果、高度に硫酸化修飾されたヘパラン硫酸を特異的に認識する抗体によるシグナルがいくつかのWntタンパク質のシグナルと良く一致したことから、この共局在性についての検討を進めた。特に、ヘパラン硫酸の硫酸化に関わる酵素NDST1 (N-deacetylase /N-sulfotransferase 1)に着目し、その活性とWntの空間分布についての関係を、アフリカツメガエル胚を用いた過剰発現実験とMO (morpholino antisense oligo)による機能阻害実験により検討した。

(3) Wntタンパク質の性状解析

Wntがクラスター化する上では、Wntタンパク質そのものが持つ高次構造や生化学的性質も影響する可能性がある。実際に申請者の予備実験からは、培養細胞から分泌されたWnt-3aが複合体化することが示唆されている。そこで、培養細胞から調製したWnt-3aタンパク質を用いて、その高次構造と生化学的性質の解析を進めた。

4. 研究成果

(1) 神経管におけるWnt-3aタンパク質の不均一分布の形成機構

抗Wnt-3aモノクローナル抗体を用いてマウス胚脊髄神経管におけるWnt-3aタンパク質の空間分布を10.5日胚を中心に解析した。コントロールとしてWnt-3aノックアウトマウス胚を用いて特異的シグナルを観察した結果、Wnt-3aタンパク質は体幹部後方ではWnt-3a mRNAを発現する蓋板部の細胞の周囲にほぼ均一に見られたが、発生が進行している体幹部前方においては、特徴的な分布パターンを呈した。そのパターンは(A)神経管内腔側への集積、(B)蓋板部からその周囲の細胞に渡る幅広い拡散、(C)神経管外縁部への集積に分けられた。このようなWntの局在とシグナルの活性化の対応を調べるために、複数のWnt下流遺伝子の発現をIn situ hybridizationにより調べたところ、Wntの代表的な標的遺伝子として知られるAxin2の発現は(B)のパターンに沿って活性化されるのに対し、(A)のパターンに沿って局所的に発現する下流遺伝子があることもわかった。このことから、Wntタンパク質の集積と拡散の各々に応じて異なる下流遺伝子の発現が活性化されるものと考えられた(図1)。

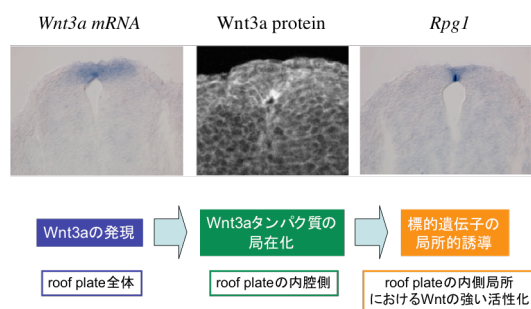


図1 Wnt3a タンパク質の局在化と局所的な標的遺伝子の活性化

そこで、このようなWnt-3aタンパク質の集積と拡散がどのように制御されているかを調べるため、Wnt1-creマウスとfloxed Ext1マウスを交配して神経管の蓋板特異的にヘパラン硫酸の生合成を阻害したマウス胚を作製し、Wnt-3aタンパク質の空間分布を観察した。その結果、上記(A)と(C)様の集積には大きな変化がなく、(B)の拡散パターンに若干の影響が認められた。このことから、少なくともWnt1-creによりExt1のコンディショナルノックアウトが起きる時期以降においては、ヘパラン硫酸はWntの局所的集積には影響を及ぼさないことが示唆された。また、このマウス胚においては、神経管背側領域の領域形成はほぼ正常におきているものの、大きさが小さくなっていった。このことは、蓋板でのヘパラン硫酸の合成が神経管の大きさの制御に関わることを示している。

一方、EGFP-Wnt3aノックインマウスは、期待していたよりも蛍光強度が弱く、Wnt3aタンパク質のライブイメージングには成功していない。今後の検出感度の向上を待って再度イメージングを試みる予定である。そこで、胚体内でWntのライブイメージングを行う新たな方法として、蛍光標識した抗体を用いてWntを可視化する方法を試み、アフリカツメガエル胚において観察に成功した。

(2) アフリカツメガエル胞胚上皮系を用いたWnt不均一局在の解析

研究開始時において、アフリカツメガエル胚で過剰に発現させたWntタンパク質はドット状の不均一な局在パターンを呈することを明らかにしていたが、内在性のWntタンパク質が同様の局在パターンを呈するのかが不明であった。そこで、Wnt8を含むアフリカツメガエル初期胚で発現する3種類のWntタンパク質に対する特異的抗体を独自に調製し、免疫組織染色を行った結果、少なくとも2種類のWntにおいては不均一な局在が観察され、内在性Wntタンパク質もドット状の不均一局在を呈することが示された。

三井や平良(東京大学)の最近の研究から、Wnt-8が高度に硫酸化修飾されたヘパラン硫酸鎖と共局在することが示されていることから、ヘパラン硫酸の硫酸化に関わる酵素NDST1に着目し、アフリカツメガエル胚を用いた過剰発現実験とMOによる機能阻害実験を行った。その結果、Wnt8のドットはNDST1の過剰発現胚では増加したが、MO導入胚では減少した。したがって、ヘパラン硫酸の硫酸化によりWntタンパク質の不均一分布が影響されることが示された。

(3) Wntタンパク質の性状解析

生化学的解析に必要な量のWntタンパク質を調製するため、いくつかの培養細胞を用いてWntタンパク質を分泌させ、その性状の解析を行った。上皮細胞であるMDCK細胞を用いて、Wnt3aを発現させたところ、頭頂側および基底側からの分泌が観察されたが、Wntの分泌形態として近年注目を集めているエクソソーム様の分泌は基底側からのみ認められた。このことは、Wntの分泌様式に多様性があり、それが細胞の極性により制御されていることを示唆している。

同様に、マウスL細胞やヒトHEK293細胞なども用いて分泌されたWntの性状を調べたところ、分泌されたWntの性状が細胞種により異なることが示され、細胞極性だけでなく、細胞の種類によってもWntの性状に違いがあることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Kimura T, Nagao Y, Hashimoto H, Yamamoto-Shhiraishi Y, Yamamoto S, Yabe T, Takada S, Kinoshita M, Kuroiwa A, Naruse K (2014) Leucophores are similar to xanthophores in their specificatio and differentiation processes in medaka *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* in press (査読有)
- ② Hisano Y, Ota S, Takada S, Kawahara A. (2013) Functional cooperation of spns2 and fibronectin in cardiac and lower jaw development. *Biol Open*. 2, 789-794 (査読有)
- ③ Takahashi Y, Yasuhiko Y, Takahashi J, Takada S, Johnson RL, Saga Y, Kanno J. (2013) Metameric pattern of intervertebral disc/vertebral body is generated independently of Mesp2/Ripply-mediated rostro-caudal patterning of somites in the mouse embryo. *Dev Biol*. 380,172-184 (査読有)
- ④ Chiu CH, Chou CW, Takada S, Liu YW. (2012) Development and fibronectin signaling requirements of the zebrafish interrenal vessel. *PLoS One*. 7(8):e43040. (査読有)
- ⑤ Yabe T & *Takada S. (2012) Mesogenin causes embryonic mesoderm progenitors to differentiate during development of zebrafish tail somites. *Dev. Biol*. 370, 213-222 (査読有)
- ⑥ Chen, Q Takada, R., & *Takada S. (2012) Loss of Porcupine impairs convergent extension during gastrulation in zebrafish. *J. Cell Sci*. 125, 2224-2234 (査読有)
- ⑦ Okubo, T., Kawamura, A., Takahashi, J., Yagi, H., Morishima, M., Matsuoka, R., & Takada, S. (2011) Ripply 3, a Tbx repressor, is required for development of the pharyngeal apparatus and its its derivatives in mice *Development* 138, 339-348 (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

- ① Mii Y, Nakayama K, Shinozuka S & Takada S, Visualization of Wnt proteins reveals their local accumulation during development 第 4 7 回日本発生生物学会 May 27-30, 2014 ウィンク愛知 愛知県名古屋市
- ② Shinozuka T, Takada R, & Takada S, Mechanism and significance of Wnt protein distributin in the mouse spinal cord. 第 4 7 回日本発生生物学会 May 27-30, 2014 ウィンク愛知 愛知県名古屋市
- ③ Mii Y & Takada S Spatial localization of noncanonical Wnt proteins during the early *Xenopus* embryogenesis. 第 4 7 回日本発生生物学会 May 27-30, 2014 ウィンク愛知 愛知県名古屋市
- ④ 高田慎治 Wnt 分泌経路における脂肪酸修飾 第 3 6 回日本分子生物学会 Dec3-6, 2013 神戸国際会議場、兵庫県神

戸市

- ⑤ Chen Q. H., Takada R., & Takada S, Polarized secretion of Wnt3a via exosome requires lipid modification. Wnt symposium 2013, July 14~16 2013, Heidelberg 大学, Germany
- ⑥ Shinozuka T, & Takada S, Spatial distribution of Wnt proteins in the developing spinal cord. EMBO Symposium “Morphogen gradient” June 26~29, 2013, Oxford 大学, UK
- ⑦ Shinozuka T, Takada R., & Takada S, Spatial distribution of Wnt proteins in the mouse neural tube. 第 4 6 回日本発生生物学会 May28-31, 2013, く にびきメッセ 島根県松江市
- ⑧ 高田慎治, 陳 秋紅, 高田律子 Wnt タンパク質の脂肪酸修飾の機構と生理的意義 Dec 14~16, 2012, 第 8 5 回日本生化学会 福岡県福岡市
- ⑨ Takada S Post-translational modification of Wnt Proteins, the 71st Okazaki Conference on “new perspectives on molecular science of glycoconjugates”, October 13, 2011, 分子科学研究所、愛知県岡崎市
- ⑩ Chen QH, Takada R., & Takada S, Deficiency for Porcupine, an O-acyltransferase gene, specifically impaires convergent extension during gastrulation and affects differently secretion of different Wnt proteins in zebrafish embryos. WNT 2011, Jun 30, 2011, UCLA, Los Angeles, USA

[その他]

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/cib2/>

http://www.nibb.ac.jp/sections/developmental_biology/takada/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 慎治 (TAKADA, Shinji)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構

(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：6 0 2 0 6 7 5 3

(2) 連携研究者

矢部 泰二郎 (YABE, Taijiro)

基礎生物学研究所・分子発生学研究部門・助教

研究者番号：3 0 4 7 0 0 7 4

高田 律子 (TAKADA, Ritsuko)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構

(岡崎共通研究施設) 岡崎統合バイオサイエンスセンター・特別協力研究員

研究者番号：4 0 4 5 0 7 2 0