

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570262

研究課題名(和文) Wntシグナルによるユビキチンシステムを介した細胞運動制御

研究課題名(英文) The regulation of cell movement by the ubiquitin system.

研究代表者

木下 典行 (KINOSHITA, Noriyuki)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・准教授

研究者番号：30300940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：Paraxial protocadherin (PAPC)は、初期胚の原腸陥入運動に関わっていることが知られている。PAPC遺伝子は、原腸胚期の背側中胚葉で発現が始まり、その後、paraxialな中胚葉にその発現が限局することが、アフリカツメガエルやゼブラフィッシュの胚でわかっている。本研究ではアフリカツメガエルを用い、PAPCがタンパク質レベルでも制御されていることを見いだした。このPAPCの制御には、PAPCの細胞内ドメインのリン酸化と、それによっておきるユビキチン化が必要であることがわかった。本研究は、原腸形成運動における細胞接着の新たな制御機構を提唱した。

研究成果の概要(英文)：Paraxial protocadherin (PAPC) has been shown to be involved in gastrulation cell movements during early embryogenesis. It is first expressed in the dorsal marginal zone at the early gastrula stage and subsequently restricted to the paraxial mesoderm in *Xenopus* and zebrafish. Using *Xenopus* embryos, we found that PAPC is regulated also at the protein level and is degraded and excluded from the plasma membrane in the axial mesoderm by the late gastrula stage. Regulation of PAPC requires poly-ubiquitination that is dependent on phosphorylation in the evolutionarily conserved cytoplasmic domain. We also show that membrane localization of PAPC is associated with low cell motility and its regulation by phosphorylation/ubiquitination is essential for normal *Xenopus* gastrulation cell movements. Taken together, our findings unveiled a novel mechanism of regulation of a cell adhesion protein and that this system plays a crucial role in vertebrate embryogenesis.

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：ユビキチン 細胞接着分子 原腸形成

## 1. 研究開始当初の背景

脊索は初期発生において形成され、神経管とともに体軸構造を作る。アフリカツメガエルにおいては、原腸胚期から神経胚期にかけて、背側中胚葉の細胞が細胞極性にしたがって形態変化し、さらにそれが中心線への収斂伸長運動を行なうことにより、脊索を形成する。脊索の正常な形成は、原腸形成運動と、それに引き続く、球形から紡錘形へと体長を伸長させる運動のために必須である。秩序正しい細胞移動は、形態形成において基本的な生命現象である。

収斂伸長運動においては、細胞間相互作用が重要であると考えられている。細胞接着分子 P APC (Paraxial protocadherin) は、細胞外ドメインにカドヘリンリピートを持つプロトカドヘリンの一つである。これまで、P APC の機能を阻害すると、原腸形成が阻害されることなどから、正常な形態形成に P APC の役割が必要であることはわかっていたが、その分子レベルでの制御機構は明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

胚の形態形成運動の仕組みを理解する上で、秩序正しく動く細胞群が、個々の細胞レベルでどのように制御されているか、細胞が集合したときに生じる細胞間相互作用が、細胞運動の秩序生成に対してどのような役割を担っているかを明らかにすることは重要である。本研究では、形態形成運動の中でも、胚発生の最初に起きるダイナミックな形態形成運動である収斂伸長運動による脊索形成のメカニズムを解析する。細胞間の接着は、形態形成運動の秩序を生み出す上でも重要である。そこで本研究では、アフリカツメガエルの原腸形成期に発現する P APC に注目し、その細胞内局在制御機構とタンパク質の安定性の制御機構を明らかにする。本研究では、P APC のユビキチン化システムによる制御機構を明らかにし、発生過程でのユビキチン化システムと細胞接着制御の役割を明らかにする。それによって、個々の細胞間相互作用の制御機構が、形態形成運動においてどのような役割を果たしているかを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) P APC、E3 ユビキチン化酵素、脱ユビキチン化酵素、ユビキチンなどに GFP、RFP、GST などのタグをつけたプラスミドを作製し、in vitro で RNA 合成を行ない、アフリカツメガエル初期胚にインジェクションを行なった。また、必要に応じて、PCR による突然変異導入を行なった。

(2) 原腸形成開始期に、背側中胚葉の外植片を切り出し、共焦点顕微鏡で観察した。細胞膜は、farnesylation シグナルをつけた GFP

または RFP を共発現することにより可視化した。

(3) ユビキチン化の検出は、myc タグしたユビキチン遺伝子と GST タグした標的(基質)遺伝子をカエル初期胚に RNA として導入し、GST プルダウンを行った。プルダウンしたサンプルを、抗 myc 抗体を用いたウェスタンブロットによりユビキチンを検出した。

## 4. 研究成果

(1) P APC は、収斂伸長運動を行う背側中胚葉細胞の正常な細胞接着に重要な役割を果たす。

本研究では、P APC の原腸形成運動における役割を細胞レベルで明らかにするため、アンチセンスモルフォリノオリゴによるノックダウン実験を行った。4 細胞期の胚にモルフォリノをインジェクションし、原腸陥入の始まる時期に、背側中胚葉組織を切り出した。それをスライドグラス上で培養し、顕微鏡観察を行った。コントロールモルフォリノをインジェクションした胚の細胞は、細胞間接着により動きが抑えられているのに対し、P APC に対するモルフォリノの場合は、細胞同士の接着が失われ、細胞が組織の中をランダムに動くことが観察された。これにより、組織は秩序を失い、この後に起こる収斂伸長運動、その結果できる脊索の形成が異常になることがわかった。

(2) P APC は収斂伸長を行なう背側中胚葉細胞においては急速に減少する。

P APC-GFP をアフリカツメガエル胚の中胚葉で発現させて、その動態を顕微鏡で観察した。原腸形成期初期の中胚葉では P APC は観察されるが、神経胚期の収斂伸長を行なっている細胞では、ほとんど検出できなくなる。この減少は、プロテアソーム阻害剤では阻害されなかったが、リソソーム阻害剤で阻害されることから、リソソームによる分解が関わっていると考えられた。この P APC タンパク質の減少は、背側中胚葉以外の組織では見られなかったことから、この組織に特異的なタンパク質安定性制御機構であると考えられる。

P APC タンパク質が減ることが発生において重要であるかどうかを検証するため、過剰発現実験を行なった。P APC を過剰発現した胚では、収斂伸長運動が阻害され、体長の短い表現型を示す胚が多数観察された。また、アニマルキャップアッセイにおいて、Nodal 発現による伸長を、P APC の過剰発現が阻害することもわかった。さらに顕微鏡観察による細胞レベルの解析においても、P APC の過剰発現が、収斂伸長を顕著に阻害することが明らかになった。以上のことから、P APC は、収斂伸

長運動する細胞においては、PAPC は分解されることが、正常な形態形成運動に必須であることがわかった。

この過剰発現実験においては、全長の PAPC よりも、細胞内ドメインを欠失させた変異遺伝子のほうが、収斂伸長の阻害効果が高かった。さらに、この変異では、収斂伸長を行なう細胞におけるタンパク量の減少が見られなかった。このことは、PAPC の細胞内ドメインが、PAPC の制御に重要であることを示唆している。

(3) PAPC はリン酸化により局在と安定性が変化する。

PAPC は魚類、鳥類、哺乳類でも保存されている分子である。そのなかでも特に保存性の高い領域が細胞内ドメインに存在する。この部分は約 20 数アミノ酸からなり、アスパラギン酸とセリンに富むことから DSR ドメインと名付けた。この領域を欠損したり、保存されているセリン残基をアラニンに置換した変異 PAPC 分子では、細胞膜への局在が減り、細胞質に大きな塊を形成することがわかった。この変異タンパク質は、収斂伸長運動期での PAPC タンパク質レベルの低下が見られなかったことから、分解を受けない変異と考えられる。セリンをアラニンに置換することによって安定性が変化することから、リン酸化による制御を考え、GSK3 のドミナントネガティブ変異遺伝子を発現させたところ、野生型 PAPC が DSR ドメイン変異と同様の局在と安定性を示した。

また、*in vivo* において PAPC がリン酸化されているどうかを検討するため、リン酸化された DSR ドメインのペプチドに対する抗体を作成した。GST タグした PAPC をアフリカツメガエル胚において発現させ、原腸胚期にタンパク質を回収・精製してウェスタンブロット法により解析した。精製した PAPC は、リン酸化ペプチド抗体により認識されること、またプロテインホスファターゼ処理により、認識されなくなることから、PAPC の DSR ドメインは、胚発生においてリン酸化を受けいていると考えられる。

さらに、大腸菌に生成させた PAPC の細胞内ドメインのタンパク質を、リコンビナントの GSK3 と *in vitro* で発現させたところ、リン酸化 PAPC 抗体によるリン酸化が検出された。このことから DSR のリン酸化は、GSK3

によっておこることが強く示唆された。これらの結果から、PAPC は GSK3 によるリン酸化により、その局在と安定性が制御されていることが明らかとなった。

(4) PAPC は  $\beta$ -TrCP によりユビキチン化される。

PAPC の細胞内ドメインのリジン残基を全てアルギニンに置換した変異タンパク質(KR 変

異)を発現させたところ、DSR ドメインの変異体と同様の表現型を示すことがわかった。このことから我々は、PAPC がユビキチンによる制御を受けていると考え、ユビキチン E3 リガーゼとの相互作用を検証した。その結果、E3 リガーゼの一つである  $\beta$ -TrCP が PAPC と共局在することを見いだした。さらに  $\beta$ -TrCP のドミナントネガティブ変異遺伝子(TrCP<sup>F</sup>)を発現させたり、モルフォリノオリゴによりノックダウンを行なうと、PAPC は KR 変異体を同様の局在、安定性を示すこともわかった。さらに TrCP<sup>F</sup> は収斂伸長運動を阻害することから、 $\beta$ -TrCP による制御が初期発生において必須であることを明らかにした。

さらに、myc タグしたユビキチンを用いたユビキチン化アッセイを行ない、アフリカツメガエル胚において実際に、PAPC のユビキチン化が起こっていることもわかった。また、上記 DSR 変異をもった PAPC では、そのユビキチン化が減少していた。

以上の結果から、PAPC の DSR ドメインは、リン酸化に依存したユビキチン化に必須のドメインであり、それによって、PAPC の局在や安定性が制御されていると考えられる。

(5) valosin-containing protein (VCP) の関与

VCP はユビキチン鎖に結合する多機能のタンパク質である。本研究では、ポリユビキチン化される PAPC と VCP との機能的な関連を調べるため、VCP のドミナント・ネガティブ型変異遺伝子を PAPC と共発現させた。すると、PAPC のタンパク質量が著しく減少することがわかった。その結果、細胞接着能が減少し、原腸形成運動が異常になることがわかった。

(6) 考察

以上の結果から、PAPC はプロテインキナーゼ GSK3 によるリン酸化、そして E3 リガーゼ  $\beta$ -TrCP によるユビキチン化の制御を受けていることがわかった。さらにはユビキチン結合タンパク質 VCP も関わっていることもわかった。そして、脊索を形成するための重要な細胞運動である収斂伸長運動において、この制御機構が必須であることを明らかにした。細胞膜に局在する膜タンパク質の、これらの分子による一連の制御機構は未だ報告されておらず、重要な成果として発生学、細胞生物学の分野において大きなインパクトがあると期待される。また、PAPC の属するプロトカドヘリンはガンの抑制遺伝子としても知られている。プロトカドヘリンの安定性や局在制御を明らかにした我々の成果は、医学的な分野でも重要な知見となる可能性を持っている。

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 1 件)

Takagi C, Sakamaki K, Morita H, Hara Y, Suzuki M, Kinoshita N, Ueno N.  
Transgenic *Xenopus laevis* for live imaging in cell and developmental biology. *Development, Growth and Differentiation*. 査読有、55巻(2013年):p422-433.  
DOI: 10.1111/dgd.12042

[学会発表](計 2 件)

Kai M and Kinoshita N  
Regulation of paraxial protocadherin (PAPC) by a phosphorylation- dependent ubiquitin system is required for *Xenopus* early development.  
46th annual meeting for the Japanese society of Developmental Biologists.  
2013年05月28日~2013年05月30日 島根県立産業交流会館(くにびきメッセ)(島根県・松江市)

Kai M and Kinoshita N  
Prickle and -TrCP regulate cell adhesion by controlling paraxial protocadherin activity through ubiquitination in *Xenopus* development.  
44th annual meeting for the Japanese society of Developmental Biologists  
2011年05月18日~2011年05月21日  
沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木下 典行 (KINOSHITA, Noriyuki)  
基礎生物学研究所・形態形成研究部門・准教授

研究者番号: 30300940