

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 26 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770260

研究課題名（和文） Wnt/平面細胞極性経路のコア分子によるアクチン細胞骨格および細胞接着の制御機構

研究課題名（英文） Regulatory mechanisms of actin cytoskeleton and cell adhesion by Wnt/planar cell polarity pathway core molecules

研究代表者

甲斐 理武（KAI MASATAKE）

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30572573

研究成果の概要（和文）：初期形態形成の分子機構を明らかにするため、集団的細胞運動に関する細胞接着の制御を担うと考えられる paraxial protocadherin (PAPC) の調節の詳細を解析した。その結果、PAPC はリン酸化とそれに依存したユビキチン化を受け、これらの修飾が PAPC タンパク質の局在と安定性を制御することが明らかになった。この PAPC 制御のシステムは、ツメガエルの初期発生に必須な役割を果たしている。PAPC の修飾に必要な領域は進化的に保存されていることから、このシステムはほかの様々な系においても重要な役割を果たしていることが推測される。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate molecular mechanisms underlying early morphogenesis, I investigated regulation of paraxial protocadherin (PAPC), which is supposed to control cell adhesion essential for grouped cell migration. I revealed that PAPC is phosphorylated and ubiquitinated in a phosphorylation-dependent manner, and these modifications are required for proper localisation and stability of PAPC protein. This regulatory mechanism plays a crucial role in early *Xenopus* development. The amino acid sequence required for PAPC modification is evolutionarily conserved, thus this system may function in other important biological processes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：形態形成・細胞運動・細胞接着・プロトカドヘリン・リン酸化・ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物が形態を獲得する過程では、方向性を持つ集団的な細胞移動が不可欠な原動力となる。例えば、アフリカツメガエルの原腸形成においては、中胚葉における収斂-伸長運動と呼ばれる細胞運動が、細く長い体軸を形作る過程を促進する。ここでは、細胞群は（1）運動に先立って正中-側方方向に極性を持って整列し、（2）運動中も集団としての性質を維持しつつ、個々の細胞は細胞間への入り込みを行う。これらのことから、収

斂-伸長運動においては（1）細胞骨格の制御、と（2）細胞の接着-脱接着の制御、が必須であると考えられている。

収斂-伸長運動を制御するシグナル伝達系としては、Wnt/平面細胞極性（PCP）経路が知られている。Wnt/PCP 経路は、もともとショウジョウバエの翅において、平面細胞極性を制御することにより剛毛の方向を決定する系として発見されたが、その後の研究によって、脊椎動物の収斂-伸長運動や、神経管の閉鎖など、さまざまな局面で機能している

ことが明らかになっている。しかし Wnt/PCP 経路がアクチン細胞骨格を制御する機構の詳細は不明であり、また細胞接着との関係はこれまでほとんど明らかになっていなかった。

私は予備的な実験から、Wnt/PCP 経路の‘コア’分子(この経路においてショウジョウバエと脊椎動物で共通して働く分子)の一つである Prickle (Pk) を改変して培養細胞で発現させると、アクチン性の糸状突起の形成が促進されることを見いだしていた。さらに、改変型 Pk をアフリカツメガエル初期胚で発現させると、細胞接着に異常をきたすことを観察していた。

2. 研究の目的

(1) 初期発生における細胞運動に必須なアクチン細胞骨格の制御機構について、その詳細を明らかにする。特に Wnt/PCP 経路のコア分子である Pk と関連する分子ネットワークに着目する。

(2) 初期発生における細胞運動に必須な細胞の接着-脱接着の制御機構について、その詳細を明らかにする。特に Wnt/PCP 経路のコア分子である Prickle と関連する分子ネットワークに着目する。

3. 研究の方法

主にアフリカツメガエル胚をもちい、Pk との関連が示唆される分子の調節機構を調べた。手法としては、外植片に発現させた蛍光ラベルしたタンパク質の共焦点レーザー顕微鏡による局在と安定性の観察、改変したタンパク質の挙動の観察、リン酸化やユビキチン化などの生化学的解析、タンパク質間相互作用の解析などをおこなった。さらにツメガエル全胚の観察から、形態形成に関わる機能を評価した。生化学実験では、必要に応じて哺乳類由来の培養細胞も用いた。

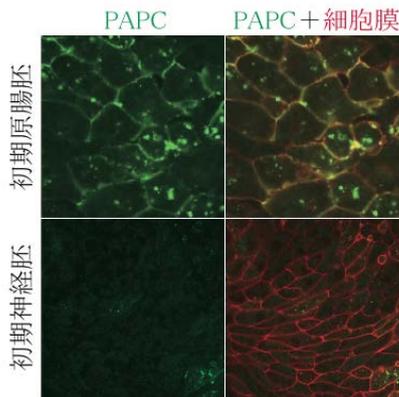
4. 研究成果

当初の研究目的のうち、特に「(2) 細胞の接着-脱接着の制御機構の詳細」について、以下のような興味深い結果を得た。

(1) プロトカドヘリン・ファミリーに属する *paraxial protocadherin (PAPC)* は、ツメガエルの初期発生において細胞接着に働き、その活性はタンパク質レベルで調節されている

蛍光ラベルした PAPC をツメガエル初期胚で発現させ観察したところ、PAPC は原腸形成開始時にはオーガナイザー領域で主に細胞膜上に存在するが、原腸形成が進むと分解を受け、細胞膜から除去されることが分かった(図1)。また、PAPC が細胞膜から除かれる条件では、細胞の接着性が低下して細胞運動が促進されることを見いだした。

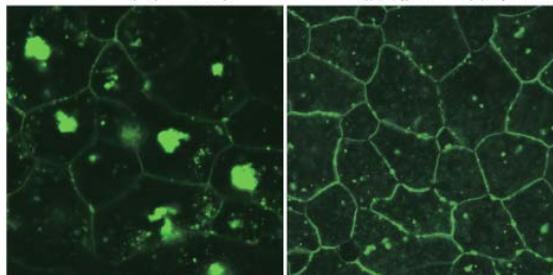
図1 ツメガエル細胞におけるPAPCの局在と安定性



(2) GSK3 による PAPC のリン酸化は、PAPC の制御に必須である

PAPC の細胞内ドメインには、アスパラギン酸とセリンに富んだ、進化的に保存された 25 アミノ酸程度の領域 (DSR ドメイン) が存在する。DSR ドメインにおいて、特定のセリンをアラニンに置換してリン酸化を阻害したところ、PAPC が細胞膜から排除された。ツメガエル胚においてキナーゼである GSK3 の活性を阻害したところ、やはり PAPC が細胞膜から排除された。DSR ドメインにおいて、特定のセリンをアスパラギン酸に置換してリン酸化を模倣したところ、GSK3 の活性に関わらず PAPC は細胞膜にとどまった(図2)。これらのことから、PAPC の正常な挙動には、GSK3 による DSR ドメインにおけるリン酸化が必須であることが明らかになった。

図2 GSK3機能阻害条件下でのPAPCの局在
PAPC (野生型) PAPC (疑似リン酸化型)



(3) β -TrCP による PAPC のユビキチン化は、リン酸化依存적であり、PAPC の制御に必須である

β -TrCP は E3 ユビキチンリガーゼ複合体を構成する分子である。PAPC と β -TrCP がツメガエルの細胞において共局在すること、また両者の間に物理的相互作用が観察されたことから、PAPC のユビキチン化の検討を行った。その結果①PAPC は β -TrCP 依存的なユビキチン化を受ける (図3)、②PAPC と β -TrCP の物理的相互作用は PAPC のリン酸化に依存しており、その結果 PAPC のユビキチン化もリン酸化に依存する、③ β -TrCP

の活性はツメガエル初期発生における細胞運動に必須である (図4)、という結果を得た。

図3 PAPCのユビキチン化

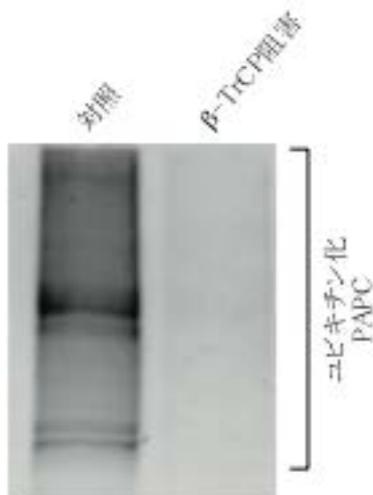


図4 ツメガエル胚における β -TrCP阻害



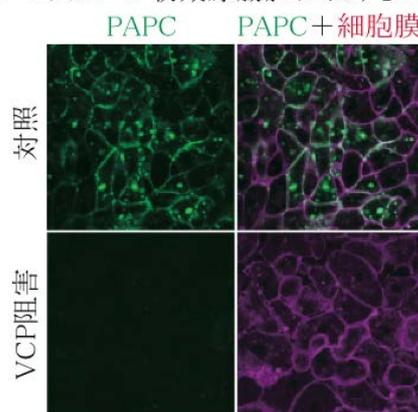
(4) *Pk* は *PAPC* と β -*TrCP* の相互作用を促進する

ツメガエル細胞において、*Pk* と β -*TrCP* の間には物理的相互作用が確認され、また *Pk* は β -*TrCP* を細胞膜に局在させることが観察された。またツメガエル初期胚で *Pk* をノックダウンしたところ、*PAPC* と β -*TrCP* の相互作用が阻害され、それに伴って *PAPC* のユビキチン化が低下した。したがって、*Pk* は *PAPC* と β -*TrCP* の細胞膜上での相互作用を促進することで、*PAPC* の適切な制御に関与していることが示唆された。

(5) *Valosin-containing protein (VCP)* が *PAPC* の再循環と分解の振り分けを担う

VCP は *ATPase* 活性をもつ分子シャペロンで、ユビキチン修飾の編集に関与することが知られている。ツメガエル胚において、*VCP* の活性を阻害すると、*PAPC* が原腸胚初期においても分解を受けることがわかった (図5)。すなわち、*VCP* は原腸胚初期までは *PAPC* を細胞膜への再循環を、原腸胚期中期以降では *PAPC* の分解を促進するスイッチとしての役割をもっている。

図5 ツメガエル初期原腸胚における*VCP*阻害



以上の結果から、リン酸化とユビキチン化を介した細胞接着分子の細胞膜への再循環と分解の機構の詳細が明らかになった。*Wnt/PCP* 経路のコア分子である *Pk* はこのシステムの働きを促進し、またシャペロンである *VCP* は再循環と分解の分子スイッチとしての役割を担っている。このシステムは初期胚の細胞運動に必要な細胞の接着-脱接着を調節していると考えられる。*PAPC* の制御に必要な *DSR* ドメイン様のアミノ酸配列は、プロトカドヘリンファミリーなどほかのタンパク質にもみられることから、同様の機構がさまざまな生物学的プロセスで働いていることが示唆される。

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2件)

(1) Takahashi M, Terasako Y, Yanagawa N, Kai M, Yamagishi T, Nakajima Y. Myocardial progenitors in the pharyngeal regions migrate to distinct conotruncal regions. *Dev Dyn* (査読有) 241, 284-93 (2012). doi: 10.1002/dvdy.23714.

(2) Tada M, Kai M. Planar cell polarity in coordinated and directed movements. *Curr Top Dev Biol* (査読有) 101, 77-110 (2012). doi: 10.1016/B978-0-12-394592-1.00004-1.

[学会発表] (計5件)

(1) 甲斐理武, 木下典行. Regulation of paraxial protocadherin (*PAPC*) by a phosphorylation-dependent ubiquitin system is required for *Xenopus* early development. 第46回日本発生生物学会, 松江 (2013年5月30日).

(2) 甲斐理武, 木下典行. Regulation of paraxial protocadherin (*PAPC*) by a phosphorylation-dependent ubiquitin system is required for *Xenopus* early

development. 第118回日本解剖学会総会・
全国学術集会, 高松(2013年3月30日).

(3) Kai M, Kinoshita N. Regulation of
paraxial protocadherin (PAPC) by a
phosphorylation-dependent ubiquitin
system is required for *Xenopus* early
development. British Society for
Developmental Biology, British Society for
Cell Biology and Japanese Society of
Developmental Biologists Joint Spring
Meeting, University of Warwick, UK (17th
April 2012).

(4) 甲斐理武. 初期発生におけるユビキチン化
を介した細胞接着分子の制御機構. 日本発生
生物学会秋期シンポジウム2011, 岡崎(2011
年12月21日).

(5) 甲斐理武, 木下典行. Prickle and β -TrCP
regulate cell adhesion by controlling
paraxial protocadherin activity through
ubiquitination in *Xenopus* development.
第44回日本発生生物学会, 宜野湾(2011年5
月19日).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲斐 理武 (KAI MASATAKE)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 30572573

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし