

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590237

研究課題名(和文) 3次元形態形成過程における、細胞極性制御に関わる分子ターゲットの同定

研究課題名(英文) Identification of the molecular target to regulate Cell Polarity during 3 dimensional morphogenesis.

研究代表者

中谷 雅明 (Nakaya, Masa-aki)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：70422095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々の身体が3次元の構造をしていることは目で見て明らかであるが、この精巧な構造が形成される制御メカニズムを、分子生物学的に説明することは出来ていない。本研究では1細胞極性制御因子aPKCとWntシグナル経路のうち平面極性(PCP:Planar Cell Polarity)を制御する因子と考えられているDaam1との相互作用を、ツメガエル初期胚における機能破壊実験、薬剤誘導性コンディショナル・ノックアウトマウスを用いた遺伝学的解析と生化学的解析を行った。その結果、aPKCとDaam1の両者に結合する介在タンパク質を同定し、機能的相互作用を検出した。

研究成果の概要(英文)：Proper regulation of cell polarity and directional cell movements is essential to form correct three-dimensional architecture. Atypical protein kinase C (aPKC) is known as the key regulator for apical-basal (z axis) cell polarity, however, it is not clarified the role in the regulation of cell sheet (x-y plane) polarity, as well as planar cell polarity (PCP) in relation to Wnts and other signaling cascades. In this study, we show that aPKC genetically connect to Daam1 (Dshvelled associated activator of morphogenesis 1), which plays important role in Wnt-PCP signaling. We also found functional interaction between aPKC and Daam1 in *Xenopus* embryogenesis. Further, we present physical interaction between aPKC and Daam1. These results strongly suggest that aPKC contributes planar cell polarity regulation, in vivo and in vitro.

研究分野：分子細胞生物学、発生生物学、形態形成学

キーワード：細胞極性 平面極性 形態形成 遺伝子相互作用 aPKC Daam1 Wnt-PCP

1. 研究開始当初の背景

本研究は、細胞極性制御という3次元での形態形成過程に必須である生命現象の根幹メカニズムに着目し、さらに1細胞と細胞集団と細分化して極性の制御機構を詳細に解析することにより、形態形成過程における3次元細胞極性制御に関わる具体的な分子ターゲットを同定することを目的とする。本研究ではこれまで独自に構築してきた薬剤誘導性遺伝子ノックアウトシステムを用い、分化全能性細胞、器官原基、器官形成期胚について遺伝学的相互作用の本態をタンパク質の活性調節レベル・遺伝子発現調節レベルで解明することで、がん・再生医療に貢献する。

2. 研究の目的

形態形成過程における3次元細胞極性制御に関わる具体的な分子ターゲットを同定する。

- (1) アフリカツメガエルを用いた発生生物学的手法により、表現形を判定基準とした機能的解析を行う。
- (2) ノックアウトマウスを用いて、遺伝学的相互作用の検出を行う。
- (3) 上記(1)、(2)の結果、相互作用が検出された遺伝子について、分子生物学的手法を用いて、試験管内で生化学的相互作用の検出を行う。
- (4) (3)の解析の結果を、(1)の解析系を用いて再確認し、信憑性を評価する。

3. 研究の方法

薬剤誘導性遺伝子ノックアウトシステム(平成21-22年度若手研究B)を用いて、生体内・試験管内で遺伝子ノックアウトを誘発し、遺伝学的・形態学的・機能的解析、生化学的解析、プロテオミクス解析を行った。

4. 研究成果

1細胞極性制御因子 aPKC と Wnt シグナル経路のうち平面極性 (PCP:Planar Cell Polarity) を制御する因子と考えられている Daam1 との相互作用を検出し、両者に結合する介在タンパク

質を同定した。さらにツメガエル初期胚を用いた解析により、機能的相互作用も検出した。

ツメガエル初期胚で aPKC の機能を阻害した時の表現形を手掛かりとして、同様の表現形を示す機能遺伝子の探索を行った結果、Wnt シグナルに關与する新規遺伝子 Daam (Disheveled-associated activator of morphogenesis) が候補として同定された。そこで、マウスホモログをクローニングし、初期発生過程における発現分布を解析した。さらに、アフリカ・ツメガエル胚を用いて RNA *in situ*法を行い、マウスの発現領域との比較も行った (*Gene Expression Patterns* 5: 97-105. 2004)。さらに aPKC と同一の機能阻害解析を行い、その表現形が非常によく似ている事を確認した。そこで、Daam 1/2 遺伝子ノックアウトマウスを作製し胎生致死である事を報告した (*Developmental Biology*, 408, 126-39, 2015)。

マウスにおいては、aPKC のノックアウトマウスを既に作製・解析していたので (*J Neurosci*. 25, 10290-10298. 2005)、遺伝学的解析を行って相互作用を検出した。興味深い事に、この表現形は報告されている Wnt シグナルのうち、平面極性 (PCP:Planar Cell Polarity) を制御する、Wnt-PCP 経路に関連する遺伝子群によく見られるものであった。そこで、応募者はツメガエル初期胚での機能阻害の実験系を用いて、aPKC-Daam1 のシグナル相互作用点の検出を試みた。その結果、aPKC の結合タンパク質である介在タンパク質が下流に位置することが明らかとなってきた。興味深い事に、この分子は Wnt シグナルにも関連している事が知られている。そこで、介在タンパク質と Daam1 タンパク質の相互作用を生化学的に解析したところ、aPKC-介在タンパク質-Daam1 の複合体が検出された。さらにこの複合体は介在タンパク質の aPKC によるリン酸化状態により変化する事が示唆された。これらの結果は、遺伝学的、機能的、生化学的相互作用を同時に検出しており、信憑性が非常に高いので論文作成中である。

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. Mizushima T., Asai-Sato M., Akimoto K., Nagashima Y., Taguri M., Sasaki K., Nakaya MA, Asano R, Tokinaga A, Kiyono T., Hirahara F., Ohno S., Miyagi E. Aberrant expression of the cell-polarity regulator aPKC / is associated with disease progression in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) : a possible marker for predicting CIN prognosis. *International Journal of Gynecological Cancer*, 35, 106-17, 2016 (査読あり)
doi: 10.1097/PGP.0000000000000228.

2. Ajima R, Bisson JA, Helt JC, Nakaya MA, Habas R, Tessarollo L, He X, Morrisey EE, Yamaguchi TP, Cohen ED. DAAM1 and DAAM2 are co-required for myocardial maturation and sarcomere assembly. *Developmental Biology*, 408, 126-39, 2015(査読あり)
doi: 10.1016/j.ydbio.2015.10.003.

(学会発表)(計 5 件)

1. 中谷雅明、大野茂男
「細胞極性及び mRNA 監視系を起点とした新規バイオマーカーと創薬標的の開発」、文部科学省 イノベーションシステム整備事業・先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム・「翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成」・第6回シンポジウム「疾患の克服に向けた翻訳後修飾プロテオミクス医療研究開発」、2015年10月19日、横浜市立大学・先端医学研究センター(神奈川県横浜市)
2. 中谷雅明、森山佳谷乃、浅田希央、井野洋子、平野久、大野茂男
「上皮細胞株の樹立法とその解析」
新学術領域「上皮管腔組織形成」・若手主

催研究会、2014年11月28日、
FUKURACIA 浜松町(東京都港区)

3. Nakaya MA, Ohno S, Yamaguchi TP, Matsukawa S, Michiue T, Koroda H. Genetic analysis between single cell polarity gene, atypical PKC (aPKC), and Dishevelled associated activator of morphogenesis (Daam1), that regulates tissue morphogenesis in cell population. 新学術領域「細胞コミュニティー」第6回班会議、2013年、11月25-27日、ホテルグリーンピア南阿蘇(熊本県阿蘇郡)
4. Nakaya MA Identification of Cell Polarity Target Phospho-Protein by Using Inducible Gene Knock-Out Strategy. HUPO 12th Annual World Congress Yokohama, 2013年9月14-18日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
5. 中谷雅明 初期発生過程における細胞極性制御機構に関する機能解析
新学術領域「細胞コミュニティー」第5回班会議、2012年、11月19-21日、IPC 生産性交流センター(神奈川県三浦郡)

(図書)(計 0 件)
該当なし

(産業財産権)
出願状況(計 1 件)

名称:「子宮頸がんの予防を目的とした前がん病変の進行を予測する検査方法」
発明者:大野茂男、水島大一、宮城悦子、佐藤美紀子、平原史樹、中谷雅明
権利者:横浜市立大学
種類:特許
番号:特願 2014-019201
出願年月日:2014年3月
国内外の別:国内

取得状況(計 0 件)
該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://researchmap.jp/read0131475/?lang=japanese>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 雅明 (NAKAYA, Masa-aki)

横浜市立大学・医学部・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

(4) 研究協力者

大野 茂男 (OHNO, Shigeo)

森山 佳谷乃 (MORIYAMA, Kayano)

浅田 希央 (ASADA, Kio)

福田 彩乃 (FUKUDA, Ayano)