

「Wntによる平面細胞極性の動的形成機構の解明」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：三井 優輔

1. 研究のねらい

平面細胞極性 (PCP) はハエからヒトに至るまで広く保存された、多細胞動物で普遍的に見られる細胞の方向性の情報であり、身近なところでは我々の頭髪や体毛の流れとして目にすることができます。極性を持った細胞では「コア PCP 因子」と呼ばれる一連の蛋白質群が、一細胞内でも偏った局在を示すことが知られており、方向性の情報を検知、あるいは保持する上で重要であると考えられている。しかしながら、現在のところ細胞に方向性を与える外的要因 (ポラリティーキュー) に関する理解は十分ではない。本研究は平面細胞極性を方向付けることが知られている分泌性シグナル蛋白質 Wnt の可視化を基盤として、如何にして Wnt 蛋白質が平面細胞極性を方向づけるかを、先端的イメージング技術を活用して解析し、分子レベル・細胞レベルでの相互作用として理解することを目的とする。更にそれをもとに平面細胞極性を培養系で再構成することを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、Wnt11 が如何にして平面細胞極性 (PCP) を制御するかを解明することを目標としている。Wnt11 は従来いわゆるモルフォゲンとして濃度勾配を作ることで、平面細胞極性を制御すると考えられてきた。しかし我々がアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 初期胚で Wnt11 蛋白質の可視化をおこなったところ、必ずしも濃度勾配ではない局在性が明らかになってきた。特に Wnt11 の局在性が平面細胞極性に関わる因子やヘパラン硫酸鎖などによって局所的に制御されるという私の独自の発見に基づき、Wnt11 の局在性の制御の詳細について解析をおこなった。

まず、神経板で見られる内在性の Wnt11 の分布はコア PCP 因子の分布に類似した偏った分布を示すが、「分泌性蛋白質の細胞外分布は細胞表面の足場分子に依存する」(Mii et al., *eLife* 2021) ことを考えるとコア PCP 因子が Wnt11 の足場形成に関わっている可能性が考えられる。そこで、コア PCP 因子の一つ *vangl2* のノックダウンをおこなったところ、Wnt11 の局在が失われた。また、Wnt11 蛋白質の局在やヘパラン硫酸 (HS) 鎖の局在について、方向性の定量化の手法について検討した結果、定量的な評価が可能になった。さらに *Vangl2* のリン酸化修飾に注目し、他のコア PCP 因子との局在性を超解像イメージングも用いて解析をおこなった。*Vangl2* のリン酸化に関連する各種変異体を作成し、他のコア PCP 因子との組み合わせを検討した結果、Wnt11 の足場となり得る組み合わせを見いだすことができた。

別の観点から、Wnt11 の局在性やコア PCP 因子の局在性へのヘパラン硫酸 (HS) 鎖・HS プロテオグリカン (HSPG) の関与を検討した。特定の修飾状態の HS 鎖と Wnt11 が有意に共局在することが判明した。また HS 鎖の修飾に関わる酵素である *ndst1* のノックダウンにより、

神経板での Vangl2 の膜局在が減少した。逆にコア PCP 因子のうち特定の組み合わせを神経板で過剰発現させることで、特定の修飾状態の HS 鎖が増加した。このように HSPG とコア PCP 因子の間にも相互に因果関係が存在することが示唆された。

さらに本研究での特筆すべき成果として、培養系で平面細胞極性を少なくとも部分的には再現できる系を構築したことが挙げられる。今後この系を利用して各種関連遺伝子の変異体株を作成するなどして、平面細胞極性を「作って」理解するという新たな研究手法を確立、発展させていきたい。

また本研究での中心的課題の一つである平面細胞極性の可視化に関連した共同研究 (Hirano et al., *Development* 2022) および、リン酸化 Vangl2 に関連した共同研究 (Feng et al., *Sci. Adv.* 2021) をおこなった。また分泌性蛋白質の新規制御技術 (Matsuda et al., *Nat. Commun.* 2021) および光遺伝学的な細胞骨格の操作技術 (Yamamoto et al., *Nat. Commun.* 2021) に関連して共同研究をおこなった。

(2) 詳細

1. Wnt が細胞内の非対称性をもたらすメカニズムおよびコア PCP 因子による Wnt11 の局在性の制御

本研究では、Wnt11 が如何にして平面細胞極性(PCP)を制御するかを解明することを目標としている。Wnt11 は従来いわゆるモルフォゲンとして濃度勾配を作ることで、平面細胞極性を制御すると考えられてきた。しかし我々がアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 初期胚で Wnt11 蛋白質の可視化をおこなったところ、必ずしも濃度勾配ではない局在性が明らかになってきた。特に Wnt11 の局在性が平面細胞極性に関わる因子やヘパラン硫酸鎖などによって局所的に制御されるというこれまでの私の独自の発見に基づき、Wnt11 の局在性の制御の詳細について解析をおこなった。

まず、神経板で見られる内在性の Wnt11 の分布はコア PCP 因子の分布に類似した偏った分布を示すが、「分泌性蛋白質の細胞外分布は細胞表面の足場分子に依存する」(Mii et al., *eLife* 2021) ことを考えるとコア PCP 因子が Wnt11 の足場形成に関わっている可能性が考えられる。そこで、コア PCP 因子の一つ *vangl2* のノックダウンをおこなったところ、Wnt11 の局在が失われた。また、Wnt11 蛋白質の局在やヘパラン硫酸(HS)鎖の局在について、方向性の定量化の手法について検討した結果、定量的な評価が可能になった。さらに Vangl2 のリン酸化修飾に注目し、他のコア PCP 因子との局在性を超解像イメージングも用いて解析をおこなった。リン酸化 Vangl2 を認識する特異抗体による免疫染色で可視化し、これまで PCP の readout として用いてきた GFP-Pk3 との位置関係を超解像イメージング手法の一つである SRRF 法で解析したところ、リン酸化 Vangl2 は GFP-Pk3 の反対側の細胞膜に多く局在していることが示唆された。この結果には Vangl は Pk と同じ側の細胞膜上に局在するという従来の知見に反する部分があるが、Vangl2 のリン酸化がコア PCP 因子のトポロジー(同じ側の膜か向かいの細胞側の膜か)を制御するスイッチとして機能している可能性があるのではと考え、注目している。

さらに Vangl2 のリン酸化が起こらない変異体(11A 変異体:Ser/Thr を Ala で置換)とリン酸

化を模倣する変異体(11D 変異体: Ser/Thr を Asp で置換)を作成し、*Xenopus* 胚のアニマルキャップ領域で過剰発現させると両者とも、野生型 Vangl2 と同じく内在性の Fz7 蛋白質の増加を引き起こした。これは Wnt11 がほとんど存在しないときの現象と考えられる。これに対する Wnt11 の作用を割球打ち分け実験で解析した。Vangl2-11D と Fz7 の同一膜上の複合体(シス複合体)は Wnt11 存在下で安定かつ Wnt11 の足場となり得る一方、Vangl2-11A と Fz7 のシス複合体は Wnt11 存在下では膜上で安定ではなく、大部分 Wnt11 と共に細胞内へ取り込まれることが示唆された。また Vangl2-11D と Fz7 のシス複合体上に局在化する Wnt11 は細胞間隙を挟んで隣接細胞膜上の Vangl2 と共局在することが観察された。これらより、Wnt11 が細胞間隙を挟んで非対称な複合体を形成することが考えられる。以上の知見をもとに、基生研の小山宏史博士らと Wnt による PCP 形成の数理モデルの構築に取り組んでおり、これらの成果を含む論文を準備中である。

2. Wnt11 および PCP の制御におけるヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) の関与

別の観点から、Wnt11 の局在性やコア PCP 因子の局在性への HS 鎖・HS プロテオグリカン (HSPG) の関与を検討した。内在性の Wnt11 は *Xenopus* 神経板において、左右方向の細胞辺に偏った分布を示す(図 1 参照)。これまでに私は主に canonical Wnt シグナルに関与する Wnt8 の分布が N-sulfo 修飾を受けたヘパラン硫酸のクラスター構造で制御されることを見出してきたが(Mii et al., Nat. Commun. 2017)、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) については例えば glypican4 変異体がコア PCP 因子の変異体に類似した表現型を示すこと、更に wnt11 と遺伝学的相互作用を示すことなどが知られており、主に HSPG の関与について、解析を進めた(Wnt と HSPG については総説 Mii & Takada, Front. Cell Dev. Biol. 2020, Mii, Trends Glycosci. Glycotechnol. 2020 も参照)。

これまで、N-acetyl、N-sulfo HS に注目してきたが、同一部位の修飾には deacetyl 化も存在する。そこでこれらの修飾状態を特異的に認識するモノクローナル抗体 3 種類を用いて、神経板での分布を検討すると deacetyl および N-sulfo HS は左右方向の細胞辺に顕著な局在を示し、Wnt11 との関係が示唆された。そこで過剰発現させた Wnt11-EGFP とこれらの HS の共局在を検討すると、Wnt11-EGFP と N-acetyl HS はほとんど共局在しない一方、deacetyl HS とはよく重なり、N-sulfo HS とも部分的に共局在が見られた。さらに deacetyl 化と N-sulfo 化に必要な酵素である NDST1 をモルフオリノオリゴ(MO)でノックダウンすると体軸の伸長や神経板の閉鎖が阻害された。これは noncanonical Wnt シグナルやコア PCP 因子の阻害において共通して見られる表現型である。

一方、コア PCP 因子と HS 鎖の関係を解析するため、アニマルキャップに GFP-Pk3、Vangl2、および Wnt11 を過剰発現させて極性化を引き起こす実験系において、GFP-Pk3 と HS の分布を検討した。その結果、神経胚(st.14)では Wnt11 無しで、GFP-Pk3 の分布が偏らないときは、deacetyl HS も一様に分布していたが、Wnt11 を過剰発現させて、GFP-Pk3 が強く偏るときには、deacetyl HS も GFP-Pk3 と一致して偏った分布を示した。より初期(st.10)においても GFP-Pk3 と deacetyl HS とはドット単位で重なるものの、N-sulfo HS とは相互排他的な分布を示した。このことから deacetyl HS と N-sulfo HS は Wnt11 やコア PCP 因子と相互に影響を及ぼしながら、自己組織化的にそれぞれの局在パターンを形成すると考えられ、

deacetyl HS と N-sulfo HS は何かしら相反する性質があると考えられる。

更に *ndst1* のノックダウンにより、神経板での Vangl2 の膜局在が減少した。逆にコア PCP 因子のうち特定の組み合わせを神経板で過剰発現させることで、特定の修飾状態の HS 鎖が増加した。このように HSPG とコア PCP 因子の間にも相互に因果関係が存在することが示唆された。現在以上の結果をまとめた論文を準備中である。

3. 培養系での平面細胞極性の再構成

本さがけ研究の特筆すべき成果として、培養系で平面細胞極性を少なくとも部分的には再現できる系を構築したことが挙げられる。まだ実験系の検証自体が不十分ではあるが、今後この系を利用して各種関連遺伝子の変異体株を作成するなどして、平面細胞極性を「作って」理解するという新たな研究手法を確立、発展させていきたい。

3. 今後の展開

本さがけ研究での成果から従来は静的かつ均一と考えられてきた ECM の一つである HSPG が Wnt や PCP の影響を受けながら非常にダイナミックに局在性を変化させていることが判明し、今後そのダイナミクスについての解析を進めたいと考えている。

また本研究で幸運にも端緒をつかむことができた培養系での PCP の再構成について、今後発展的な解析を行いたいと考えている。特に従来の *in vivo* 系では困難な実験(例えば細胞接着を阻害して上皮構造が維持されない条件など)により、細胞の方向性の基盤を解析していきたい。

更にオルガノイド系や幹細胞系でも同様の PCP の再構成系が導入できるか、今後解析していきたい。

4. 自己評価

本さがけ研究で設定した三つの目的の達成状況については、1. Wnt が 1 細胞内の非対称性をもたらすメカニズムと 2. Wnt の足場形成における HSPG の関与については実験をさらに進める必要はまだあるものの、概ね当初計画していた範囲での解析に目処が付き、論文投稿に向けて準備を進めている。とくに 2 については大学院生を指導しながら進めることができ、指導者としての経験を積むことができた。3. 培養系での PCP の再構成については多細胞領域のさがけ研究者の大谷哲久博士との共同研究により、幸運にも当初計画していた以上にスムーズに再構成系を構築することができた。この部分に関しては論文化にはまだ時間がかかるものの将来的にオルガノイド系や再生医療への波及効果があると期待している。

本さがけ研究での成果により、自身の研究者としての認知度が向上し、招待講演が増えるなど研究者としての飛躍につながったと感じている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 6件

1. Yusuke Mii, Kenichi Nakazato, Chan-Gi Pack, Takafumi Ikeda, Yasushi Sako, Atsushi Mochizuki, Masanori Taira, Shinji Takada “Quantitative analyses reveal extracellular dynamics of Wnt ligands in *Xenopus* embryos” *eLife* 10:e55108 (2021)

ツメガエル胚において膜結合型の抗 HA 抗体で HA タグのついた分泌型 GFP(人工リガンド)をトラップする実験を行い、分泌性蛋白質の細胞外分布には足場分子への結合が必要十分であると示した。また蛍光相関分光法など定量手法を用いて Wnt8 蛋白質の動態を解析し、自由拡散成分は存在するがほとんど分布に寄与しないことを示した。さらに分泌性蛋白質の動態と分布を記述するシンプルかつ一般性のある数理モデルを構築した。

2. Shinya Matsuda*, Jonas V. Schaefer, Yusuke Mii, Yutaro Hori, Dimitri Bieli, Masanori Taira, Andreas Plückthun, Markus Affolter*
Asymmetric requirement of Dpp/BMP morphogen dispersal in the *Drosophila* wing disc
Nature Communications 12:6435 (2021)

三井が中心となって作成した HA タグに対する一本鎖抗体をバーゼル大学の松田博士らに提供し、代表的なモルフォゲンの一つである Dpp の局在性を人為的に操作した。

(2)特許出願

該当なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

平面細胞極性因子群による Wnt 蛋白質の空間パターンの制御

三井 優輔

第 93 回 日本動物学会早稲田大会 2022 年 9 月 8 日

Wnt11 とコア PCP 因子の相互的制御による平面細胞極性(PCP)の形成

三井 優輔

第 44 回日本分子生物学会年会 2021 年 12 月

受賞

自然科学研究機構若手研究者賞、自然科学研究機構 2022 年 7 月

基礎生物学研究所若手研究者賞(第 1 位)、基礎生物学研究所 2021 年 12 月

プレスリリース

動く分子と動かない分子が協調して、安定した位置情報を素早く作り出す 2021 年 6 月 4 日

自然科学研究機構 基礎生物学研究所, 自然科学研究機構 生命創成探究センター、

中央大学、京都大学、理化学研究所

<https://www.nibb.ac.jp/press/2021/06/04.html>