

ニワトリ胚の四肢形成における Wnt-Frizzled 相互作用

笹岡 俊輔

LRP-5とLRP-6とともに10種類のFrizzled(Fz)がWntのレセプターとして知られているが、リガンドとレセプターの関係はWntタンパク質が直接的な結合実験が困難なため、あまりわかっていない。ニワトリ肢芽で特定のパターンをもって発現するニワトリWnt-3a, Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-6, Wnt-7a, Wnt-10a, Wnt-11のWntメンバーにC末端にHAのタグをつけ、ニワトリFz-4, Fz-10にはレセプターの細胞内にFLAGのタグをつけDF-1細胞で発現させた。DF-1細胞に単独もしくは共存下で導入したWnt-HAとFz-FLAGのコンストラクトを発現させ、直接結合するWnt-HAを調べるために、anti-FLAG抗体でレセプターの免疫沈降を行う前後でウエスタンブロッティングを行った。Wnt-HAが発現しているDF-1細胞の上清をFz-FLAGを発現させた細胞に加えた時、Fz-10に対してWnt-3a, Wnt-5a, Wnt-7aが、Fz-4に対してはWnt-5aが検出された。Fz-10ではWnt-6とWnt-10aに弱い結合がみられた。少量のWnt-7aはWnt-5aとの比較においてFz-10との結合効率はよく、Wnt-7aに対して高い親和性がみられた。Wnt-7aは時間的、空間的に肢芽においてFz-4ではなくFz-10と共に発現している。これらの結果は、四肢の形態形成におけるWntとFzの発現と機能的な関係を現している。

(平成18年4月12日受理)

Wnt-Frizzled Interaction Involved in Chick Limb Development

Shunsuke SASAOKA

In combination with LRP-5 and LRP-6, ten members of the Frizzled (Fz) family are known to function as Wnt receptors. However the relationship of the receptors to ligands is poorly understood, partly because of the difficulty in obtaining active Wnt proteins for a direct binding assay. Several Wnt members, including chicken Wnt-3a, Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-6, Wnt-7a, Wnt-10a, and Wnt-11, which are expressed with specific patterns in the chick limb bud are expressed in DF-1 cells after HA-tagging to the C-terminal end. On the other hands chicken Fz-4 and Fz-10 are expressed after FLAG-tagging to the intracellular region of the receptors. Expression constructs for WntHA and FzFLAG are transfected in DF-1 cells, either independently or in combination, and the Western blot assay was performed to detect receptor binding of WntHA before and after immunoprecipitation of the receptor with anti-FLAG antibody. When the conditioned medium of DF-1 expressing WntHA was added to cells expressing FzFLAG, Wnt binding was detected in the following combinations: Wnt-3a, Wnt-5a, and Wnt-7a for Fz-10,

and Wnt-5a for Fz-4. Weak binding was also detected in Wnt-6 and Wnt-10a for Fz-10. A smaller amount of Wnt-7a showed efficient binding to Fz-10, compared with Wnt-5a, implicating highest affinity to be to Wnt-7a. Since Wnt-7a is temporally and spatially co-expressed in the limb bud with Fz-10, but not with Fz-4, these results provide evidence indicating functional interaction between Wnt and Fz members, eventually leading to morphogenetic events during limb development. (Accepted on April 12, 2006) *Kawasaki Medical Journal* 32(3): 127-137, 2006

Key Words ① Wnt-7a ② Wnt-5a ③ Frizzled-4
④ Frizzled-10 ⑤ limb development

はじめに

ニワトリ胚の肢芽形成は受精後2.5日胚から始まり、肢芽は側版中胚葉由来の間充織とそれを覆う外胚葉によって構成され、発生に伴って伸長する。胚発生に伴う形態形成では分泌性シグナル分子を介した相互作用が細胞間のコミュニケーションの一つの方法として使われ、特に Hedgehog ファミリー¹⁾、BMP ファミリー²⁾、FGF ファミリー³⁾、Wnt ファミリー⁴⁾は器官形成過程での細胞増殖、細胞分化に関与し、胚発生のさまざまな段階で時間的、位置的に特異的に発現し、重要な役割を担っている。中でも Wnt ファミリーは発生初期における体節・体軸形成や器官形成だけでなく、出生後の細胞の増殖、分化も制御していることが知られている⁵⁾。

Wnt ファミリーは脊椎動物において19種類が同定され、そのうちニワトリ肢芽では Wnt-3a, Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-6, Wnt-7a, Wnt-10a, Wnt-11の領域特異的な発現が報告されている^{6)~11)}。また Wnt が結合する細胞膜受容体は1回膜貫通型の受容体 LRP-5/6 と7回膜貫通型の受容体 Frizzled (Fz) が複合体を構成しているが、Fz には10種類のメンバーが知られており、このなかで Fz-2, Fz-3, Fz-4, Fz-6, Fz-8, Fz-10はニワトリ胚の肢芽で発現がみられる¹⁴⁾。これら細胞膜受容体に結合した後に、細胞内でその情報を核へ伝達させる経路として、標準経路のβカテニン経路、および非標準経路として PCP (planar cell polarity, 平面内細胞極性) 経路、Ca²⁺ 経路の少なくとも3種類があると

言われている^{15),16)}。細胞外に分泌された Wnt タンパク質は細胞表面や細胞外マトリックスに結合する傾向が強く、これまで生理活性を持つ Wnt タンパク質として単離、精製することが困難で、Wnt-3a, Wnt-5a など一部の Wnt で成功しているにすぎない^{17),18)}。またシグナルの細胞内伝達経路としてβカテニンがかかわる経路以外に複数あって、応答が多岐にわたっていること、さらに受容体を構成する因子も Fz と LRP だけでなく、複数の膜タンパクやヘパラン硫酸糖タンパクなどが構成要素として関与し、Fz タンパク以外の因子によって大きく影響されることなどのため、どの Wnt と Fz が特異的に結合して主に3種類ある経路のうちどれが活性化されるかについては一部の例を除き判明していない^{19)~21)}。今回筆者はこれまでの報告から Wnt-5a と Fz-4 が遠位の間充織と外胚葉性頂堤に発現が重複している点と、Wnt-7a と Fz-10が後側の特に背側の外胚葉で発現が重複している点に注目し、これらの相互関係をニワトリ肢芽で発現している Wnt-3a, Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-6, Wnt-7a, Wnt-10a, Wnt-11の C 末端側に hemagglutinin (HA) エピトープのタグをいれ、一方 Fz-4, Fz-10には FLAG のエピトープのタグをいれた cDNA を作成し、免疫沈降法を用いたウエスタンブロットによって相互関係を調べた。この研究から、生体内での Wnt と Fz の相互作用についての基礎的情報が得られ、それは Wnt ファミリーの作用を解明するのに重要である。

実験材料と方法

1. ニワトリ受精卵とプローブ

発生ステージは Hamburger and Hamilton²²⁾ に従った。発現パターンは whole-mount in situ hybridization および切片での in situ hybridization で調べた。Probe にはニワトリ Wnt-5a⁶⁾, Wnt-7a⁶⁾, Fz-4¹³⁾, Fz-10¹²⁾ の鋳型 cDNA から cRNA を合成して用いた。

2. 遺伝子発現の検出

ニワトリ胚を 4% paraformaldehyde を含む phosphate-buffered saline (PBS) で 4℃ 一晩固定し、0.1% Tween 20 を含む PBS (PBT) に置換した後、順次 25% ethanol/PBT, 50% ethanol/PBT, 75% ethanol/PBT, 100% ethanol で処理し、最終的に 100% ethanol 中で -20℃ で保存した。

Whole-mount in situ hybridization は定法^{23), 24)} に従って行った。前処理後、68℃ の pre-hybridization mix (組成：50% formamide, 5 × SSC, pH 7.0, 50 μg/ml tRNA, 1% SDS, 50 μg/ml heparin) に置換し、1 時間処理した後、digoxigenin (DIG)-labeled RNA probe (0.5 μg) を含む pre-hybridization mix 溶液に置換し、68℃ で一晩 hybridization を行った。Probe は T7, T3, または SP6 RNA polymerase で、37℃ で 2 時間反応して合成し、DIG 標識 RNA は必要に応じて限定的アルカリ分解で断片化して用いた。

切片での発現は取り出した胚を 4% paraformaldehyde/PBS 溶液で固定し、脱水、再水化後にパラフィン包埋し、厚さ 7 μm で切片を作製した。

3. プラスミドの構築

HA のタグがついたマウス Wnt-3a (mWnt-3aHA; Upstate Biotechnology) を制限酵素にて消化し pUSEamp から ENTR11 へ BamHI, XbaI の部位でつなげてベクターを入れ換えた。次にニワトリ Wnt-3a⁹⁾, Wnt-4⁸⁾, Wnt-5a⁹⁾, Wnt-7a⁶⁾,

Wnt-10a⁷⁾, Wnt-11⁸⁾ の cDNA を鋳型に用いてコーディング配列のみを PCR で増幅し、制限酵素で消化したのち長い断片を回収した。Wnt-6 は報告された配列¹⁰⁾ に基づいてプライマー (sense, 5'-GAGATGCAGAGGCTGAGCTCCTG-3'; antisense, 5'-CGAATTCATGGACCCCAACAGCATCT-3') で cDNA を増幅し、pCR4B-lunt-TOPO (Invitrogen) にクローニングし、塩基配列を決定して確認した。PCR 後の制限酵素処理で回収した断片をそれぞれ mWnt-3aHA につなげて、ニワトリ Wnt-3aHA, Wnt-4HA, Wnt-5aHA, Wnt-6HA, Wnt-7aHA, Wnt-10aHA, Wnt-11HA を作成した。Fz-4 へは PCR にて (sense, 5'-ATGGCCTGGCCGGGCACACACAGGGCCGAGCA-3'; antisense, 5'-TTATACCACAGTCTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCCCTGTTGCCTTTTCTGGCT-3') FLAG のタグを C 末端部に 3 アミノ酸を残し装着し、Fz-10 へは同様にして (sense, 5'-CACCATGGGCCAGCCGCAGGGAACC-3'; antisense, 5'-TTCATACACAGGTCTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCCGGTGGTTGTAATGTGGATT) C 末端部に 3 アミノ酸を残して FLAG のタグを装着した。これらのエンタークローンは最終的に pcDNA3.2DEST へ LR 反応で入れ換えた (Promega)。

4. DF-1細胞, CEF 細胞

タンパク質の回収および免疫沈降実験にはニワトリ線維芽細胞由来の DF-1細胞 (ATCC; # CRL-12203) を用いた。またレポーターアッセイには日生研より購入した SPF (specific pathogen-free) 受精卵 (10日胚) の背部の結合織から調製した CEF (chicken embryonic fibroblast) を用いた。

5. レポーターアッセイ

TOPFLASH と FOPFLASH のレポータープラスミド²⁴⁾ をそれぞれ 0.5 μg マウス Wnt-3aHA 0.1 μg, ニワトリ Wnt-5aHA 0.1 μg, Wnt-7aHA 0.1 μg, Wnt-11HA 0.1 μg と同時に CEF

に Lipofectin (Invitrogen) にてトランスフェクションし、24時間後 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) にて測定した。トランスフェクションの効率をみるためにウミシイタケルシフェラーゼコントロールレポータープラスミドを同時に用いた。

6. タンパク質の回収

ニワトリ線維芽細胞由来の DF-1細胞株を6穴プレートに 2×10^5 cells/well で播き込む。培地は2%ウシ胎児血清 (FBS; Irvine Scientific) および1%のニワトリ血清 (CS; GIBCO) を含む Dulbecco 改変最小培地 (D-MEM) を使用した。ニワトリ Wnt-3aHA, Wnt-4HA, Wnt-5aHA, Wnt-6HA, Wnt-7aHA, Wnt-10aHA, Wnt-11HA, マウス Wnt-3aHA, Wnt-8HA と FLAG のタグを付けた Fz-4 または Fz-10 をそれぞれ $1 \mu\text{g}$, Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて細胞へ同時導入し、37°C で培養する。24時間後に培地を捨て、PBS で洗浄し、PBS を加え cell scraper にて掻き採り細胞を回収する。10,000 rpm で15分間遠心後、Protease Inhibitor Cocktail Tablet (Complete; Roche) を溶解した RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate: SDS) $70 \mu\text{l}$ を加え、超音波細胞粉砕装置を用いて氷冷下で超音波処理を行う。10,000 rpm, 15分間4°C で遠心後上清を回収し、Bradford 法²⁵⁾ でタンパク濃度を測定し、濃度を揃えた。

7. ウエスタンブロッティング

調製した上記タンパク質試料に Sample Buffer (NEB) を加え90°C で2分間処理したのち、dithiothreitol (DTT) を加えて SDS を含むポリアクリルアミドゲル (5~20%グラディエントゲル) で電気泳動し、polyvinylidene fluoride (PVDF) メンブレンへ電氣的に転写した。TBST (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% Tween 20) 中に2.5%スキムミル

ク、0.5% BSA を含むブロッキング溶液で処理した後、ブロッキング溶液で3,000倍希釈した HA, FLAG に対する一次抗体液で4°C一晩反応する。ブロッキング溶液で3回洗浄した後、HA では peroxidase で標識した anti-rat IgG 抗体を、FLAG では anti-mouse IgG 抗体をブロッキング溶液で20,000倍希釈した反応液中で1時間、室温で反応させる。その後 TBST で洗浄し、化学発光基質 (ECL +; Amersham) を用いて検出した。

8. 免疫沈降法

回収したタンパク質試料に anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma) を加え、lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100) で全量を $500 \mu\text{l}$ にした後、2時間震盪する。10,000 rpm, 4°C で5秒間遠心し、TBS (Tween 20 を含まない TBST) で3回洗浄した。Sample Buffer を加え加熱処理したのち10,000 rpm で5秒間遠心し、上清をゲル電気泳動し、ウエスタンブロッティングを行った。

結 果

1. ニワトリ胚の肢芽における Wnt-5a, Wnt-7a, Fz-4, Fz-10 の発現パターン

ニワトリ胚の肢芽における Wnt-5a, Wnt-7a, Fz-4, Fz-10 の mRNA 発現領域を whole-mount in situ hybridization および section in situ hybridization により調べた。これまでの報告と同様に、ステージ21~26の肢芽において、Wnt-5a は先端部の中胚葉と頂堤で強い発現シグナルが認められ (Fig. 1A, B), Wnt-7a は背側の外胚葉でのみ発現が見られる (Fig. 1E, F)。これらに対応した領域で発現している Fz ファミリーとしては Fz-4 と Fz-10 がある。このうち、Fz-4 は肢芽の内部では間充細胞が凝集している部位と軟骨原基を取り囲む部位、および先端部の中胚葉と頂堤で強く発現していた (Fig. 1C, D)。Wnt-7a が背側外胚葉で発現しているのに対応

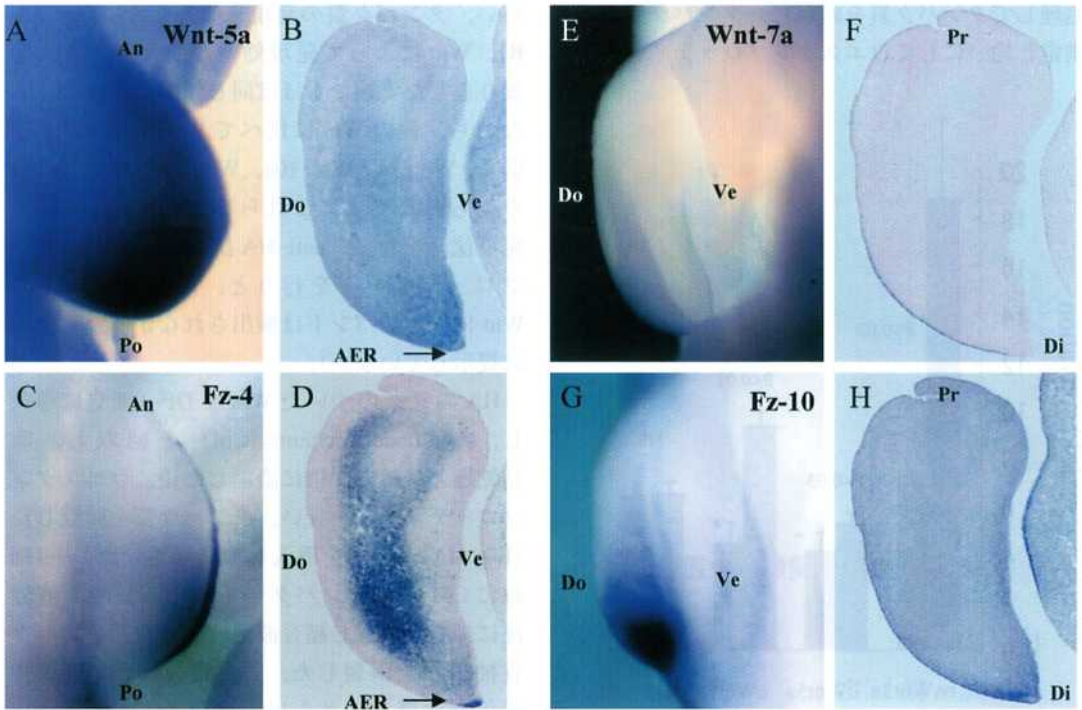


Fig. 1. ニワトリ肢芽における Wnt-5a, Fz-4, Wnt-7a, Fz-10 の発現パターン (A, C, E, G) ステージ21胚の whole-mount in situ hybridization 像. (B, D, F, H) ステージ26胚の section in situ hybridization とその後の Nuclear fast red 染色像 (×20). (A, C) 背側像, (E, G) 先端像, (B, D, F, H) 水平断. 略号: An, anterior; Di, distal; Do, dorsal; Po, posterior; Pr, proximal; Ve, ventral.

して (Fig. 1E, F), Fz-10は背側の外胚葉, および直下の中胚葉で発現が見られ (Fig. 1G, H), そのシグナルは肢芽の後部側でより強い. このように, Wnt-5a と Fz-4 では遠位の間充織と外胚葉性頂提で発現がオーバーラップしており, Wnt-7a と Fz-10 では背側外胚葉で発現のオーバーラップが認められた. これらのことから, ニワトリ肢芽において Wnt-5a と Fz-4, Wnt-7a と Fz-10 はそれぞれお互いに結合し, シグナルを伝えていることが考えられるため, 主にこれらの相互作用について調べる実験を以下のように行った.

2. 使用した Wnt-HA の活性の確認

マウス Wnt-3aHA と同様に, ここで作成したタグ付きニワトリ Wnt ファミリーの生物活性を確認するため, ルシフェラーゼレポーターアッセイを行うと, Figure 2 のような結果に

なった. CEF で活性を測定する限り Wnt-7aHA はカテンン経路を有意に活性化し, ニワトリ Wnt-5aHA も TOP/FOP で弱いながらも有意差が見られる. 一方, Wnt-11HA は主に JNK 経路を介して作用しているため, カテンン経路を活性化しないことが知られている²¹⁾. ここでのレポーターアッセイでも活性化は認められなかった. このように, Wnt-11HA を除いて, C 末端側に HA タグを付けた Wnt ファミリーは生物学的活性が保持されていることが確認された.

3. ニワトリ肢芽で発現する Wnt ファミリーと Fz-4 との相互関係

DF-1 細胞を用いて, HA のタグをつけた Wnt ファミリーの cDNA と FLAG のタグをつけた Fz-4 の cDNA を同時に導入し, 強制発現させた. 24 時間後に細胞を回収した後, 超音波

処理してタンパク質を回収し、タンパク濃度を測定し均一にしてウエスタンブロッティングを

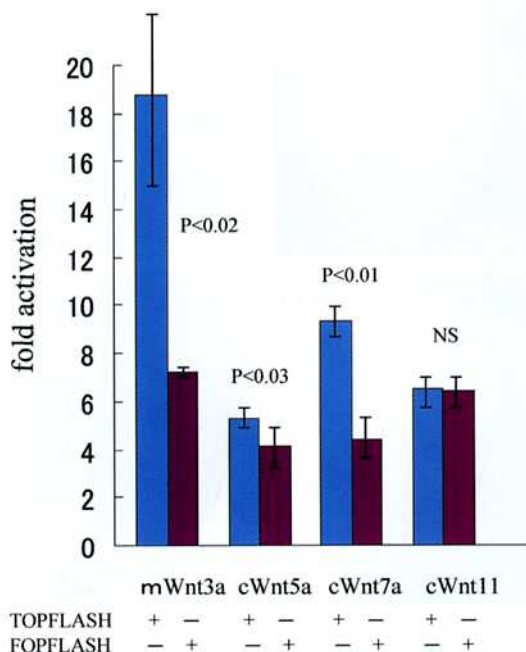


Fig. 2. HA タグをつけた Wnt-5a, Wnt-7a のレポーターアッセイ

ウミシイタケのルシフェラーゼ活性に対する相対値を 3 well の平均と偏差で示す。Wnt-3aHA, Wnt-5aHA, Wnt-7a HA は TOPFLASH と FOPFLASH 間で有意差を認め、Wnt-11HA では有意差なし (Student's t-test)。NS, not significant.

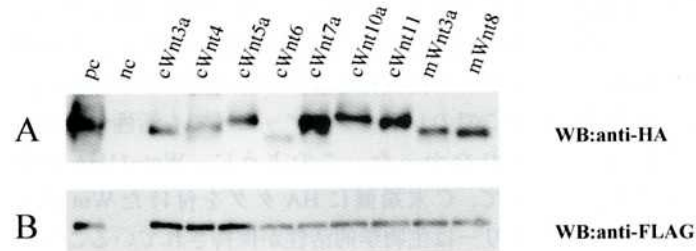


Fig. 3. DF-1細胞に導入後の Wnt タンパクの確認

DF-1細胞に各々ニワトリ Wnt-3aHA, Wnt-4HA, Wnt-5aHA, Wnt-6HA, Wnt-7aHA, Wnt-10aHA, Wnt-11HA, マウス Wnt-3aHA, Wnt-8HA と Fz-4FLAG を共導入し、それぞれの抽出タンパク質をゲル電気泳動したのち PVDF メンブレンへブロッティング (WB) した。このメンブレンを用いて anti-HA 抗体および anti-FLAG 抗体で酵素抗体法により検出した。(A) ウエスタンブロッティング (WB) 後 anti-HA 抗体での検出。(B) ウエスタンブロッティング後 anti-FLAG 抗体での検出。Wnt-4HA と Fz-4 を同時発現した細胞の抽出タンパク質を positive control (pc) に、pcDNA3.2DEST / GFP を発現した細胞の抽出タンパク質を negative control (nc) に用いた。

行い、タンパク質の発現を確認した (Fig. 3A, B)。Wnt によって発現効率が異なり、これを繰り返した実験でもほぼ同じ傾向があった。すなわち、他の Wnt に比べて Wnt-6 のバンドは弱く、Wnt-7a, Wnt-10a, Wnt-11 のバンドは強く見られた。次にこれらを anti-FLAG 抗体で免疫沈降を行い、anti-HA 抗体にてウエスタンブロッティングを行うと、用いたすべての Wnt についてバンドは検出されなかった (結果は提示していない)。

HA のタグのついた Wnt を DF-1細胞に導入し、conditioned medium (CM) を回収し、凍結乾燥と透析で10倍に濃縮した後、ウエスタンブロッティングを行い、タンパク質を確認した (Fig. 4A)。Fz-4を導入して発現させた DF-1細胞に CM 中のタンパク質を加え、24時間培養後に細胞を回収し超音波処理した後、タンパク質抽出物を調製した。これを anti-FLAG 抗体で免疫沈降し、さらに anti-FLAG 抗体または anti-HA 抗体にてウエスタンブロッティングを行った。Anti-FLAG 抗体で検出したタンパク質はほぼ均一であったが、Wnt-5a のみ anti-HA 抗体でバンドを認めた (Fig. 4C)。このように、Fz-4では Wnt-5a との結合が確認されたのみで、繰り返し行った数回の実験でも調べた他の Wnt との結合は全く見られなかった。

4. ニワトリ肢芽に発現する Wnt ファミリーと Fz-10 との相互関係

次に Wnt ファミリーと Fz-10 について相互関係を調べた。DF-1細胞に同時に Wnt ファミリーと Fz-10 を導入し強制発現させ、24時間後細胞を回収しウエスタンブロッティングを行い、タンパク質を確認した (Fig. 5A, B)。次にこれらを anti-FLAG 抗体で免疫沈降を行い、ウエスタンブロッティングを

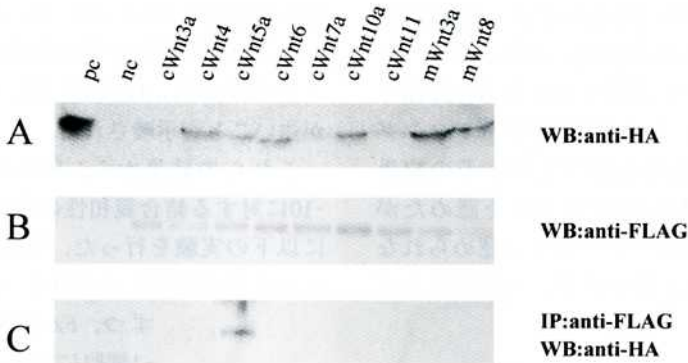


Fig. 4. WntファミリーとFz-4との相互関係

DF-1細胞に各々ニワトリ Wnt-3aHA, Wnt-4HA, Wnt-5aHA, Wnt-6HA, Wnt-7aHA, Wnt-10aHA, Wnt-11HA, マウス Wnt-3aHA, Wnt-8HA を導入し Wnt タンパク質が分泌された CM を回収し, 次に Fz-4 を発現させた DF-1 細胞にこの CM を加え, タンパク質試料を調製した. その試料を anti-FLAG 抗体で免疫沈降 (IP) し, それぞれの抽出タンパク質をゲル電気泳動したのち PVDF メンブレンへブロッティング (WB) した. このメンブレンを用いて酵素抗体法により anti-HA 抗体および anti-FLAG 抗体で検出した. (A) CM に分泌された Wnt タンパク質. (B) 免疫沈降後 anti-FLAG 抗体で検出したタンパク質. (C) 免疫沈降後 anti-HA 抗体で検出したタンパク質. Positive control (pc) および negative control (nc) は Fig. 3 と同じ.

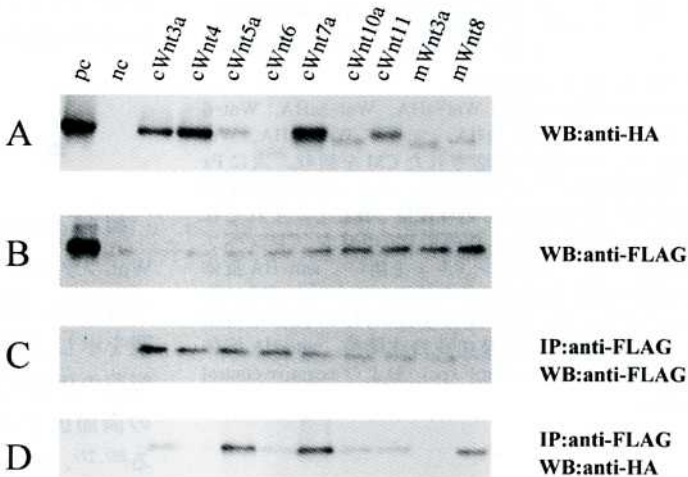


Fig. 5. WntファミリーとFz-10との共存下での相互関係

DF-1細胞に各々ニワトリ Wnt-3aHA, Wnt-4HA, Wnt-5aHA, Wnt-6HA, Wnt-7aHA, Wnt-10aHA, Wnt-11HA, マウス Wnt-3aHA, Wnt-8HA と Fz-10FLAG を共導入し, それぞれの抽出タンパク質をゲル電気泳動したのち PVDF メンブレンへブロッティング (WB) した. このメンブレンを用いて anti-HA 抗体および anti-FLAG 抗体で酵素抗体法により検出した. 次に回収した試料を anti-FLAG 抗体で免疫沈降 (IP) し, さらに anti-FLAG 抗体または anti-HA 抗体にてそれぞれの抽出タンパク質を PAGE したのち PVDF メンブレンへブロッティング (WB) した. このメンブレンを anti-HA 抗体 (C) および anti-FLAG 抗体 (D) を用い酵素抗体法にて検出した. (A) Wnt タンパク質. (B) ウェスタンブロッティング後 anti-FLAG 抗体での検出. (C) 免疫沈降後 anti-FLAG 抗体で検出したタンパク質. (D) anti-FLAG 抗体で免疫沈降後, anti-HA 抗体で検出したタンパク質. Wnt-4HA と Fz-10 を同時発現した細胞の抽出タンパク質を positive control (pc) に, pcDNA3.2 DEST / GFP を発現した細胞の抽出タンパク質を negative control (nc) に用いた.

行って anti-HA 抗体で検出した. Wnt-3a, Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-6, Wnt-7a, Wnt-10a, Wnt-11, マウス Wnt-8 でバンドが認められ,

特に Wnt-5a と Wnt-7a のバンドは強く見られ, 結合の強さが示唆された. また Wnt タンパク質が分泌された CM を 10 倍に濃縮し Fz

-10を発現させたDF-1細胞に加え、24時間培養後細胞を回収し超音波処理した後、タンパク質を回収した。その試料をanti-FLAG抗体で免疫沈降し、さらにウエスタンブロッティングを行ってanti-HA抗体で検出した。その結果Wnt-5a, Wnt-6, Wnt-7aにバンドを認めたが(Fig. 6C), 他のWntではバンドは認められなかった。Wnt-7aはCM中にタンパク質はわず

かしか分泌されていないが、それを加えた細胞のタンパク質試料で免疫沈降を行うと顕著なバンドがみられ、Fz-10に対してWnt-7aの結合が強いことが示唆された。

これらの結果から、Wnt-5aとWnt-7aのFz-10に対する結合親和性の違いを比較するために以下の実験を行った。Wnt-5a, Wnt-7aのタンパク質が発現したCMを5 μ l, 10 μ l, 20 μ l

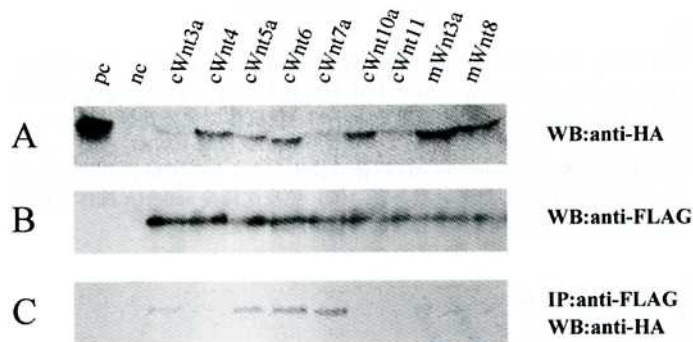


Fig. 6. WntファミリーとFz-10との相互関係

DF-1細胞に各々ニワトリWnt-3aHA, Wnt-4HA, Wnt-5aHA, Wnt-6HA, Wnt-7aHA, Wnt-10aHA, Wnt-11HA, マウスWnt-3aHA, Wnt-8HAを導入しWntタンパク質が分泌されたCMを回収。次にFz-10を発現させたDF-1細胞にこのCMを加え、タンパク質試料を調製した。その試料をanti-FLAG抗体で免疫沈降(IP)し、それぞれの抽出タンパク質をゲル電気泳動したのちPVDFメンブレンへブロッティング(WB)した。このメンブレンを用いてanti-HA抗体およびanti-FLAG抗体で酵素抗体法により検出した。(A) CMに分泌されたWntタンパク質。(B) 免疫沈降後anti-FLAG抗体で検出したタンパク質。(C) anti-FLAG抗体で免疫沈降後、anti-HA抗体で検出したタンパク質。Positive control (pc) および negative control (nc) はFig. 5と同じ。

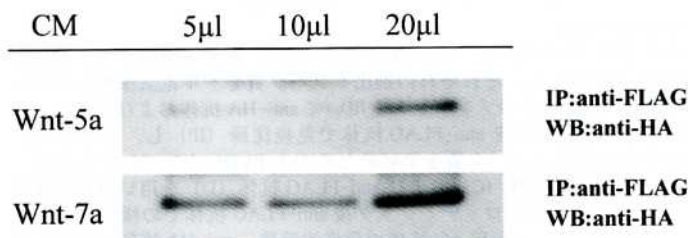


Fig. 7. Fz-10に対するWnt-5aとWnt-7aの結合親和性

DF-1細胞に各々ニワトリWnt-5aとWnt-7aを導入しWntタンパク質が分泌されたCMを回収。次にFz-10を発現させたDF-1細胞にこのCMをそれぞれ5 μ l, 10 μ l, 20 μ l加え、タンパク質試料を調製した。その試料をanti-FLAG抗体で免疫沈降(IP)し、それぞれの抽出タンパク質をゲル電気泳動したのちPVDFメンブレンへブロッティング(WB)した。このメンブレンを用いてanti-HA抗体およびanti-FLAG抗体で酵素抗体法により検出した。

ずつ、Fz-10を発現させたDF-1細胞に加え、細胞を回収してタンパク質を抽出した。それを免疫沈降した試料でウエスタンブロッティングを行った(Fig. 7)。Wnt-5aは濃度を減少させるとバンドの減衰が見られたが、Wnt-7aではバンドの減衰が見られず、Wnt-7aが優位にFz-10へ結合することが示された。

考 察

四肢の形態形成においてWntファミリーは胚発生の過程で時間的、位置的に特異的な発現を示し、形態形成の誘導因子、細胞の極性決定因子、増殖分化の調節因子として機能している^{26), 27)}。Wnt-5aは肢芽先端部の間充織と頂提で発現しており、間充織の増殖と伸長に影響し、遠近軸での軟骨パターン形成に関与していると考えられている⁹⁾。本研究の結果から肢芽先端部と頂提においてFz-4の発現はWnt-5aの発現と時間的、空間的にオーバーラップしていることが分かる。発生が進むとFz-4はステージ30では軟骨原基が形成される指の先端部で発現していることから、四肢

形成において指骨先端部の軟骨分化に関与していると考えられる。

一方、Fz-4は家族性滲出性硝子体網膜症 (FEVR) の原因遺伝子として知られており²⁸⁾、またそのリガンドはWntファミリーでなくてNorrinであることがXuら²⁹⁾によって報告されている。FEVRは網膜の不完全な血管新生による病態と考えられており、NorrinとFz-4のシグナルは β カテニン経路だけでなく非 β カテニン経路も作動させると言われている²⁹⁾。一方Wnt-5aは主に非 β カテニン経路を作動することが知られており³⁰⁾、またWnt-5aによってFz-4のエンドサイトーシスが促進されることが報告されている³¹⁾。ここで得られた結果からも、肢芽の発生において先端部で局所的に高濃度となったWnt-5aはFz-4に直接結合していることが考えられる。

Fz-10とWntファミリーの関係を調べた結果 (Fig. 5) から、Fz-10ではWnt-5a, Wnt-7aとの顕著な結合が認められた。WntファミリーのCMを回収し濃縮した試料をFz-10が発現したDF-1細胞に加えた結果ではWnt-5a, Wnt-6, Wnt-7aにバンドが認められた (Fig. 6C)。また結合親和性の違いを検討するためにWnt-5aとWnt-7aのタンパク質濃度を段階的に変化させてFz-10が発現DF-1細胞に加えた結果 (Fig. 7) から、Fz-10に対するWnt-7aの結合親和性はWnt-5aのものより高いと考えられる。さらに、Wnt-7aとFz-10は肢芽の共通した背側の外胚葉領域で発現が見られること¹³⁾ (Fig. 1E, F, G, H)、およびツメガエルのアニマルキャップを用いた検定系で、マーカー遺伝子の発現に対する相乗効果¹³⁾から、相互作用が考えられていた。以上の事実から、Wnt-7aはFz-10のリガンドであるという結論が得られる。

レポーターアッセイの結果から、Wnt-7aは β カテニン経路を作動すると考えられるが、活性はWnt-3aの方が強く、Wnt-3aのFz-10との結合はWnt-7aに比べて弱い。このことはWnt-3aがニワトリ肢芽で発現する時期と局在もFz-10とは異なっており、 β カテニン経路を

作動させてはいるがFz-10のリガンドとしては働いていないと考えられる。

またWntファミリーとFz-10の共存下でDF-1細胞に導入し、免疫沈降を行った結果 (Fig. 5D) では、ニワトリWnt-3a (シグナルペプチドの配列がなく、分泌されにくい型) ではバンドがみられFz-10と結合している可能性が考えられたが、逆にマウスWnt-3a (典型的なシグナル配列をもつ高分泌型) ではバンドを認めなかった。このことはニワトリWnt-3aとマウスWnt-3aの成熟部分の配列が一部異なっていること、すなわち糖鎖付加の部位がニワトリ型では1箇所多い^{13), 32)}のために、Fz-10との結合が異なっている可能性が考えられる。

Wnt-7aは背側の外胚葉に局限して背腹軸のパターン形成に関与しているが¹³⁾、これは β カテニンを介さない経路で働くと考えられている¹¹⁾。これまでにFz-10のリガンドの候補としてニワトリ肢芽では発現していないが、肺胞や肺の血管平滑筋で発現しているWnt-7b³³⁾が報告されている。Wnt-7bはLRP-5やFz-1とも結合して β カテニン経路を作動させており、構造の類似したWnt-7aもFz-10を介して β カテニン経路を作動する可能性が考えられる。

濃縮下でWntファミリーのCMを加えた結果 (Fig. 6C) においてWnt-6にもバンドが認められた。Wnt-6は外胚葉で発現し、一部にFz-10と局在の一致が見られる。Wnt-6は四肢などの筋肉形成の過程で筋芽細胞の移動と分化を調節している³⁴⁾。一方、Wnt-7aは成体で損傷後の筋肉で産生される筋分化を促進する因子であることが知られている³⁵⁾。ゆえに成体においてFz-10を介するWntシグナルは筋肉分化の調節に関与している可能性が考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、始終にわたり御指導を賜りました濃野勉助教授、実験を援助いただいた寺田久美子さん、内田恵美さん、畑田聡美さんに深謝いたします。また、この研究の一部はプロジェクト研究費

(15-103A, 16-101M, 17-101N) によって行われた。

参 考 文 献

- 1) Hammerschmidt M, Brook A, McMahon AP : The world according to hedgehog. *Trends Genet* 13 : 14 - 21, 1997
- 2) Hogan BL : Bone morphogenetic proteins : multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10 : 1580 - 1594, 1996
- 3) Martin GR : The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev* 12 : 1571 - 1586, 1998
- 4) Cadigan KM, Nusse R : Wnt signaling : a common theme in animal development. *Gene Dev* 11 : 3286 - 3305, 1997
- 5) Wodarz A, Nusse R : Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14 : 59 - 88, 1998
- 6) Dealy CN, Roth A, Ferrari D, Brawn AM, Kosher RA : Wnt-5a and Wnt-7a are expressed in the developing chick limb bud in a manner suggesting roles in pattern formation along the proximodistal and dorsoventral axes. *Mech Dev* 43 : 175 - 186, 1993
- 7) Narita T, Sasaoka S, Udagawa K, Ohyama T, Wada N, Nishimatsu S, Takada S, Nohno T : Wnt10a is involved in AER formation during chick limb development. *Dev Dyn* 233 : 282 - 287, 2005
- 8) Tanda N, Kawakami Y, Saito T, Noji S, Nohno T : Cloning and characterization of Wnt-4 and Wnt-11 cDNAs from chick embryo. *DNA Seq* 5 : 277 - 281, 1995
- 9) Kawakami Y, Wada N, Nishimatsu S, Ishikawa T, Noji S, Nohno T : Involvement of Wnt-5a in chondrogenic pattern formation in the chick limb bud. *Dev Growth Differ* 41 : 29 - 40, 1999
- 10) Geetha-Loganathan P, Nimmagadda S, Prols F, Patel K, Scall M, Huang R, Christ B : Ectodermal Wnt-6 promotes Myf5-dependent avian limb myogenesis. *Dev Biol* 288 : 221 - 233, 2005
- 11) Kengaku M, Capdevila J, Rodriguez-Esteban C, De La Pena J, Johnson RL, Belmonte JC, Tabin CJ : Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science* 280 : 1274 - 1277, 1998
- 12) Tanda N, Ohuchi H, Yoshioka H, Noji S, Nohno T : A chicken Wnt gene, Wnt11, is involved in dermal development. *Biochem Biophys Res Commun* 211 : 123 - 129, 1995
- 13) Kawakami Y, Wada N, Nishimatsu S, Nohno T : Involvement of Frizzled-10 in Wnt-7a signaling during chick limb development. *Dev Growth Differ* 42 : 561 - 569, 2000
- 14) Nohno T, Kawakami Y, Wada N, Komaguchi C, Nishimatsu S : Differential expression of the frizzled family involved in Wnt signaling during chick limb development. *Cell Mol Biol* 45 : 653 - 659, 1999
- 15) Nelson WJ, Nusse R : Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303 : 1483 - 1487, 2004
- 16) Logan CY, Nusse R : The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20 : 781 - 810, 2004
- 17) Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR, 3rd, Nusse R : Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 22 : 448 - 452, 2003
- 18) Austin TW, Solar GP, Ziegler FC, Liem L, Matthews W : A role for the Wnt gene family in hematopoiesis : expansion of multilineage progenitor cells. *Blood* 89 : 3624 - 3635, 1997
- 19) Gazit A, Yaniv A, Bafico A, Pramila T, Igarashi M, Kitajewski J, Aaronson SA : Human frizzled 1 interacts with transforming Wnts to transduce a TCF dependent transcriptional response. *Oncogene* 18 : 5959 - 5966, 1999
- 20) Sheldahl LC, Park M, Malbon CC, Moon RT : Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol* 9 : 695 - 698, 1999
- 21) Pandur P, Lasche M, Eisenberg LM, Kuhl M : Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signaling pathway is required for cardiogenesis. *Nature* 418 : 636 - 641, 2002

- 22) Hamburger V, Hamilton H : A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morph* 88 : 49-92, 1951
- 23) 山本康弘, 高田温行, 森口隆彦, 和田直之, 本間隆義, 濃野 勉 : 顎顔面形成に関与する Wnt ファミリーの発現パターン. *川崎医学会誌*31 : 97-105, 2005
- 24) Coughlin MP, Culbert AA, Cross DA, Corcoran SL, Yates JW, Pearce NJ, Rausch OL, Murphy GJ, Carter PS, Roxbee Cox L, Mills D, Brown MJ, Haigh D, Ward RW, Smith DG, Murray KJ, Reith AD, Holder JC : Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Cell Biol* 7 : 793-803, 2000
- 25) Bradford MM : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 : 248-254, 1976
- 26) 濃野 勉 : Wnt ファミリーと形態形成. *現代医療* 32 : 1912-1921, 2000
- 27) 濃野 勉 : 骨形成にかかわる Wnt シグナリング. *実験医学* 20 : 2569-2476, 2002
- 28) Robitaille J, MacDonald ML, Kaykas A, Sheldahl LC, Zeisler J, Dube MP, Zhang LH, Singaraja RR, Guernsey DL, Zheng B, Siebert LF, Hoskin-Mott A, Trese MT, Pimstone SN, Shastri BS, Moon RT, Hayden MR, Goldberg YP, Samuels ME : Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy. *Nat Genet* 32 : 326-330, 2002
- 29) Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, Smallwood PM, Williams J, Woods C, Kelley MW, Jiang L, Tasman W, Zhang K, Nathans J : Vascular development in the retina and inner ear : control by Norrin and Frizzled-4 a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* 116 : 883-895, 2004
- 30) 中村 勉, 秋山 徹 : Wnt シグナルネットワークの多彩な生理機能. *生化学* 77 : 5-19, 2005
- 31) Chen W, ten Berge D, Brown J, Ahn S, Hu LA, Miller WE, Caron MG, Barak LS, Nusse R, Lefkowitz RJ : Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt-5a-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science* 301 : 1338-1339, 2003
- 32) Roelink H, Nusse R : Expression of two members of the Wnt family during mouse development-restricted temporal and spatial patterns in the developing neural tube. *Genes Dev* 5 : 381-388, 1991
- 33) Wang Z, Shu W, Lu MM, Morrisey EE : Wnt7b activates canonical signaling in epithelial and vascular smooth muscle cells through interactions with Fzd1, Fzd10, and LRP5. *Mol Cell Biol* 25 : 5022-5030, 2005
- 34) Geetha-Loganathan P, Nimmagadda S, Prols F, Patel K, Scaal M, Huang R, Christ B : Ectodermal Wnt-6 promotes Myf5-dependent avian limb myogenesis. *Dev Biol* 288 : 221-233, 2005
- 35) Poleskaya A, Seale P, Rudnicki MA : Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell* 113 : 841-852, 2003