

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08262

研究課題名(和文) Wntシグナル伝達におけるWDR26を介した カテニンの分解機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of degradation mechanisms through WDR26 in Wnt signaling

研究代表者

後藤 利保 (GOTO, Toshiyasu)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：00517518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： Wntシグナル伝達は疾病や胚発生において重要な役割を担っており、細胞内でのβ-cateninのタンパク質量が鍵となる。本課題では、質量分析により、β-cateninの分解複合体であるAxinと結合するタンパク質として、酵母のGID関連遺伝子の1つであるWDR26を同定し、WDR26のβ-catenin分解時における分子機構を解析した。

その結果、WDR26はAxinを介して、β-cateninのユビキチン化を促進すること、他のGID関連遺伝子もβ-cateninをユビキチン化すること、WDR26を介したβ-cateninの分解時に新規のリジン残基がユビキチン化されることなどが明らかになった。

研究成果の概要(英文)： Wnt signaling pathway plays important roles in disease and embryonic development. Stability of cytoplasmic β-catenin is a key feature of Wnt signaling pathway.

In this study, I first identified WDR26 as an Axin-binding protein by MS analysis. Then I analyzed the function of WDR26 in the degradation of β-catenin of Wnt signaling pathway.

As results, I found that WDR 26 promoted β-catenin ubiquitination through binding with Axin, other GID-related genes also ubiquitinated and reduced β-catenin protein, novel lysine residues of were ubiquitinated during degradation of β-catenin.

研究分野：発生生物学

キーワード：WDR26 Wnt β-catenin ユビキチン化 シグナル伝達 アフリカツメガエル

## 1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナル伝達は組織の癌化や胚発生での遺伝子発現など多くの生命現象に関与しており、特に Wnt 標的遺伝子の発現に関与する Canonical 経路においては、 $\beta$ -catenin の細胞質内での安定化が必要である (Clevers, Cell, 127:469-480 2006)。細胞質中では Wnt シグナルによる DVL の活性化が  $\beta$ -catenin のリン酸化を防ぎ、APC/Axin/GSK3 $\beta$  複合体から  $\beta$ -catenin を解離することで、 $\beta$ -catenin はユビキチン化から免れ、分解が抑制される (Peifer and Polakis, Science, 287:1606-1609, 2000)。その後、 $\beta$ -catenin は核内に移行し、TCF 等の転写因子との共作用で Wnt 標的遺伝子を活性化する (Bienz and Clevers, Cell, 103:311-320, 2000)。APC/Axin/GSK3 複合体により、細胞質での  $\beta$ -catenin が分解されるが、分子量の大きい Axin や APC は足場タンパク質として、多くのタンパク質と結合する。したがって、 $\beta$ -catenin の分解に関与する未知の結合タンパク質も存在することが考えられた。Wnt シグナル伝達機構において、 $\beta$ -catenin の分解機構の解明を目指し、質量分析解析を行った結果、Axin と結合する新規のタンパク質として WDR26 が新たに同定された。

WDR26 は N 末端側に Lish (Lis homology) ドメイン、C 末端側には 5 つの WD40-repeat ドメインを有し、足場タンパク質として種々のタンパク質と相互作用することが予測された。酸化ストレスによる細胞死の抑制 (Feng, et al., Free Radic Res, 46:777-784, 2012) や白血球の移動における G タンパク質を介するシグナル伝達の促進 (Sun, et al., J Biol Chem, 288:16715-16725, 2013) といった機能が研究されていたが、研究開始当初に Wnt シグナル伝達と関連するといった報告例はなかった。アミノ酸配列より、酵母における WDR26 の相同遺伝子は GID7 と推測されるが

(Francis, et al., PLoS One, 8:e75217, 2013)、GID7 はポリユビキチン化複合体タンパク質 (8 種) の一つであることから、脊椎動物において、WDR26 が Axin を介し、細胞質中での  $\beta$ -catenin の分解に寄与する可能性が示唆された。

Wnt シグナル伝達経路は線虫やショウジョウバエから脊椎動物にいたるまで広く保存されている。したがって、Wnt シグナル伝達経路の研究では *in vivo* の解析手段として、様々なモデル生物の利点を活かした研究が行われてきた。アフリカツメガエルは初期胚の研究に適しており、胚発生の速さとほ乳類との遺伝子の相同性から、古くから Wnt シグナル伝達や癌の研究に寄与してきたモデル生物の一つである。また、ツメガエルにおいても、ほ乳類と相同性の高い WDR26、及び GID 関連因子も存在し、Wnt シグナル伝達経路における  $\beta$ -catenin の分解制御機構はツメガエルでも保存されていると考えられた。

## 2. 研究の目的

Wnt シグナル伝達での細胞質内の  $\beta$ -catenin の分解機構に関して、WDR26 を中心に GID 関連分子と合わせて、作用機序を解明することを目的とし、以下の 3 点を目的とした。

(1) WDR26 は  $\beta$ -catenin とは結合しないが、Axin に結合し、 $\beta$ -catenin を分解することから、Wnt シグナル伝達において、 $\beta$ -catenin 分解複合体単位で分解に関わっていると考えられた。したがって、Axin との結合ドメインを明らかにし、 $\beta$ -catenin の分解に関する WDR26 の機能ドメインを決定する。

(2) WDR26 による  $\beta$ -catenin のポリユビキチン化の機構を明らかにする。他の  $\beta$ -catenin 分解複合体タンパク質との相互作用、ユビキチン化の部位の決定や既知のユビキチン E3 ライゲースである  $\beta$ -TrCP などとの競合の有無などを調べる。

(3) 酵母で GID7 (WDR26) とユビキチン化複

合体を形成する GID ファミリー遺伝子等の脊椎動物相同遺伝子の  $\beta$ -catenin の分解への関与を調べ、WDR26 による  $\beta$ -catenin の包括的分解機構を解明する。

### 3. 研究の方法

研究では培養細胞 (HEK 293T) とアフリカツメガエル胚を用い、遺伝子発現や生化学的解析を行った。

#### (1) 結合ドメインの解析

WDR26 と Axin のデリーションコンストラクトを作成し、培養細胞にそれらのプラスミドをトランスフェクションし、免疫沈降やウェスタンブロット法などの生化学的手法により、両タンパク質の結合ドメインを調べた。

#### (2) 胚発生での解析

*Xenopus* WDR26 (*xWDR26*) の転写産物の発現解析を RT-PCR と Whole mount *in situ* hybridization により行った。Wnt の過剰発現によりツメガエルのオタマジャクシ期に頭部が欠損や神経マーカーが減少することを指標にし、*xWDR26* mRNA の過剰発現とアンチセンスモルフォリノオリゴによるノックダウンによって、Wnt シグナル伝達への影響を確認した。予定頭部領域 (8 細胞期の背側動物割球) への mRNA 等のマイクロインジェクションによる検証を行った。

#### (3) $\beta$ -catenin の分解の解析

WDR26、及び、GID ファミリー遺伝子のプラスミドを培養細胞にトランスフェクションし、ウェスタンブロット法により  $\beta$ -catenin タンパク質量の増減を調べた。

(4)  $\beta$ -catenin のユビキチン化部位の同定  
ショウジョウバエから脊椎動物に至る  $\beta$ -catenin のアミノ酸配列に保存されている 23 のリジン残基をアルギニン残基に変更した  $\beta$ -catenin の変異体を作成し、WDR26 による  $\beta$ -catenin の変異体のユビキチン化を免

疫沈降法とウェスタンブロット法により解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) WDR26 と Axin の結合

WDR26-Axin の結合は WDR26 の LisH ドメインと Axin の GSK3- 結合ドメインで結合することが分かった。(WDR26 が Axin と GSK3- の結合には影響を及ぼさないことも確認した。) また、LisH ドメインを欠失した WDR26 は  $\beta$ -catenin を分解できなかった (図 1)。

さらに、WDR26 自身が  $\beta$ -catenin に結合しないことから、WDR26 による  $\beta$ -catenin の分解には  $\beta$ -catenin と結合する Axin と結合することが必要であり、実際に WDR26 による  $\beta$ -catenin のユビキチン化は Axin により増加した (図 2)。

#### (2) *xWDR26* の胚発生への影響

RT-PCR の結果より、アフリカツメガエル胚において、*xWDR26* の転写産物の発現量は初期胚発生を通じて、ほぼ一定であった。Whole mount *in situ* hybridization の結果から、*xWDR26* は神経胚期以後に神経と頭部に強く発現していた。*xWDR26* のアンチセンスモルフォリノオリゴ (*xWDR26-MO*) による予定頭部領域での *xWDR26* のノックダウンで神経マーカー遺伝子の発現量の減少 (図 3) と尾芽胚期での頭部の欠損が確認されたことにより、*xWDR26* が Wnt シグナル伝達において、ネガティブに機能していることが示唆された。

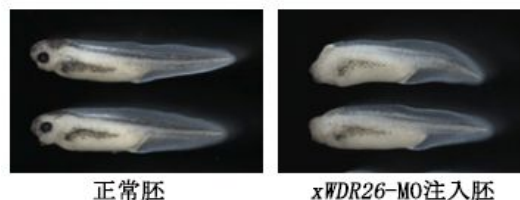


図3、*xWDR26* のノックダウンによる頭部欠損

#### (3) $\beta$ -catenin の分解

WDR26 は酵母の GID(Glucose Induced degradation Deficient)ファミリー遺伝子の GID7 の脊椎動物相同遺伝子であり、 $\beta$ -catenin の分解や分解時のポリユビキチン化に他の GID ファミリー遺伝子(GID1、GID2、GID3、GID4、GID5、GID7、GID9{GID6 は脱ユビキチン化関連遺伝子なので除外})が複合体を形成し、関与をしていると考えられた。

WDR26 と GID1、GID2、GID3、GID5、GID9 の結合が確認され、脊椎動物でも GID ファミリー遺伝子が複合体を形成していることが示唆された。また、GID5 以外の GID1、GID2、GID3、GID4、GID8、GID9 が単独でも  $\beta$ -catenin の分解能を有していた(図4)。

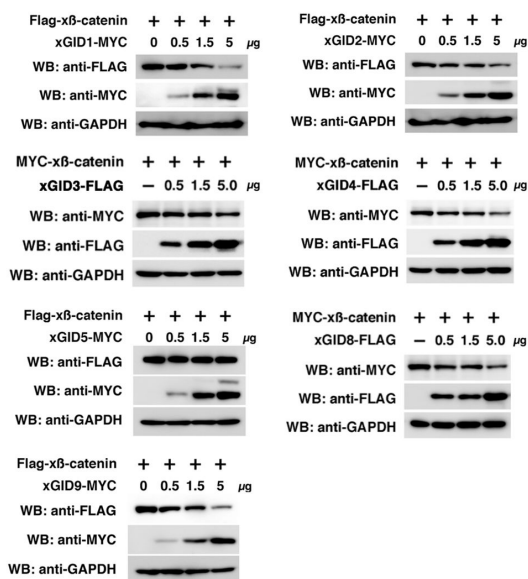


図4、GIDファミリー遺伝子によるbeta-cateninの分解

### (3) $\beta$ -catenin のユビキチン化

$\beta$ -catenin のアミノ酸配列で、ショウジョウバエから脊椎動物に至る、多くの種で保存されているリジン残基は 23 個(番号はアフリカツメガエルによる: K19、K49、K133、K158、K180、K181、K233、K242、K270、K281、K292、K312、K335、K345、K354、K394、K435、K496、K506、K625、K666、K671、K672)あり、各リジン残基をアルギニン残基に置換した  $\beta$ -catenin の変異体の WDR26 による分解とユビキチン化を調べた結果、3カ所のリジン残基、

K312、K335、K345 をアルギニンに置換した  $\beta$ -catenin のユビキチン化量が減少し、3カ所のリジン残基を全て置換した  $\beta$ -catenin-312KR-335KR-345KR 変異体は安定し、ほとんど分解もユビキチン化もされないことが明らかとなった(図5)。また、GID ファミリー遺伝子の内、GID1、GID2、GID8、GID9 も WDR26 と同様に、この  $\beta$ -catenin の3カ所のリジン残基をユビキチン化することで  $\beta$ -catenin を分解することも予測された。

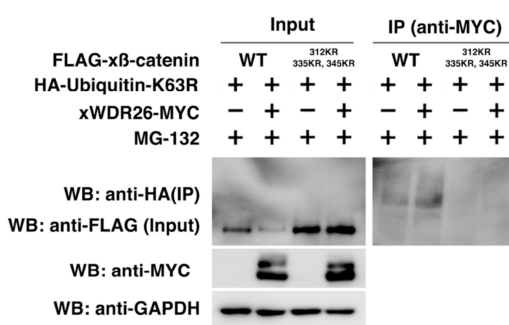


図5、beta-catenin-312KR-335KR-345KRのユビキチン化

以上のように、本課題の成果として、WDR26 が Axin を介して  $\beta$ -catenin を分解すること、さらに、WDR26 を含む GID ファミリー遺伝子が複合体を形成し、今までに報告の無かったリジン残基(312K、335K、345K)のユビキチン化による  $\beta$ -catenin の新規の分解機構が存在することが明らかとなった。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Goto T, Matsuzawa J, Iemura S, Natsume T, Shibuya H. (2016). WDR26 is a new partner of Axin1 in the canonical Wnt signaling pathway. *FEBS Lett.* 査読有、590 1291-1303. doi: 10.1002/1873-3468.12180.

Kii I, Sumida Y, Goto T, Sonamoto R, Okuno Y, Yoshida S, Kato-Sumida T, Koike Y, Abe M, Nonaka Y, Ikura T, Ito N, Shibuya H, Hosoya T, Hagiwara M. Selective

inhibition of the kinase DYRK1A by targeting its folding process. (2016). *Nat Commun.* 査読有、7 11391. doi: 10.1038/ncomms11391.

Michiue T, Yamamoto T, Yasuoka Y, Goto I, Ikeda T, Nagura K, Nakayama T, Taira M, Kinoshita T. (2017). High variability of expression profiles of homeologous genes for Wnt, Hh, Notch, and Hippo signaling pathways in *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* 査読有、426 270-290. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.12.006.

Roles of *Xenopus* chemokine ligand CXCLh (XCXCLh) in early embryogenesis. (2018). *Dev Growth Differ.* 査読有、60 226-238. doi: 10.1111/dgd.12432.

[学会発表](計 4件)

後藤利保、松澤純平、家村俊一郎、夏目徹、澁谷浩司 WDR26 is a new partner of Axin1 in canonical Wnt signaling pathway. 第 38 回日本分子生物学会 (2015.12.01、神戸)

道上達男、後藤利保、木下勉、山元孝佳、平良真規、中山卓哉 *Xenopus laevis* 全ゲノム解析：異質四倍体の細胞内シグナル経路関連遺伝子におけるホメオログの保存性と機能分担 第 38 回日本分子生物学会 (2015.12.01、神戸)

後藤利保、松澤純平、家村俊一郎、夏目徹、澁谷浩司 WDR26 shows novel ubiquitination sites in beta-catenin degradation. 第 39 回日本分子生物学会 (2016.11.30、横浜)

後藤利保、松澤純平、家村俊一郎、夏目徹、澁谷浩司 beta-catenin の分解における

WDR26の機能解析 第11回日本ツメガエル研究集会 (2017.09.07、えびの市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 利保 (GOTO, Toshiyasu)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授  
研究者番号 : 00517518

(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

該当なし