

平成21年 5月20日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570127

研究課題名 (和文) アダプター分子 Grb10 による Wnt シグナル伝達経路抑制
の分子機構の解明研究課題名 (英文) Analysis of molecular mechanisms underlying Grb10-mediated
suppression of the Wnt signaling pathway.

研究代表者

柳川 伸一 (YANAGAWA SHIN-ICHI)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：70183978

研究成果の概要：発生や形態形成に関わる分泌蛋白 Wnt の Co-receptor、LRP6 の結合蛋白として Growth factor receptor bound protein 10 (Grb10) 蛋白を同定した。元来 Grb10 は、受容体型チロシンキナーゼに結合するアダプター分子として見いだされた。しかし、本研究により、Grb10 は、Wnt による β -catenin の誘導を抑制し、それにより Wnt 経路を強く阻害する事が明らかになった。正常細胞に於いて、Grb10 は Wnt 経路の負の制御因子として働いていた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：Wnt・シグナル伝達・アダプター分子

1. 研究開始当初の背景

(1) 分泌蛋白 Wnt による細胞内シグナル伝達は、発生や形態形成また癌の誘発など多様な局面で働いている。この Canonical Wnt 経路では、Low density lipoprotein receptor related protein 6 (LRP6) と 7 回膜貫通タンパク Frizzled からなる複合体が、機能的な Wnt 受容体である。通常、 β -catenin は、Axin を中核とした蛋白複合体の中でリン酸化を受け、Ubiquitin/プロテオソーム系にて分解されるが、Wnt 刺激を受けると、Axin は

LRP6 に結合して、その β -catenin 分解促進能を失い、その結果著しい β -catenin 蛋白質の蓄積が生じる。こうして細胞内に蓄積した β -catenin の一部は、核内に移行し、転写因子 TCF の Co-activator となって Wnt の標的遺伝子の発現を促進している。しかし、Wnt 受容体から下流のシグナル分子 (Dsh/Dvl や β -catenin 分解蛋白複合体の Scaffold 蛋白 Axin など) にいかなる分子機構で情報が伝達されるのかについては不明な点が多かった。

これらの理由から、LRP6 の細胞内ドメインを bait とした Yeast two hybrid screen に

よって、LRP6 結合蛋白を検索した結果、Grb10 蛋白を見いだした。

(2) Grb10 蛋白は、活性化された受容体型チロシンキナーゼ (Insulin, IGF-1, EGF, などの受容体など)の細胞内ドメイン (自己リン酸化を受けている) に結合する分子として発見され、広汎な組織で発現している事が知られている。Grb10 は、それ自身は特定の酵素活性は持たないが、SH3 蛋白質の結合部位となる Pro-rich region、蛋白の膜局在を促進する Pleckstrin homology (PH) ドメイン、チロシンキナーゼのキナーゼコア部分と結合する BPS ドメイン、そしてホスホチロシンに結合する SH2 ドメインなど多くの特徴的な機能ドメインをもつ事から、蛋白・蛋白間相互作用を仲介するアダプター分子として機能していると考えられている。

現在 Grb10 の機能として確立されているものは、Insulin 受容体および Insulin like growth factor I 受容体を介したシグナル伝達の負の制御因子である事である。しかし Grb10 は、より多様な細胞機能への関与も推測されてきた。

2. 研究の目的

Wnt 受容体から、細胞内へのシグナル伝達の制御に働いていると考えられる新規の分子を同定し、その作用機構を解析する事を目的とした。特に新規 LRP6 結合蛋白 Grb10 による Wnt シグナル伝達抑制の分子機構を詳細に検討し、さらに受容体型チロシンキナーゼが関与するシグナル伝達経路と Wnt 経路との間に Grb10 を介したクロストークの可能性を検討する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) Grb10 蛋白全長をコードする cDNA を PCR によって作成し、それを p3XFLAG-CMV10 (Sigma)ベクターに導入する事により、動物培養細胞で、N 末端に 3XFLAG タグを持つ Grb10 を発現し得るプラズミドを樹立した。p3XFLAG-Grb10 と命名した。

(2) Wnt シグナル伝達系の活性化の程度を簡便にアッセイするには、TCF 依存性の転写活性を Luciferase の値として表示しうる SuperTopFlash Reporter を用いた。培養細胞としてはヒト 293T 細胞、ラット Rat2 細胞を用いた。通常のリポーターアッセイにおける、Wnt3a 刺激には、PGKWnt3a ベクターと SuperTopFlash の Co-transfection を用いた。一方 Grb10 発現、非発現細胞における

β -catenin の量を比較する際には、Wnt3a 刺激の方法として、Wnt3a を発現する L 細胞の Conditioned Medium で 3 時間処理する方法を用いた。

(3) myc-標識 LRP6 と FLAG-標識 Grb10 あるいはその変異体との結合の確認は、抗 FLAG 抗体あるいは抗 myc 抗体による免疫共沈殿法と Western blot を併用した。

(4) Grb10 のどのドメインが LRP6 との結合に関与するのかの解析、さらに Grb10 が示す Wnt 経路の抑制活性に必要とされるドメインを同定する為に、Grb10 に付き N-, C-末端より連続的な欠損変異体を作成した。変異体の作成は、PCR によって各種の変異型 cDNA を調整する方法によった。

(5) インスリン経路を、受容体型チロシンキナーゼを介したシグナル伝達経路の典型とし用いた。インスリン経路我活性化されているか否かのアッセイには、リン酸化型 Glycogen synthase kinase 3 に対する特異的抗体 (Cell signaling Tec 社)を用いた Western blot を行った。Wnt シグナル経路に対するインスリンの効果を TCF 依存性のリポーターアッセイにより解析した。

(6) Grb10 の RNAi 実験に用いる Si-RNA は Invitrogen 社の Block-iT Dicer RNAi キットを用いて作成した。また 293T 細胞で、Grb10 が発現している事は、RT-PCR 並びに Grb10 に対する特異的抗体 (A-18, Santa Cruz 社)による Western blot により確認した。

4. 研究成果

(1) LRP6 と Grb10 の結合の確認

Grb10 は LRP6 の細胞内ドメインに強く結合する事を、293T 細胞における抗 FLAG 抗体による免疫共沈殿法によって確認した。実際には、293T 細胞に p3XFLAG-Grb10 と myc 標識された LRP6 を発現するプラズミド (pSectag2-LRP6) をコトランスフェクションし、得られた cell lysate から Anti-FLAG で Grb10 を免疫沈降させ、その中に LRP6 が共沈する事、逆に Anti-myc で LRP6 を免疫沈降させ、その中に Grb10 が共沈する事を、Western blot により確認した。

(2) TCF 依存性レポーターアッセイによる Wnt 経路への Grb10 強制発現の効果の検討 (Wnt 経路の抑制因子 Grb10 の発見)

Grb10 が Wnt の受容体に結合する事から、

Grb10 強制発現は Wnt シグナル伝達を修飾する可能性が考えられた。Wnt 刺激が無い場合、Grb10 強制発現はそれ単独でレポーター活性に影響しなかった。一方 293T 細胞において、Wnt3a 刺激は TCF 依存性のレポーター活性を 200 倍高進させるが、そこで Grb10 を強制発現させると、この Wnt3a により誘導された転写活性は、その 8%にまで抑制された。さらに、LRP6 あるいは Dvl2 の強制発現により誘導された TCF 依存性の転写活性をも、Grb10 は強く阻害した。この Grb10 の効果が Wnt 経路に特異的である事は、SuperPopFlash (TCF 結合塩基配列に点変異を導入した対象プラズミド)を用いて確認した。

Wnt や Dvl2 を用いて、Wnt 経路を活性化した場合とは対照的に、Grb10 は、恒常的活性化型の β -catenin によるレポーター活性化を全く抑制する事は出来なかった。従って Grb10 の作用点は、明らかに β -catenin より上流であった。これらの結果は、Grb10 強制発現が、Wnt3a による細胞室内 β -catenin の誘導を強く抑制している可能性を示唆した。

(3) Grb10 は、Wntによる細胞室内 β -cateninの誘導を強く抑制する

293T 細胞に p3XFLAG-Grb10 とその Control である p3XFLAG-CMV10 をトランスフェクションし、24 時間後、両細胞を Wnt3a 発現 L 細胞の conditioned medium、あるいは対象である plain L 細胞の conditioned medium で 3 時間処理した。これらの細胞から細胞室画分を調製し、 β -catenin を用いた Western blot を行った。Grb10 強制発現細胞では、対象細胞に比較して、Wnt3a 刺激による細胞室内の β -catenin 蓄積は著しく阻害された。

(4) RNAiを用いた内在性Grb10の機能の解析

上記した Grb10 の強制発現の結果を確認する為、SiRNA によって内在性 Grb10 の発現を 30% にまで抑制した 293T 細胞を作成した。この細胞では、Wnt3a によって誘導されたレポーター活性が、対照の LaccZ-SiRNA 処理細胞に比較して 250%に亢進した。従って、実際に正常細胞において、Grb10 は Wnt 経路の抑制因子として働いている事が明らかになった。Si-RNA が実際に働いている事は、FLAG 標識した Grb10 の発現が、強く抑制されるとの Western blot の結果により確認した。

(5) Grb10の機能ドメイン欠損変異体を用いた解析

Pleckstrin-homology-domain, RA-like-domain などを含む Grb10 の分子中央部分に、LRP6

は結合した。また、C-末端の SH2-domain は LRP6 と Grb10 の結合を弱めている事も判明した。さらに、Grb10 による Wnt 経路の抑制には、C-末端の SH2 domain 及び N-末端の 68 アミノ酸残基部分の両方が必須であり、従って Grb10 と LRP6 の結合には Grb10 の分子中央部分で十分であったが、Wnt 経路を抑制する活性の発現には Grb10 分子の全長が必要である事が判った。

(6) Grb10によるWnt経路抑制の機構 (Grb10によるLRP6-Axin結合の阻害)

Wnt 刺激によって、LRP6 の細胞質ドメインがリン酸化され、そこに Axin がリクルートされると、Axin は β -catenin 分解複合体の Scaffold としての機能を発揮出来なくなる。その結果、 β -catenin の細胞質内への蓄積が生じる事が知られている。一方 Grb10 も Axin 同様に LRP6 の細胞質ドメインに結合能を持っている。従って、LRP6, Grb10, Axin の三者は、Ternary Complex を形成する可能性、あるいは LRP6 に対して Axin と Grb10 が相互排除的な結合をする可能性が予想された。この点を明らかにする為、293T 細胞に LRP6, Axin の発現プラズミド、さらに p3XFLAG-Grb10 あるいは p3XFLAG-CMV10 をコトランスフェクションし、Grb10 の有無の状態、LRP6 と Axin の会合状態を比較した。LRP6 と Axin の結合は、Wnt 刺激により飛躍的に促進される事が知られているので、コトランスフェクション後 24 時間経ったら、細胞を 3 時間 Wnt3a の conditioned medium で処理し、それから Cell lysate を作製した。Anti-myc により LRP6 を免疫沈殿させ、そこに共沈殿してくる Axin の量を Grb10 の有無で比較した。LRP6 への Axin の結合は、Grb10 の強制発現によって著しく阻害される事が明らかになった。LRP6 の細胞質ドメインを巡って Grb10 と Axin が競合しているものと考えられ、これが Grb10 による Wnt 経路の抑制の分子機構であると考えられた。

(7) インスリン経路とWnt経路のクロストークの可能性の検討

長期間のインスリン刺激を続けると、インスリン受容体の細胞内ドメインに Grb10 がリクルートされ、その結果インスリン受容体を介したシグナル伝達が抑制される事はよく知られている。インスリン刺激により、インスリン受容体に Grb10 がリクルートされると、Wnt 経路は Grb10 による抑制から解除され、結果として、TCF 依存性のレポーター活性は、上昇する可能性を想定していた。Wnt3a によって誘導された TCF 依存性レポーター活性に対するインスリン刺激の効果を、293T 細

胞を用いて検討した。予想に反し、TCF リポーター活性はインスリン刺激によって影響を受けなかった。受容体型チロシンキナーゼを受容体とする他の増殖因子，例えば EGF, FGF, HGF などのシグナル伝達経路との Wnt 経路クロストークの可能性については、現在、検討中である。

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 1 件)

- ① Norio Tezuka, Anthony M. Brown, Shin-ichi Yanagawa、
GRB10 binds to LRP6, the Wnt co-receptor and inhibits canonical Wnt signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 648-654 (2007) 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 柳川伸一
アダプター蛋白 Grb10 による Wnt シグナル伝達経路抑制の分子機構の解析
第 66 回日本癌学会総会
平成 19 年 10 月 4 日、パシフィコ横浜

- ② 柳川伸一
Molecular mechanisms underlying Keratin-associated protein13 induced activation of canonical Wnt signaling pathway.
第 31 回日本分子生物学会年会
平成 20 年 12 月 12 日、神戸国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳川 伸一 (YANAGAWA SHIN-ICHI)
京都大学・ウイルス研究所・助教
研究者番号：70183978

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し