

平成22年5月14日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2009

課題番号：20013025

研究課題名（和文） レドックスシグナルと細胞がん化

研究課題名（英文） Redox signaling and cancer formation

研究代表者

三木 裕明 (MIKI HIROAKI)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：80302602

研究成果の概要（和文）：Wnt シグナル伝達因子 Dvl に結合する NRX の機能について調べた。NRX 遺伝子欠損マウスは出産期前後に死亡し、骨や心臓に異常が観察された。頭骨由来細胞では Wnt シグナルが活性化していたが、心臓由来細胞では減弱していた。この原因は Dvl のユビキチン化が亢進し、蛋白質量が減少しているためであった。また NRX の新規結合因子として Fli-I を発見し、NRX が Fli-I と MyD88 を結びつけ自然免疫応答を抑制することも見つけた。

研究成果の概要（英文）：I investigated the function of NRX that binds to Dvl, a Wnt signal transducer. Mice deficient for NRX gene were perinatally lethal and showed abnormal development of their bones and heart. Wnt signaling was hyperactivated in cells obtained from calvaria, but was downregulated in cells from the heart. This unexpected decrease in the activity of Wnt signaling was due to the reduction of Dvl proteins caused by augmented ubiquitination. Also, I discovered that Fli-I is a novel binding partner for NRX, and found that NRX inhibits the innate immune response by linking Fli-I to MyD88.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,000,000	0	9,000,000
2009年度	9,000,000	0	9,000,000
年度			
年度			
年度			
総計	18,000,000	0	18,000,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：Wnt, Dishevelled (Dvl), nucleoredoxin (NRX), がん

1. 研究開始当初の背景

(1) Wnt シグナル伝達は初期発生や種々の幹細胞制御に重要な役割を果たしている。また過剰に活性化することが発がんの原因となることもよく知られている。Dishevelled (Dvl) は Wnt シグナルの伝達において必須の働き

をするアダプター蛋白質であるが、そのシグナル伝達機能や蛋白質量がどのように制御されているのかはほとんど分かっていなかった。

(2) 私は Dvl に結合する蛋白質を網羅的に探索し、その結果、新規の結合蛋白質として

nucleoredoxin (NRX) を見つけた。培養細胞を用いた実験などから、NRX が Dvl の機能を抑制し、Wnt シグナル伝達に阻害的に働くことを見つけた。また、RNA 干渉法により NRX を人為的に発現抑制すると、細胞が Ras などのがん遺伝子によって形質転換しやすくなること、などを発見し、2006 年に論文として報告した (*Nat. Cell Biol.* 8, 501-508)。これらの研究成果は、NRX が Wnt シグナルの活性を制御することによって、細胞のがん化に関わる可能性を示唆していた。

(3) NRX の生物個体レベルでの機能を調べるため、NRX 遺伝子を欠損したノックアウトマウスを作製した。NRX ホモ欠損マウスは出産期前後に死亡しており、野生型マウスと比較すると体長が短くなっており、明らかに胎児期の発生において異常を呈することが明らかとなっていた。

2. 研究の目的

(1) Dvl の結合因子として発見した NRX の機能解析、特に自分たちで作製した NRX 遺伝子欠損マウスを用いた解析を行う。個体レベルでの表現型解析を行い、マクロなレベルでの NRX の機能・役割を明らかにする。また、遺伝子発現パターンを網羅的に解析も行い、分子レベルでの機能的な重要性についても明らかにする。

(2) NRX 遺伝子をホモ欠損にすると、出産期前後で死亡するため、成体での腫瘍形成などの解析を行うことができない。このため、野生型マウスと同じように出生・成長する NRX 遺伝子ヘテロ欠損マウスを用いた解析を行い、個体レベルでの腫瘍形成との関わりを明らかにする。

(3) 私は NRX を Dvl の主要結合蛋白質として発見し、実際に NRX が Dvl の分子機能に対して大きな影響を与えていることを確認・報告してきた。しかし、NRX の機能が Dvl の阻害だけなのか、それとも別の新規機能があるのかまったく不明である。この点を明らかにするために、NRX をベイトとして用いる網羅的な結合蛋白質探索を行う。

3. 研究の方法

(1) NRX 遺伝子欠損マウスに関して、ホモ欠損で胎児期発生のどの部分に異常が起こっているのかについて調べ、死因との関連性を明らかにする。また DNA チップを用いて網羅的なトランスクリプトーム解析を行い、NRX 遺伝子欠損によってどのような遺伝子の発現に異常が起こっているのかについて調べ、NRX 機能解析の手がかりとする。

(2) NRX 遺伝子ヘテロ欠損マウスを *p53* 遺伝子ヘテロ欠損マウス (購入する) と掛け合わせて、NRX/*p53* ダブルヘテロ欠損マウスを作製する。このようにして得られた、野生型、

NRX 遺伝子ヘテロ欠損、*p53* 遺伝子ヘテロ欠損、NRX/*p53* 遺伝子ダブルヘテロ欠損、の四つの遺伝子型のマウスで、それぞれの成長や死亡時期、腫瘍形成などに関して比較解析を行う。

(3) NRX の新規機能を明らかにするため、結合蛋白質の解析を行う。培養細胞に NRX を安定的に発現させた細胞株を作製して免疫沈降を行い、NRX と共沈する蛋白質を質量分析により同定する。同定できた蛋白質に関しては結合性の確認を行い、培養細胞や NRX 遺伝子欠損マウスを用いた機能解析を進める。

4. 研究成果

(1) NRX 遺伝子ホモ欠損マウスの胎児期の表現型を詳細に解析すると、骨形成と心臓形成に明らかな異常が認められた。骨に関しては、特に頭骨の成長が遅れており、野生型マウスと比較して明らかに小さかった。骨から細胞を採取して、*in vitro* で骨芽細胞への分化を誘導すると、NRX 遺伝子ホモ欠損マウス由来の細胞では骨芽細胞の数が顕著に増大しており、Wnt シグナル伝達の活性も上昇していた。一方、心臓に関しては、左右の心室を隔てる隔壁が十分に形成されていないことが明らかとなった。また一部の NRX 遺伝子ホモ欠損マウスでは心臓から伸びる血管の形態にも異常が認められた。

(2) DNA チップを用いて、NRX 遺伝子ホモ欠損マウスと野生型マウスでの遺伝子発現パターン比較解析を行った。その結果、意外なことに NRX 遺伝子ホモ欠損マウスにおいて Wnt シグナル依存性に転写誘導を受ける一部の遺伝子の発現が減弱していた。NRX 遺伝子ホモ欠損マウスで明らかな表現型異常が観察された骨と心臓から細胞を採取して解析すると、心臓の細胞において Wnt シグナル活性の低下が確認できた。NRX が Dvl の機能を阻害して Wnt シグナル伝達に抑制的に働くというこれまでの考え方では説明できない現象である。

(3) Wnt シグナル活性低下の原因を明らかにするため Dvl の蛋白質量を調べると、NRX 遺伝子ホモ欠損マウス心臓由来の細胞において、Dvl が大きく減少していた。胎児由来の線芽細胞 (MEF) においても同様の結果を得た。Dvl はユビキチン化によって安定性が制御されていることが知られていたため、MEF を用いて Dvl のユビキチン化状態を調べたところ、NRX 遺伝子ホモ欠損マウス由来の MEF では野生型マウス由来の MEF と比較してユビキチン化が亢進しており、Dvl の分解スピードが速くなっていることが分かった。

(4) Dvl のユビキチン化には E3 リガーゼ複合体を構成する KLHL12 が重要であることが報告されていたので、Dvl との結合性について

調べた。その結果、NRX 遺伝子ホモ欠損マウス由来の MEF では Dvl と KLHL12 が恒常的に複合体形成していることが分かった。また、精製蛋白質を用いた *in vitro* の実験系において NRX が Dvl と KLHL12 の複合体形成を妨げユビキチン化を阻害することが明らかとなった。つまり NRX は Dvl のシグナル伝達機能を阻害するだけでなく、蛋白質として安定させる（分解を防ぐ）作用をもつことが明らかとなった。

(5) NRX の新規機能解明のため、結合蛋白質の探索を行った。タグ付き NRX を安定発現する細胞株を作製し、その細胞溶解物から免疫沈降を行い特異的に共枕する蛋白質を解析した。その結果、いくつかの主要な蛋白質バンドが検出され、質量分析を行ったところ Dvl など既知の NRX 結合蛋白質の他に Flightless-I (Fli-I) が含まれていることが分かった。実際、NRX と Fli-I とは細胞内で複合体を形成し、*in vitro* でも直接結合することを確認した。

(6) Fli-I の重要な機能の一つとして、Toll-like receptor (TLR) の自然免疫シグナル伝達において重要な役割を果たす MyD88 と複合体を作り、その作用を抑制することが報告されていた。そこで、過剰発現系において MyD88/Fli-I 複合体形成に対する NRX の効果を調べたところ、NRX は両者の複合体形成を促進することが分かった。また、それぞれの精製蛋白質を用いた結合実験によって、MyD88 と Fli-I は直接結合するのではなく、NRX が両者を結びつけていることが明らかとなった。

(7) TLR シグナル伝達における重要性を調べるため、TLR/MyD88 が仲介する LPS 刺激応答による NF- κ B 活性化に関して調べた。Fli-I や NRX はそれぞれ単独では弱い阻害作用しか示さないが、両者を共発現するとシグナル伝達を強く阻害した。また上記の NRX 遺伝子ホモ欠損マウスから採取した MEF を用いて解析すると、野生型 MEF と比較して LPS 応答が強くなっていることも明らかとなった。これらの実験結果から、NRX は MyD88 と Fli-I を結びつけるアダプター蛋白質として機能し、TLR を介するシグナル伝達に抑制的に働くことが分かった。

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 9 件)

- ① Hayashi T, Funato Y, Terabayashi T, Morinaka A, Sakamoto R, Ichise H, Fukuda H, Yoshida N, Miki H. Nucleoredoxin negatively regulates Toll-like receptor 4 signaling via

recruitment of Flightless-I to Myeloid differentiation primary response gene (88).

- J. Biol. Chem.** (2010) (in press) 査読有
- ② Uchiyama Y, Sakaguchi M, Terabayashi T, Inenaga T, Inoue S, Kobayashi C, Oshima N, Kiyonari H, Nakagata N, Sato Y, Sekiguchi K, Miki H, Araki E, Fujimura S, Tanaka S, Nishinakamura R. Kif26b, a kinesin family gene, regulates adhesion of the embryonic kidney mesenchyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** (2010) (in press) 査読有
- ③ Yoshimura Y, Terabayashi T, Miki H. Par1b/MARK2 phosphorylates kinesin-like motor protein GAKIN/KIF13B to regulate axon formation. **Mol. Cell. Biol.** 30, 2206-2219 (2010) 査読有
- ④ Funato Y, Miki H. Redox regulation of Wnt signalling via nucleoredoxin. **Free Radic. Res.** 44, 379-388 (2010) 査読有
- ⑤ Boles MK, Wilkinson BM, Wilming L, Liu B, Probst FJ, Harrow J, Grafham D, Hentges KE, Woodward LP, Maxwell A, Mitchell K, Risley MD, Johnson R, Hirschi K, Lupski JR, Funato Y, Miki H, Marcín-García P, Matthews L, Coffey AJ, Parker A, Hubbard TJ, Rogers J, Bradley A, Adams DJ, Justice MJ. Discovery of candidate disease genes in ENU-induced mouse mutants by large-scale sequencing identifies a splice-site mutation in nucleoredoxin. **PLoS Genet.** 5, e1000759 (2009) 査読有
- ⑥ Terabayashi T, Funato Y, Fukuda M, Miki H. A coated vesicle-associated kinase of 104 kDa (CVAK104) induces lysosomal degradation of frizzled 5 (Fzd5). **J. Biol. Chem.** 284, 26716-26724 (2009) 査読有
- ⑦ Kise Y, Morinaka A, Teglund S, Miki H. Sufu recruits GSK3beta for efficient processing of Gli3. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 387, 569-574 (2009) 査読有
- ⑧ Terabayashi T, Funato Y, Miki H. Dishevelled-induced phosphorylation regulates membrane localization of Par1b. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 375, 660-5 (2008) 査読有
- ⑨ Funato Y, Michiue T, Terabayashi T, Yukita A, Danno H, Asashima M, Miki H. Nucleoredoxin regulates the Wnt/planar cell polarity pathway in *Xenopus*. **Genes Cells.** 13, 965-75 (2008) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 三木裕明、船戸洋祐、森中紹文「タンパク質の酸化修飾によるシグナル伝達の制御」第 82 回日本生化学会大会シンポ

- ② ジウム 2009.10.23. 神戸
森中紹文、船戸洋祐、三木裕明「セマフォリン 3A シグナルにおける CRMP2 の酸化依存的リン酸化と成長円錐崩壊」第 61 回日本細胞生物学会大会ミニシンポジウム 2009.6.2. 名古屋
- ③ 三木裕明「レドックス応答性因子 nucleoredoxin による Wnt シグナルの制御」第 61 回日本酸化ストレス学会学術集会シンポジウム 2008.6.19. 京都

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
http://www.protein.osaka-u.ac.jp/intra_signal/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木 裕明 (MIKI HIROAKI)
大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号：80302602