

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590336

研究課題名（和文） Wnt シグナル伝達経路の新規制御因子 Goliath の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis on Goliath, a novel regulator of Wnt signaling

研究代表者

濱田文彦（HAMADA FUMIHIKO）

大分大学・医学部・教授

研究者番号：70252707

研究成果の概要（和文）：分泌型成長因子 Wnt を介するシグナル伝達経路の新たな制御因子と考えられるユビキチン転移酵素 Goliath (Gol) の機能解析を行い、Gol がその RING ドメインを介して結合するユビキチン結合酵素の同定に成功した。また、Gol の PA ドメインと結合する蛋白質の探索することにより、Gol の基質と考えられる候補分子を絞り込んだ。個体レベルから Gol の機能解析を行うため、gol 遺伝子を欠失するノックアウトショウジョウバエを作成した。

研究成果の概要（英文）：We have performed functional analysis on Goliath (Gol), a novel regulator of Wnt signaling. We have identified an E2 ubiquitin conjugating enzyme which binds to the RING domain of Gol. In addition, by searching for the PA domain-binding proteins, some putative substrates of Gol have also been found. To elucidate *in vivo* function of Gol, we have generated a *Drosophila* line in which the gol gene was deleted.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学、細胞内シグナル伝達、発生学、ショウジョウバエ

## 1. 研究開始当初の背景

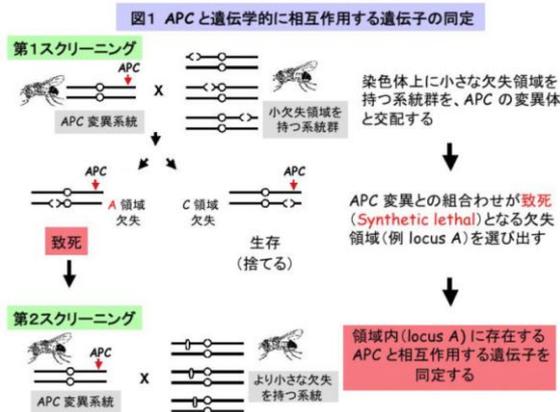
(1) Wnt シグナル伝達経路と APC 癌抑制遺伝子

分泌型成長因子 Wnt を介するシグナル伝達経路(Wnt シグナル伝達経路)は個体発生、幹細胞の制御において必須の役割を担うのみでなく、種々の癌の発生に深く関わっていることが知られている。一方、大腸癌の癌抑制遺伝子 APC (Adenomatous Polyposis Coli)

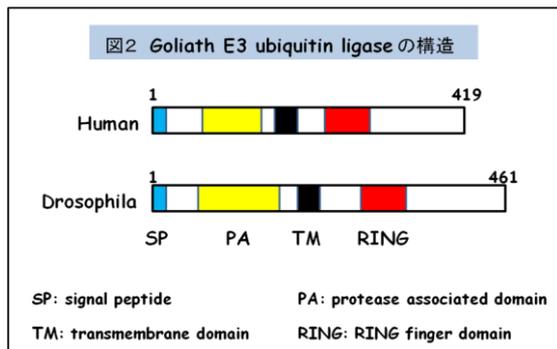
は、Wnt シグナル伝達経路の主要コンポーネントである $\beta$ -cateninの破壊を促すことによって、この経路を負に制御していることが広く知られている。

(2) 遺伝学的スクリーニングによる Wnt シグナル伝達経路の新たな制御因子 Goliath の同定

研究代表者らは、Wnt シグナル伝達経路とその制御機構のさらなる解明のため、APC の機能的パートナーあるいは Wnt シグナルの制御因子を同定することを目的として、ショウジョウバエの APC 遺伝子変異体と遺伝学的に相互作用する遺伝子を単離するためのゲノム規模の遺伝学的スクリーニングを実施し (図 1)、RING 型 E3 ユビキチンリガーゼをコードする Goliath (Gol) を同定した (図 2)。



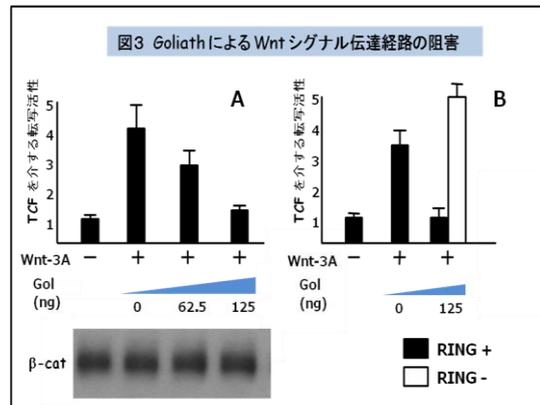
Gol は、膜貫通領域を持つユニークな構造のユビキチンリガーゼで、ショウジョウバエからヒトに至るまで広く存在している。これまでに Gol はほとんどの組織で発現していること、自己ユビキチン化活性を有すること、細胞質、特にオーガネラに局在することなどが明らかになっているが (未発表)、生理的機能については、ほとんど不明である。



### (3) Gol は Wnt シグナル伝達経路を阻害する

Wnt-3a によって刺激した正常細胞において Gol 遺伝子を発現させ、TCF (Wnt シグナルの転写因子) を介する転写への影響を検討したところ、Gol は、その発現量に依存して、

Wnt シグナルを強く阻害する活性を示した (図 3 A)。また、この活性は、RING finger 部分に変異を持つ変異体では失われ、dominant negative 効果を示すことから、Gol による Wnt シグナル伝達経路の阻害には、E3 ユビキチンリガーゼ活性が必要であることが示唆された (図 3 B、未発表)。

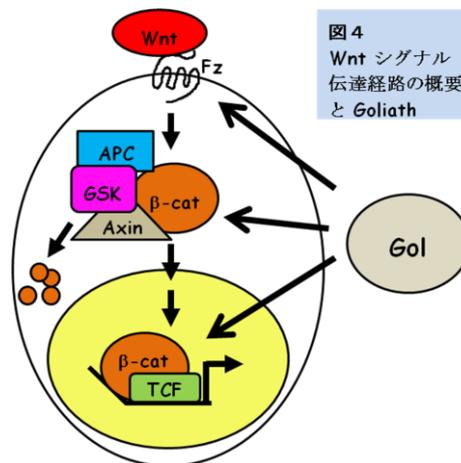


細胞内  $\beta$ -catenin レベルは、Gol の発現により変化しないことも確認しており (図 3 A、未発表)、Gol の機能の解明には、その基質の同定が不可欠であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、Gol による Wnt シグナル伝達経路の制御メカニズムを明らかにするため、以下の 2 項目を中心に解析を進める。

(1) Gol E3 ユビキチンリガーゼの基質を同定することにより、分子レベルで機能を解明する。(図 4)



(2) Gol のノックアウトおよびトランスジェニックフライを作成し、それらの示す表現

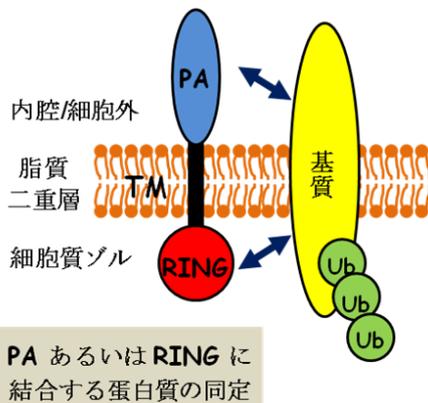
型を解析することにより、個体レベルで機能を解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) Gol E3 ユビキチンリガーゼの基質の同定

図2に示したように、Gol は膜貫通領域を含むユニークな構造を持った E3 ユビキチンリガーゼであるが、PA ドメインがオーガネラの内腔側または細胞外に存在し、RING ドメインが細胞質ゾル側に存在すると考えられている (図5)。

図5 予想される Gol の構造と基質同定のための戦略



また、免疫組織染色より、Gol が細胞質、特にオーガネラに主に存在することが判明している (未発表)。E3 ユビキチンリガーゼの基質を同定する方法は未だ確立されていないが、本研究では Yeast two-hybrid screening によって Gol の PA ドメインおよび RING ドメインと物理的に結合する蛋白質の同定を試みる。

#### (2) gol 遺伝子を欠失するショウジョウバエの作成

個体レベルから gol 遺伝子の機能を解析するため、gol 遺伝子ノックアウトショウジョウバエを作成し、その系統が示す表現型を解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) RING ドメインと結合する E2 ubiquitin conjugating enzyme の同定

Yeast two-hybrid screening から RING ドメインと結合する E2 ubiquitin conjugating

enzyme の同定に成功した。一方、PA ドメインに結合する蛋白質、特に基質については現在もスクリーニングを継続中であるが、これまでに Gol の基質と考えられるいくつかの候補の絞り込みに成功している。今後、これらの基質候補の中から真の基質を同定し、その機能を明らかにしたいと考えている。

#### (2) gol 遺伝子を欠失するノックアウトフライ (ショウジョウバエ) の作成

ショウジョウバエ Gol 遺伝子を欠失したノックアウトフライの作成に成功した。現在、このノックアウトフライの示す表現型を解析することにより、個体レベルにおける gol 遺伝子の機能を解析中である。

### 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4件)

- ① Taniue, K., Nishida, A., Hamada, F., Sugie, A., Oda, T., Ui-Tei, K., Tabata, T., Akiyama, T. Sunspot, a link between Wingless signaling and endoreplication in *Drosophila*. **Development** 査読あり 137, 1755-1764 (2010)
- ② Ji, RC., Eshita, Y., Xing, L., Miura, M. Multiple expressions of lymphatic markers and morphological evolution of newly formed lymphatics in lymphangioma and lymph node lymphangiogenesis. **Microvasc Res.** 査読あり 80, 195 (2010)
- ③ Miguchi, Y., Takata, H., Doihara, T., Miyawaki, K., Shimokawa, T., Hamada, F., Kobayashi, N., Matsuda, S. Morphological maturation level of the esophagus is associated with the number of circumesophageal muscle fibers during archenteron formation in the starfish *Patiria (Asterina) pectinifera*. **Biol. Bull.** 査読あり 219, 12 (2010)
- ④ Doihara, T., Miguchi, Y., Miyawaki, K., Shimokawa, T., Hamada, F., Kobayashi, N., Matsuda, S. Spatiotemporal distribution patterns of oligosaccharides during early embryogenesis in the starfish *Patiria pectinifera*. **Dev. Genes Evol.** 査読あり 219, 199-206 (2009)

〔学会発表〕(計1件)

- ① 濱田文彦、Wnt シグナル伝達経路を制御する新規 ubiquitin ligase の機能解析、日本解剖学会 第65回九州支部学術集会、平成21年11月7日、琉球大学・医学部

〔図書〕(計1件)

- ① Matsuda, S., Hamada, F., Ishizuka, N. NOVA Science publisher, The Structure of Dendritic Spines, Dendritic Spines: Biochemistry, Modeling and Properties (2009) pp151-162

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

濱田 文彦 (HAMADA FUMIHIKO)  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号：70252707

### (2) 研究分担者

紀 瑞成 (JI RUICHEN)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：60305034

### (3) 連携研究者

なし