

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25年5月20日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501008

研究課題名（和文）新規 LRP6 結合蛋白 Krtap13 による Wnt 経路活性化の生理的意義の解明

研究課題名（英文）Analysis of physiological role of Wnt pathway activation induced by Krtap13, a novel LRP6 binding protein

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（和文）：WntのCo-receptorである膜蛋白LRP6 に結合する蛋白として、Keratin associated protein 13（Krtap13）を、見いだした。Wnt非存在下、Krtap13を強制発現させるだけで、Wnt経路の著しい活性化が生じた。Krtap13は、細胞膜上でLRP6-Dvl凝集体を形成させ、そこへWnt経路の負の制御因子Axinを引き寄せる事を介して、Wnt経路を活性化していた。Krtap13を組織特異的に発現するTransgenicマウス系を開発し、悪性リンパ腫／白血病の発症をみた。

研究成果の概要（英文）：Keratin associated protein (Krtap) 13 binds to LRP6, a co-receptor for Wnt. Surprisingly, Krtap13 overexpression markedly stimulates Wnt signaling. Krtap13 induces co-clustering of LRP6 and Dvls, thereby recruiting Axin to the plasma membrane that leads to activation of Wnt signaling. Transgenic mice were generated to analyze effect of Krtap13 overexpression in vivo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：Wnt・Krtap13・シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景
分泌蛋白 Wnt による細胞内シグナル伝達は、発生や形態形成における多様な局面で重要な役割を演じている。また、Canonical Wnt シ

グナル伝達経路を構成する遺伝子の変異は、多くの癌を誘発する。

この経路では、1回膜貫通型蛋白 LRP6 と 7回膜貫通型蛋白 Frizzled(Fz) が

Co-receptor であり、この両者からなる複合体が、機能的な Wnt 受容体として働いている。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い。これらの理由から、研究代表者は、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、新たに Keratin associated protein 13 (Krtap13) を見いだした。TCF 依存性のレポーターアッセイを行うと、驚いた事に、Krtap13 の強制発現は、強く Wnt/Wingless (Wg) シグナル伝達経路を活性化した。

Krtap13 は、マウスでは 197、ヒトでは 174 アミノ酸からなり、PMG 蛋白群の一員で、Cys-Gln に富む 10 アミノ酸からなるリピート構造を持つ。この配列が、Krtap と類似していることから、Krtap に分類されている。しかし、その本来の機能は不明であった。

2. 研究の目的

(1) Wnt 受容体と相互作用し、その分子単独の強制発現により、著しい Wnt 経路の活性化をもたらす新規細胞内分子 Krtap13 をプローブとして、Wnt 受容体活性化に共通した molecular events を探る事。

(2) 種々の組織で Krtap13 を高発現しうる Transgenic mouse 系を作成し、そこでの腫瘍の発生の有無や組織に与える影響を解析刷る事により Krtap13 の生理的機能を新たに検索する事

3. 研究の方法

(1) Krtap13 の作用機序の解析

293T 培養細胞を用いたリポーターアッセイに LRP6 や Dvl の RNAi を組み合わせるとともに、免疫共沈殿法により Krtap13・LRP6・Dvl からなる Ternary complex の形成を確認する。

(2) 種々の組織で Krtap13 を高発現しうる Transgenic mouse 系の確立

公汎な組織での発現が可能な CAG プロモーターとヒト Krtap13 の cDNA の間に loxP-polyA-loxP 配列を挿入した Trans gene (Tg) を作成する。この Tg は、Cre の存在下においてのみ recombinant Tg (R-Tg) が生じ、Krtap13 の発現がなされる。従って、この Tg マウスと組織特異的に Cre を発現する種々の Cre マウスを交配する事より生まれた仔マウスに於いて、Krtap13 を種々の組織で高発現させる事が出来る。

CAG-Cre, Kr5-Cre, Alb-Cre マウスとの交配により、それぞれ公汎な組織、皮膚、肝臓に特異的な Krtap13 の発現の影響を解析する。

4. 研究成果

(1) Krtap13 の作用機序の解析

① Krtap13 の発現が Wnt の発現を誘導し、その結果 TCF 依存性のリポーターを活性化している可能性の排除。

Krtap13 導入細胞と、TCF リポーター導入細胞の Co-culture では、TCF 依存性のリポーターを活性化出来なかった。

② Krtap13 の発現は、 β -catenin 蛋白質の蓄積を誘導し、細胞の増殖を促進する。

Krtap13 によるリポーター活性化は、 β -catenin の分解を促進する機能を持つ Axin 蛋白質の共発現によって拮抗された。Krtap13 の作用点は Axin を含むその上流であった。実際に、Krtap13 の発現は、HEK293T 細胞で、 β -catenin 蛋白質の蓄積、そしてハエの S2R+細胞で、ハエの β -catenin(Arm) の蓄積を誘導した。また、293T およびマウス L 細胞で、Krtap13 を発現する Stable line を作成し、ベクターの Stable line とその増殖速度を比較すると、Krtap13 が、1.8 倍高かった。

③ Krtap13 は、LRP6 のみならず、Dvl とも結合する。

免疫共沈法により、Krtap13 は、LRP6 のみならずもう一つの Wnt 経路の構成員である Dvl とも結合し、その結合部位は、DIX ドメインから DEP ドメインである事が明らかになった。従って、LRP6、と Dvl と Krtap13 は、Krtap13 介して結合する事が判明した。

④ LRP6 と Dvl は Krtap13 を介して ternary complex を形成し、細胞膜上で、巨大な Dot 状に染色される複合体を形成する。

蛍光免疫二重染色により、LRP6 と Dvl の細胞内局在が、Krtap13 により、どの様に変化する

るかを観察した結果、細胞質に均一に存在した Dvl は、Krtap13 の発現により、Krtap13 と共局在し、巨大な Dot 状の染色像を示した。また、LRP6 も、Krtap13 と共局在し、細胞膜上で、凝集体を形成した。

⑤ Krtap13 による Wnt 経路の活性化に、LRP6、Dvl は必須である。

Krtap13 によるリポーター活性化を、LRP6 および Dvl の siRNA さらに、Dominant negative な Dvl(K68A/E69A) mutant は阻害した。この実験より、確かに Krtap13 が示す活性には、LRP6、Dvl とともに、必須である事が確認された。

⑥ Krtap13 の発現は、Axin の結合部位となる LRP6 の特異的リン酸化を促進する。

通常の Wnt 刺激により、LRP6 の Ser-1490 の特異的リン酸化が生じる事が知られている。この部位のリン酸化を認識する抗体を用いた Western blot により、Krtap13 発現によっても、このリン酸化が誘導される事から、Krtap13 も Wnt 刺激と同様な分子機構が働いている事が明らかになった。

⑦ Krtap13 の作用機序のモデル

Wnt 刺激により、細胞膜上に LRP6 とアダプター分子 Dvl の凝集体 (LRP6 Signaloasome) が形成され、そこに Axin がリクルートされ、結果として、 β -catenin 分解蛋白複合体の崩壊が生じている事 (Science 316 1619, 2007) が知られている。Krtap13 は、LRP6 と Dvl の両者と結合する事により、Wnt 刺激の場合と同様の、LRP6-Dvl 凝集体を形成させる事により、Wnt 経路を活性化していると推測された。

(2) Krtap13-Transgenic mouse 系の確立

① Cre の発現に依存して Krtap13 を発現する Trans-gene (Tg) の確立

Krtap13 の強制発現による Wnt 経路の活性化が与える影響を、in vivo で解析する為、組織特異的に Krtap13 を発現する Tg を考案した。公汎な組織での発現が可能な CAG プロモーターと N-末端に 3XFLAG で標識を付けたヒト Krtap13 の cDNA の間に loxP-polyA-loxP 配列を挿入した Trans gene (Tg) を作成した。この Tg は、そのままでは、Poly A 配列のため Krtap13 のコード領域の前で、転写が終わってしまうが、Cre の存在下において Poly A 配列が除去された recombinant Tg (R-Tg) が生じた状況に於いてのみ、3XFLAG で標識された Krtap13 の発現がなされる。

293T 細胞に Krtap13-Tg と Cre を発現する

plasmid あるいは Vector plasmid を co-transfection し、ゲノム DNA を調製した。CAG プロモーター部位に対応する Sense-primer と cDNA 末端に対応する Anti-sense-primer とゲノム DNA を用いて、PCR を行うと、Cre 非存在下では、Tg 由来の 1276bp の、Cre 存在下では、R-Tg 由来の 691bp の PCR 産物が形成された事から、予想通りの、Cre 依存性の recombination が起きた。更に、細胞抽出液について、抗 FLAG 抗体を用いた Western blot を行った結果、Cre に依存して、3XFLAG で標識された Krtap13 (30KDa) の発現が確認された。

② 3xFLAG-Krtap13-Tg を持つトランスジェニックマウスの作成

3xFLAG-Krtap13-Tg を、ユーテック (株) に依頼して、C57BL/6 マウスの受精卵にマイクロインジェクションし、常法に従い、F0 マウスを 4 ライン得た。一方、種々の組織で Cre を発現する Cre マウスは、conditional KO-マウスの作成の為に、用いられており、様々なものが使用可能である。このトランスジェニックマウスと特定の Cre マウスと交配して生まれた仔マウスのうち、Tg と Cre を両方持つ個体に於いては、Cre を発現する組織に於いて特異的に R-Tg が生じ、3xFLAG 標識された Krtap13 蛋白の強制発現が起こる。

(3) Krtap13-Transgenic mouse の表現型

① 皮膚および肝臓に於ける Krtap13 の発現

皮膚特異的に Cre を発現するマウスとして、Keratin5 (Kr5) のプロモーターを持つ、Kr5-Cre を、肝実質細胞特異的に Cre を発現するマウスとして、Albumin (Alb) のプロモーターを持つ、Alb-Cre を、交配に用いた。仔マウスの 1/4 に Cre と 3xFLAG-Krtap13-Tg を持つマウスが生まれ、それぞれ、皮膚、肝臓に於いてのみ R-Tg が生じ、そこで 3xFLAG 標識された Krtap13 蛋白の強制発現が、確認された。皮膚および肝臓に R-Tg を持つマウス数匹ずつを、現在でそれぞれ 15 ヶ月、12 ヶ月間観察しているが、外見上大きな表現型はみられなかった。

② 公汎な組織に於ける Krtap13 の発現の影響

公汎な組織での発現が可能な CAG プロモーターを持つ、CAG-Cre との交配では、R-Tg を持つマウスが生まれるのは、全仔マウスの僅か 5% であり、胎生期に於ける、公汎な組織での Krtap13 の高発現は、致死に至る事があると推定される。現在、R-Tg を持つマウス 15 匹を、20 ヶ月間観察しているが、そのうち 25% もマウスは、12 ヶ月～15 ヶ月ほどで、悪性リンパ腫/白血病を発症した。どの検体も、病理学的に良く類似していた。

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2件)

- 1) G. Ma, J. Yasunaga, J. Fan, S. Yanagawa,
M. Matsuoka.
HTLV-1 bZIP factor dysregulates the
Wnt pathway to support proliferation and migration of adult T-cell
leukemia cells.
Oncogene 査読有り 32 巻 2013 1-10,
DOI: 10.1038/onc.2012.450.

2) 柳川伸一

20年前のWnt研究の現場はどうだったか
細胞工学 査読無し 32 巻 2013 406
[http://gakken-mesh.jp/journal/detail/
9784780901412.html](http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901412.html)

[学会発表] (計3件)

- 1) 柳川伸一: Analysis of Keratin
associated protein13-induced
activation of canonical Wnt
pathway in vivo.
第35回日本分子生物学会年会、福岡、
2012年12月13日
- 2) 柳川伸一: Analysis of Keratin
associated protein13-induced
activation of canonical Wnt
signaling pathway in vivo.
第34回日本分子生物学会年会、横浜、
2011年12月16日
- 3) 柳川伸一: Analysis of molecular
mechanism underlying Keratin
associated protein13-induced
activation of canonical Wnt signaling
pathway .
第33回日本分子生物学会年会、神戸、
2010年12月9日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

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

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: