

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 4 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700881

研究課題名（和文）

細胞周期に依存した Wnt シグナル制御機構と発がん制御機構

研究課題名（英文）

Tumorigenesis triggered by the misregulation of the Wnt signaling pathways in mitosis

研究代表者

菊池 浩二 (KIKUCHI KOJI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：70457290

研究成果の概要（和文）：Wnt シグナル経路の破綻は細胞のがん化を引き起こすことが知られている。本研究は、細胞周期における Wnt シグナル経路の役割とがん化の連関を理解することを目的とし、「Wnt シグナル経路が有糸分裂期において機能するか」という点に焦点を絞り、研究を遂行した。本研究により、異なった Wnt シグナル経路がそれぞれ、分裂中期や分裂終期に機能し、有糸分裂期における Wnt シグナル経路の多様な機能を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：One of the Wnt signaling pathways, the β -catenin-dependent pathway contributes to G1/S progression through transcriptional activation, and mutations in the genes encoding the pathway trigger tumorigenesis. However, involvement of the Wnt signaling pathways in mitotic progression remains unclear. We found that the components of the β -catenin-dependent pathway regulate spindle orientation in metaphase, and other Wnt signaling pathways, the β -catenin-independent pathway controls the completion of cytokinetic abscission. Our findings suggest that the Wnt signaling pathways govern multiple events in mitosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：Wnt シグナル経路、 β -catenin 依存性経路、 β -catenin 非依存性経路、紡錘体軸、微小管-動原体結合、紡錘体チェックポイント、細胞質分裂

1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナル経路（図1）は高等真核生物において高度に保存されたシグナル伝達経路であり、細胞増殖・分化、細胞極性、細胞遊走などの多様な現象に関与することが知られている。Wnt シグナル経路には大きく、 β -catenin 依存性経路と非依存性経路の二つ

が存在し、細胞外分泌蛋白質である Wnt とその受容体である Frizzled (Fz)、LRP5/6、Ror1/2 などの組み合わせにより下流のシグナル経路を決定する。 β -catenin 依存性経路は、 β -catenin を介して G1/S 期の移行に関与し、その経路の破綻は細胞のがん化を引き起こすことが知られている。いままでの Wnt シ

グナル経路に関する研究は、遺伝子発現調節や細胞骨格制御に伴う細胞運動等の間期における細胞応答解析が主であり、「有糸分裂期における機能と細胞周期に依存した制御機構」については詳細な解析が進んでいなかった。

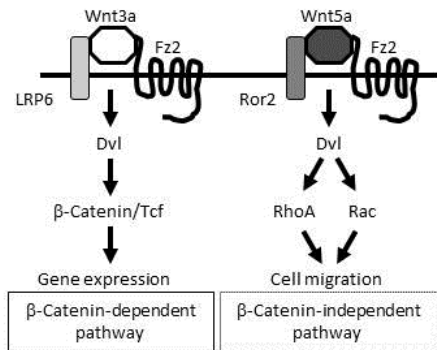


図1 Wnt シグナル経路

Wnt シグナル経路には大きく、β-catenin 依存性経路と非依存性経路の二つが存在する。

2. 研究の目的

本研究は、細胞周期における Wnt シグナル経路の役割とがん化の連関を理解するために、「Wnt シグナル経路が有糸分裂期において機能するか」という事に焦点を当て、開始した。すなわち、本研究の目的は、Wnt シグナル経路の有糸分裂期における機能と細胞周期に依存した Wnt リガンドの発現調節機構を解明し、新規の発がん制御機構を理解することである。

3. 研究の方法

本研究の開始までに得られた研究成果に基づき、次の3点について研究を計画した。

(1) 有糸分裂期における Wnt シグナル経路の制御機構…平面培養系における細胞周期解析

(2) 細胞周期に依存した Wnt リガンドの発現調節機構…平面培養系における細胞周期解析

(3) 細胞周期に依存した Wnt シグナル経路の機能と上皮極性…3次元培養系による解析

(1)及び(2)については、細胞周期解析により細胞周期に依存した Wnt シグナル経路構成因子の挙動を確認し、RNA 干渉法により表現型解析を行うことにした。また、(2)では、前述の解析方法により得られた結果に基づいて、Wnt リガンドの調節因子の同定を行うことにした。(3)については、(1)及び(2)で得られた結果に基づき、細胞外マトリックスを含有するゲルを用いた3次元培養法により有糸分裂期-Wnt シグナル経路-上皮極性の3者の連関を解析することにした。

4. 研究成果

(1) Wnt シグナル経路の構成因子による紡錘体軸・微小管-動原体結合・紡錘体チェックポイントの制御機構

本研究を開始するにあたり、Wnt シグナル経路の構成因子のひとつである Dvl2 が紡錘体軸の制御に関与すること、及び、紡錘体チェックポイントに関与することを明らかにしていた。さらに、本研究の研究計画概要に沿って研究を進め、以下の知見が得られた。本研究成果は EMBO Journal (Kikuchi et al., 29, 3470-3483, 2010) において公表済である。

① 細胞周期解析により Dvl2 が有糸分裂期特異的に Plk1 と複合体を形成し、リン酸化を受けることを見出した。さらに、*in vitro* キナーゼアッセイにより、Plk1 によって Dvl2 の 206 番目のスレオニン (以下、T206) がリン酸化を受けることを同定した (図2)。

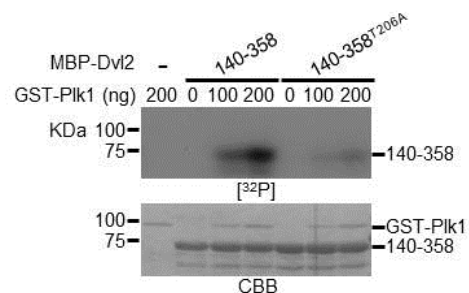


図2 Plk1 による Dvl2 のリン酸化

Plk1 は *in vitro* において全長 Dvl2 をリン酸化した。また、Dvl2 の欠失変異体を用いた解析からリン酸化部位がアミノ酸配列：140-358 の領域に存在することを見出し、さらに、Dvl2 のアミノ酸配列：140-358 の領域に存在する Plk1 のリン酸化コンセンサス配列に対し、それぞれ非リン酸化型変異体 (アラニン置換変異体) を作成し、T206 が Plk1 によりリン酸化を受けることを明らかにした。

② T206 に対する非リン酸化型変異体 T206A を作成し、Dvl2 による紡錘体軸の制御において、Plk1 による Dvl2 のリン酸化が必要であることを明らかにした (図3)。

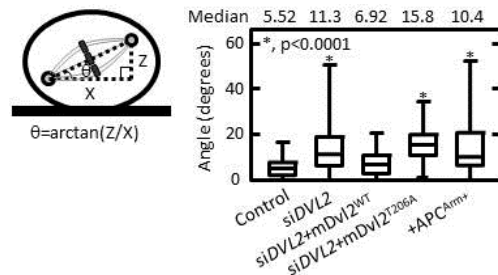


図3 Dvl2 による紡錘体軸の制御

左図：紡錘体軸の測定方法。細胞固定後、免疫染色により紡錘体極をγ-tubulin により染

色し、共焦点レーザー顕微鏡により Z 軸撮影を行い、取得した画像ファイルから X と Z を測定した後に、紡錘体軸の角度 (θ) を計算した。右図: Dv12 による紡錘体軸の制御。Dv12 ノックダウン細胞では紡錘体軸が有意に傾き、その傾きはマウス野生型 Dv12 を発現することにより相補された。一方で、T206A 変異体では相補されないことから、Plk1 による Dv12 のリン酸化が紡錘体軸の制御に関与することが示唆された。

③ 紡錘体軸の制御に加えて、Dv12 がリン酸化に依存して微小管-動原体結合を制御することを明らかにした (図 4)。

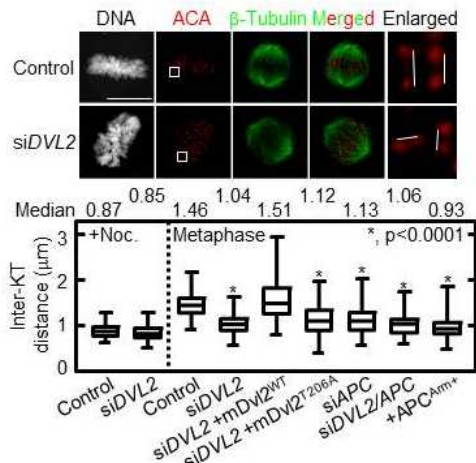


図 4 Dv12 による微小管-動原体結合の制御
Dv12 ノックダウン細胞では、微小管-動原体結合が减弱し、微小管からの張力が減少するため、姉妹動原体間の距離が短くなる。その距離の短縮はマウス野生型 Dv12 を発現することにより相補されたが、T206A 変異体では相補されないことから、Plk1 による Dv12 のリン酸化が微小管-動原体結合の制御に関与することが示唆された。

④ 有糸分裂期において、Dv12 が APC と複合体を形成することを見出した (図 5)。さらに、APC の Dv12 との結合部位である armadillo 領域の過剰発現 (APC と Dv12 の結合に対しドミナントネガティブに作用する) により、紡錘体軸と微小管-動原体結合の異常を引き起こした (図 3、4)。以上より、有糸分裂期における Dv12 と APC の結合が紡錘体軸と微小管-動原体結合の制御に関与することが示唆された。

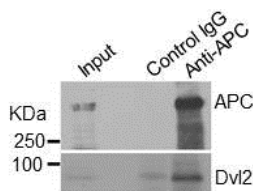


図 5 Dv12 と APC の複合体形成

HeLaS3 細胞を Thymidine-nocodazole block により同調培養し、有糸分裂期における Dv12 と APC の複合体形成を anti-APC 抗体を用いた免疫沈降法により確認した。

⑤ Dv12 がリン酸化非依存的に紡錘体チェックポイントの活性化に関与することを見出した。さらに、紡錘体チェックポイントキナーゼのひとつである Mps1 の活性化、及び、Bub1 と BubR1 の動原体集積に関与することを明らかにした (図 6)。

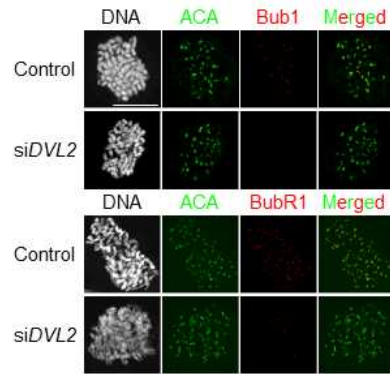


図 6 Dv12 による Bub1、BubR1 の動原体集積への関与

Bub1 と BubR1 は紡錘体チェックポイントの活性化に伴い、動原体に集積する。Dv12 ノックダウン細胞では Bub1 及び BubR1 の動原体への集積が减弱した。

⑥ Wnt の受容体である Fz2 と β -catenin 依存性経路の共役受容体のひとつである LRP6 が、Dv12 や APC と共に紡錘体軸の制御に関与することを明らかにした (図 7)。また、紡錘体軸の制御において β -catenin を介した遺伝子発現は必要なかった。

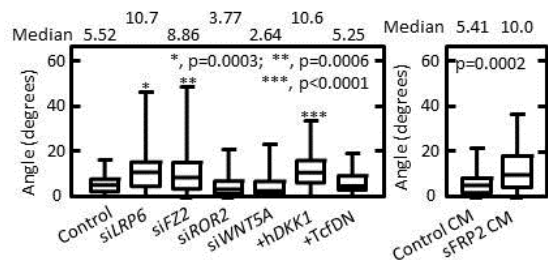


図 7 Fz2 及び LRP6 による紡錘体軸の制御

Fz2 ノックダウン細胞、及び LRP6 ノックダウン細胞では紡錘体軸の異常が観察された。一方で、 β -catenin 非依存性経路の Wnt リガンドである Wnt5a、及び、その共役受容体である Ror2 のノックダウン細胞では紡錘体軸の異常はみられなかった。

以上の研究成果により、Wnt シグナル経路の構成因子である Dv12 が有糸分裂期において紡錘体軸・微小管-動原体結合・紡錘体チェックポイントの制御機構に関与することが明らかになった (図 8)。さらに、Dv12 の

紡錘体軸における機能を明らかにする過程で、Wnt の受容体である Fz2 と β -catenin 依存性経路の共役受容体のひとつである LRP6 が β -catenin を介した遺伝子発現に寄らず、Dvl2 や APC と共に紡錘体軸を制御することが明らかになり、LRP6-Fz2-Dvl2-APC から成るシグナル経路により細胞表層と星状糸の結合を制御する可能性を提示することができた (図 8A)。

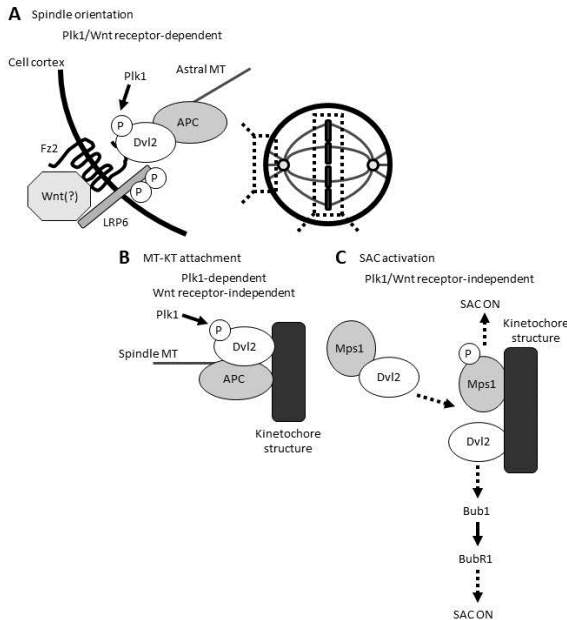


図 8 モデル図

Dvl2 は Plk1 のリン酸化依存的に紡錘体軸・微小管-動原体結合の制御に関与し (A、B)、Plk1 のリン酸化非依存的に紡錘体チェックポイントの制御に関与する (C)。また、LRP6-Fz2-Dvl2-APC から成るシグナル経路が細胞表層と星状糸の結合を制御することにより紡錘体軸を制御する可能性が示唆された (A)。

(2) Wnt5a シグナル経路による細胞質分裂の制御機構

(1) の研究過程で、Dvl2 が分裂後期から分裂終期において中間帯 (midzone) と中央体 (midbody) に局在し、さらに、Dvl1/2/3 トリプルノックダウン細胞 (以降、Dvl1 ノックダウン細胞とする) において、それぞれのシングルノックダウン細胞と同等に細胞質分裂異常の指標となる多核細胞が増加することを見出した (図 9)。また、Dvl1 ノックダウン細胞の表現型解析と平行して、 β -catenin 非依存性経路の Wnt リガンドである Wnt5a、及び、その共役受容体 Ror2 のノックダウン細胞においても多核細胞が有意に増加することを見出した (図 10)。当初の予定では、(1) の結果を踏まえ、3次元培養系による紡錘体軸の制御機構と上皮極性形成機構の連関を解析する予定であったが、以上の結果

に基づいて、細胞質分裂における Wnt シグナルの役割を解析することにし、以下の知見が得られた。

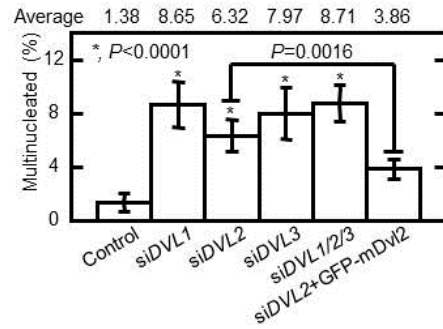


図 9 Dvl1 ノックダウン細胞における多核細胞の増加

コントロール細胞と比較し、Dvl1 ノックダウン細胞において、細胞質分裂異常の指標となる多核細胞が増加した。また、それぞれのシングルノックダウン細胞においても同様に多核細胞が増加し、マウス野生型 Dvl2 の発現により Dvl2 シングルノックダウン細胞において確認された多核細胞の増加が抑制された。

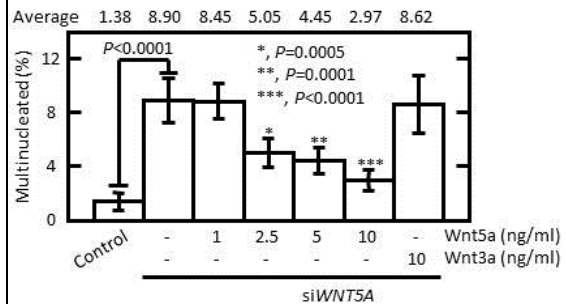


図 10 Wnt5a ノックダウン細胞における多核細胞の増加

コントロール細胞と比較し、Wnt5a ノックダウン細胞において、多核細胞が増加した。また、その多核細胞の増加は精製 Wnt5a タンパク質の添加により抑制され、精製 Wnt3a タンパク質では抑制されなかった。

① Dvl2 に加えて、Wnt シグナル経路の受容体である Fz2 が細胞質分裂時に中央体に局在した。また、Fz2 は分裂前期から後期までは細胞膜全周に局在するが、分裂終期移行後、Rab11 依存的にリサイクリングエンドソームを介して中央体に集積することが明らかになった。

② Dvl2 が Wnt5a シグナル経路依存的に中央体に集積することが明らかになった。

③ Dvl1 ノックダウン細胞、及び、Wnt5a ノックダウン細胞では細胞間橋を構成する微小管の安定性が低下し、ESCRT-III のサブユニットのひとつである CHMP4B (細胞質分裂終了時における膜器官分離に必要) の中央体にお

ける局在に異常がみられた。

④ Wnt5a シグナル依存的に Fz2 と CHMP4B が複合体を形成することを明らかにした。

以上の研究成果により、β-catenin 非依存性経路のひとつである Wnt5a シグナル経路が細胞質分裂時に、細胞間橋を構成する微小管の安定性を保持することにより、ESCRT-III のサブユニットのひとつである CHMP4B の中央体における局在を制御することにより、細胞質分裂終了時における膜器官分離に関与することが明らかになった。本研究成果は、Journal of Cell Science に投稿し、査読審査中である。

本研究では、平面培養系における細胞周期解析を取り入れることによって、有糸分裂期における Wnt シグナル経路の多様な機能を提示することができた。紡錘体軸の異常は細胞極性・細胞分化の異常に伴う発がんを引き起こす可能性があり、また、微小管-動原体結合、紡錘体チェックポイント、細胞質分裂の異常は染色体の不安定性に結びつくことから、発がんの要因となりうる。今後の展望として、本研究で得られた成果を元に、研究計画において提示した細胞外マトリックスを含有するゲルを用いた 3 次元培養系の解析を行う事により、Wnt シグナル経路の異常に伴う細胞周期の進行異常が上皮極性に影響するか否かを評価し、その結果を個体レベルにおける解析に展開したいと考えている。

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 3 件)

- ① Kikuchi, K., Niikura, Y., Kitagawa, K., and Kikuchi, A. Dishevelled, a Wnt signalling component, is involved in mitotic progression in cooperation with Plk1. EMBO J. 29, 3470-3483. 2010. 査読有
- ② 菊池浩二、菊池章 細胞周期制御における Wnt シグナルの役割 医学のあゆみ 233, 960-965. 2010. 査読無
- ③ Niikura, Y., Ogi, H., Kikuchi, K., and Kitagawa, K. BUB3 that dissociates from BUB1 activates caspase-independent mitotic death (CIMD). Cell Death Differ. 17, 1011-1024. 2010. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 麓勝己、菊池浩二、菊池章 Novel function of Dvl, a Wnt signaling molecule, in cytokinesis. 第 34 回日本

分子生物学会年会、2011 年 12 月 15・16 日、パシフィコ横浜 (横浜市)

- ② 菊池浩二、菊池章 Dishevelled, a Wnt signaling component, is involved in mitotic progression in cooperation with Plk1. 新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」平成 22 年度がん若手研究者ワークショップ、2011 年 9 月 1 日-4 日、アートランドホテル蓼科 (長野県・茅野市)
- ③ 菊池浩二、菊池章 Dishevelled, a Wnt signaling component, is involved in mitotic progression in cooperation with Plk1. BMB2010、2010 年 12 月 9 日・10 日、神戸ポートアイランド (神戸市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.medphas.kumamoto-u.ac.jp/research/bunya/8.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 浩二 (KIKUCHI KOJI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：70457290