

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570235

研究課題名(和文)HIPK2を制御する新規Wnt経路分子の探索

研究課題名(英文)Regulation of HIPK2 and TCF proteins by Wnt signaling

研究代表者

日笠 弘基(Hikasa, Hiroki)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：40596839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：Wnt上流因子によるHIPK2とTCFタンパク質の制御メカニズムの解明を目的とした本研究において、Wnt刺激やGSK3の阻害により“cateninの安定化”と“TCF3のリン酸化”が同時に起こり、“TCF1/LEF1による転写活性化”と“TCF3による転写抑制の解除”が協調していることを発表した。さらに、HIPK2/TCF3経路を含むWnt経路と初期胚のパターン形成に関する最近の知見を総説および書籍にまとめた。また、GSK3によるHIPK2の制御機構や、発現スクリーニングにより同定された新規因子とHIPK/TCF3との相互作用をin vitroおよびin vivoの実験系で検討中である。

研究成果の概要(英文)：Previously we demonstrated that TCF3 phosphorylation by Wnt/HIPK2 signaling is essential for embryonic axis specification. However, there had been still a missing link between Wnt ligands and HIPK2, which may be able to explain how Wnt stimulation trigger HIPK2-mediated phosphorylation of TCF3. In this study, we reported that GSK3 inhibition triggers the phosphorylation of TCF3, a repressor type of TCF proteins and that phosphorylated TCF3 is replaced on the target promoter with a positively acting TCF1 upon Wnt/HIPK2-mediated phosphorylation. Moreover, we reviewed recent findings referring a role of Wnt signaling during vertebrate axis specification in a journal and a book. We are currently working on regulation of HIPK2 by GSK3 and a mutual interaction between HIPK2/TCF3 complex and a novel HIPK2-interacting protein identified by expression screen.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：Wnt HIPK2 TCF proteins Switch mechanism

1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナルは、GSK3 を阻害することで転写コアクティベーターである β -catenin を安定化し、核に移行した β -catenin は TCF タンパク質と複合体を形成し、標的遺伝子の転写を活性化すると考えられている。しかしながら、TCF タンパク質ファミリーの一つである TCF3 は、標的遺伝子の発現を抑制し、初期胚パターン形成および胚性幹細胞の多能性を制御しており、Wnt 刺激とは機能的に逆であり、その制御機構は不明であった。我々は、アフリカツメガエル初期胚および培養細胞の系において、Wnt シグナルが HIPK2 を介して TCF3 をリン酸化し、そのリン酸化が標的 DNA への結合を弱め、結果として背腹パターン形成に重要な標的遺伝子の転写促進に働いていることを明らかにした。これらの研究により、Wnt シグナルによる TCF3 の制御機構と発生および生体における TCF3 タンパク質のリン酸化の意義が明らかになってきた。

2. 研究の目的

Wnt 経路の体系的な理解は、がん治療薬や iPS 細胞樹立効率を上げる薬剤開発に大いに役立つことが期待される。Wnt 経路の最下流の転写因子である TCF ファミリーは 4 種類存在し、転写を正に制御する TCF1/LEF1 等とその転写活性化共役因子である β -catenin はこれまで多くの研究がなされてきたものの、転写を負に制御する TCF3 に至っては、Wnt 経路によってそもそも制御されるのか、またどのように制御されるのか等全く未知であった。さらに、TCF3 は転写抑制因子として作用し、ES 細胞や iPS 細胞の多能性の維持や初期胚の体軸パターン形成の鍵分子であるゆえに、申請者は、TCF3 の制御機構に注目し、解析をすすめた。その結果、Wnt 刺激に応答して TCF3 結合タンパク質である HIPK2 キナーゼが TCF3 をリン酸化して標的 DNA への結合を弱め、結果として転写促進に働くことを示した。本研究は申請者のこれまでの研究をさらに発

展させ、未だ不明である HIPK2 よりも上流の Wnt シグナル経路および HIPK2 活性化のメカニズムを解明するとともに、これまでわかっている Wnt- β -catenin -TCF1/LEF1 経路との共通性や相違点を検討し、Wnt 経路の全貌を解明して新展開を図る。

3. 研究の方法

本研究では以下の 2 つの研究を遂行した。

(1) **新規 Wnt-HIPK2-TCF3 経路と Wnt- β -catenin -TCF1/LEF1 経路の比較**
GSK3 の抑制を介した β -catenin -TCF1/LEF1 経路を活性化すること知られている標準型 Wnt リガンドが、TCF3 のリン酸化にも関わることを見いだしたので、これら 2 つの経路がどこまで共通なのかを検討する。そこで、標準型 Wnt 経路の各段階における構成因子 (Wnt リガンド、LRP6、GSK3、Axin 等) の野生型および優勢阻害型をアフリカツメガエル胚に発現させて、各々の TCF タンパク質の分子変化や生理作用を解析する。

(2) **Wnt-HIPK-TCF3 経路に関わる遺伝子の網羅的ライブラリー探索**

アフリカツメガエル原腸胚 cDNA ライブラリー由来の mRNA プールを、初期胚の背側もしくは、腹側割球に注入して、背側および腹側原腸胚外植体における TCF3 の生化学的変化を指標として、この経路に関わる構成因子を網羅的に単離し、その生理作用を解明する。

上記(1)(2)の方法によって、Wnt-HIPK-TCF3 経路に関わるシグナル構成因子を明らかにするとともに、これまで十分解析されてきた Wnt- β -catenin-TCF1/LEF1 経路との共通性や相違点を検討する。

4. 研究成果

(1) **新規 Wnt-HIPK2-TCF3 経路と Wnt- β -catenin -TCF1/LEF1 経路の比較**

本研究において、Wnt リガンドおよび LRP6 受容体の過剰発現や、優勢阻害変異体を用い

たGSK3またはAxinの抑制によって、“ β cateninの安定化”と“TCF3のリン酸化”が同時に起こることを見いだした(図1)。

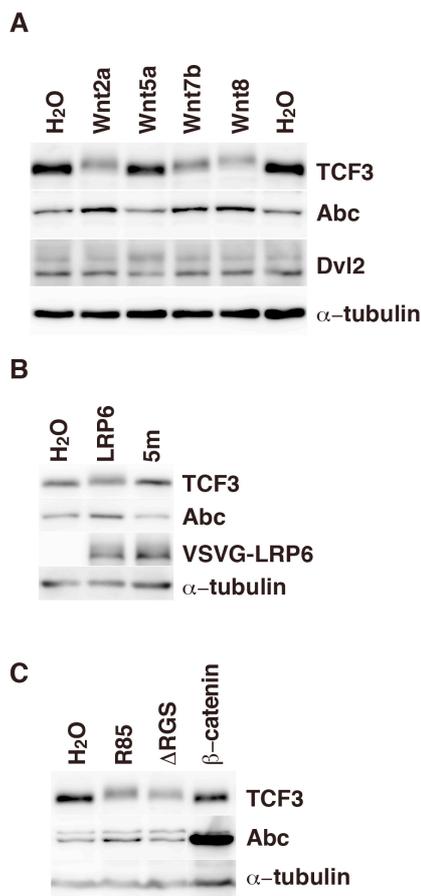


図1 標準形Wntシグナルは β -cateninの安定化とTCF3のリン酸化を同時に引き起す標準形Wntリガンド(A)、LRP6受容体(B)、およびGSK3(R85)とAxin(Δ RGS)の優勢阻害変異体(C)は外胚葉外植体において β -cateninの脱リン酸化(Abc)およびTCF3のリン酸化を促進する。

さらに、Wnt-HIPK2シグナルによりTCF3がリン酸化されることで、標的遺伝子の制御領域から転写抑制因子であるTCF3が解離すると同時に、転写活性化因子であるTCF1が入れ替わりに結合することをクロマチン免疫沈降法により明らかにした。これらの結果をもとに、申請者は、Wnt-HIPK2シグナルが“TCF3による転写抑制”から“TCF1/LEF1による転写活性化”への協調的な入れ替わりを制御し、Wnt標的遺伝子の発現を増大させるというスイッチモデルを提唱し(図2)、J.Biol.Chemに発表した。さらに、HIPK/TCF3経路を含むWnt経路による脊椎動物初期胚の

パターン形成の制御に関する最近の知見をCold Spring Harbor Perspective in Biologyに総説として発表し、さらに、C. S. H. pressから書籍(Wnt signaling)として出版した。

現在、GSK3によるHIPK2の制御機構を解析中であり、GSK3がHIPK2に結合し、特定部位をリン酸化することで、HIPK2のキナーゼ活性を抑制し、逆にWnt刺激はGSK3によるHIPK2のリン酸化を阻害してキナーゼ活性を上昇させることをin vitroの実験系で見だし、in vivoでもその作用を検討中である。

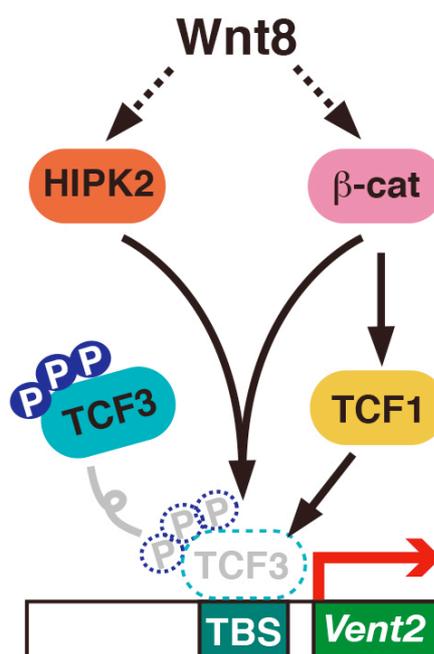


図2 標準形WntシグナルによるTCF3とTCF1の制御(スイッチモデル)

(2) Wnt-HIPK-TCF3経路に関わる遺伝子の網羅的ライブラリー探索

TCF3のタンパク質レベルの変化を指標とした、アフリカツメガエル胚発現スクリーニングにより、TCF3のリン酸化に変化を与える因子を複数同定した。そのうちの1つであるHippo経路のエフェクターYAPはTCF3のリン酸化を促進し、TCF3およびHIPK2と複合体を形成することを見いだした。今後、これら三者のリン酸化を介した相互作用とその生理的意義をほ乳類培養細胞および垂アフリカツメガエル胚を用いて検討していく予定である。

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. Hikasa H and Sokol S Y*.

Wnt signaling in vertebrate axis specification, Cold Spring Harbor Perspective in Biology, 5(1) (2013)

2. Nishio M, Hikasa H and Suzuki A. (2 4人中12番目)

Cancer susceptibility and embryonic lethality in Mob1A/1B double mutant mice, J. Clin. Invest., 122(12) 4505-18

3. Hikasa H and Sokol S Y*.

Phosphorylation of TCF proteins by homeodomain-interacting protein kinase 2, J Biol. Chem., 286(14), 12093-100 (2011)

4. Sasaki M, Kawahara K, Nishio M, Hikasa H and Suzuki A. (23人中11番目)

Regulation of the MDM2-P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11, Nat. Med., 17 (8) 994-51 (2011)

[学会発表] (計 1 件)

日笠弘基、鈴木聡

リボソーム RNA 合成阻害剤は Hippo 経路エフェクター YAP/TAZ を活性化する

第36回日本分子生物学会年 神戸 12月 (2013)

日笠弘基、鈴木聡

内在性 YAP/TAZ 特異的レポーター遺伝子の開発とその応用

第35回日本分子生物学会年 福岡 12月 (2012)

Hikasa H, Suzuki A and Sokol S Y*.

Wnt/HIPK2 シグナルによる TCF3 のリン酸化とその機能調節

第7回宮崎サイエンスキャンプ (2011)

[図書] (計 1 件)

Hikasa H and Sokol S Y*.

Wnt signaling. C.S.H.press, (2013)

[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

日笠弘基 (Hikasa Hiroki)

九州大学 生体防御医学研究所 助教

研究者番号: 40596839

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: