

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590344

研究課題名(和文) Wntシグナル伝達におけるIQGAP1を介したカテニンの核内移行機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of beta-catenin nuclear translocation mechanism through IQGAP1 in Wnt signaling.

研究代表者

後藤 利保 (Goto, Toshiyasu)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：00517518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：Wntシグナル伝達経路は癌や胚発生において重要な働きを担い、 β -cateninの核内移行がシグナル伝達の鍵となる。本課題では、まず質量分析により、Wntシグナル分子のDVLと結合する足場タンパク質としてIQGAP1を同定し、Wntシグナル伝達経路でのIQGAP1の機能を解析した。

その結果、(1) IQGAP1はWntシグナル伝達に対してポジティブに機能すること、(2) IQGAP1はIQGAP1/ β -catenin/DVL2の複合体を形成すること、(3) 核内移行因子であるImportin- β 5やRanと結合能を有するIQGAP1を介することで複合体が核内に移行することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Wnt signaling pathway plays an important role in cancer and embryonic development, a key feature of Wnt signaling activation is beta-catenin nuclear translocation.

In this study, we first identified IQGAP1 as a scaffold protein that binds DVL, one of Wnt signaling molecules. Then we analyzed the function of IQGAP1 in Wnt signaling pathway.

As a result, (1) IQGAP1 functioned as a positive regulator of Wnt signaling. (2) IQGAP1 complexed with beta-catenin and DVL2. (3) IQGAP1 was capable to bind with Importin-beta5 and Ran so that the above complex translocated into the nucleus.

研究分野：発生生物学

キーワード：IQGAP1 Wnt シグナル伝達 β -catenin 核内移行 アフリカツメガエル

1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナル伝達は組織の癌化や胚発生での遺伝子発現など多くの生命現象に関与しており、特に Wnt 標的遺伝子の発現に関与する Canonical 経路においては、 β -catenin の細胞質内での安定化と、それに伴う β -catenin の核内移行の増加が必要である (Clevers, Cell, 127:469-480 2006)。細胞質中では Wnt シグナルによる DVL の活性化が β -catenin のリン酸化を防ぎ、APC/axin/GSK3 からなる分解複合体から β -catenin を解離することで安定化を促す (Peifer and Polakis, Science, 287:1606-1609, 2000)。核内では β -catenin が TCF 等の転写因子との共作用で Wnt 標的遺伝子を活性化する (Brenz and Clevers, Cell, 103:311-320, 2000)。細胞質、及び核内での β -catenin と関連遺伝子の分子機構に関する知見は多いが、 β -catenin の核内移行の分子機構に関する知見はほとんど無かった。先行研究において、Dishevelled (DVL) を用いた質量分析により、IQGAP1 が DVL の結合タンパク質として同定された。IQGAP1 は β -catenin、DVL と複合体を形成し、各々の遺伝子の機能欠失がお互いの核内移行を減少させた。IQGAP1 の機能欠失は、培養細胞での Wnt 標的遺伝子の発現を減少させ、胚発生での Wnt 刺激により誘導される二次軸形成を抑制した。以上より IQGAP1 が Wnt シグナル伝達に関与していることが示唆されていた。さらに、質量分析により、核内移行因子の Importin- β ファミリー遺伝子のいくつかは IQGAP1 と結合することも分かり、IQGAP1 がタンパク質の核内輸送に関わることも示唆された。IQGAP1 は細胞骨格の構築、細胞間接着、転写調節などに関わる種々のシグナル伝達経路での足場タンパク質として機能し、培養細胞では癌の腫瘍化や転移を促進する遺伝子としても報告されている (White et al., FEBS Lett., 583:1817-1824, 2009)。しかし、

IQGAP1 が Wnt シグナル伝達経路での β -catenin の核内移行に関与するといった報告は無かった。一方、DVL は上述のように細胞質中の β -catenin の分解の抑制、さらに核内での β -catenin との共作用による標的遺伝子の転写促進に必要である (Gan et al., J. Cell Biol., 180:1087-1100, 2008)。しかし、DVL においても β -catenin の核内移行に関与する報告例は無かった。そこで、Wnt シグナル伝達における β -catenin の核内移行に関する新たな作用機序を解明すべく、IQGAP1、DVL、 β -catenin、さらには、これらに関連する分子群 (Importin- β ファミリー遺伝子など) を解析しようと考えていた。

2. 研究の目的

Wnt シグナル伝達での β -catenin の核内移行に関して、IQGAP1 を中心に関連分子と合わせて、作用機序を解明することを目的とし、以下の3点を目的とした。

(1) β -catenin/DVL2/IQGAP1 複合体形成時の各々のタンパク質の結合ドメインの解明、及び、核内輸送因子 Importin- β ファミリー遺伝子の上記複合体の核内移行への関与を明らかにしようと考えた。

(2) IQGAP、DVL はそれぞれ、3つの異性体が存在するが、異性体間での機能ドメインの相同性は高く、 β -catenin 核内移行の分子機構も保存されている能性は高い。よって、(1)で解明した IQGAP1 での作用機序を参考に、 β -catenin の核内移行に関する IQGAP、DVL の異性体の作用機序を解明しようと考えた。

(3) Importin- β ファミリーは Importin- β 、Transportin、Ran BP5 など 21 種類が存在し、Importin- β ファミリーの各遺伝子に対応して特定の基質タンパク質を核内へ輸送することが知られている。この 21 種類

の中から、培養細胞とツメガエルを用いた機能欠失実験により、Wnt シグナル伝達経路に関与する Importin- β ファミリー遺伝子を同定しようと考えた。

3. 研究の方法

研究では培養細胞 (HEK 293T) とアフリカツメガエル胚を用い、遺伝子発現や生化学的解析を行った。

(1) 結合ドメインの解析

各遺伝子のデリーションコンストラクトを作成し、培養細胞にそれらのプラスミドをトランスフェクションし、免疫沈降やウェスタンブロット法などの生化学的手法により、結合ドメインを調べた。

(2) 核内移行の解析

各遺伝子、及び、それらのデリーションコンストラクトに GFP を付加したコンストラクトの mRNA をツメガエル胚の 8 細胞期の動物極細胞にマイクロインジェクションし、初期囊胚期まで発生させ、動物極細胞由来の予定外胚葉領域細胞における GFP の蛍光発色を観察し、核内への移行が起こったかどうかを調べた。また、同時にウェスタンブロットにより、予定外胚葉領域細胞の核分画、細胞質分画での各タンパク質の発現量を調べ、核内でのタンパク質蓄積量 (核内移行の量変化) を解析した。Wnt 刺激は xWnt8 の mRNA の共注入により行った。

(3) 胚発生での解析

xWnt8 の mRNA を胚の腹側にマイクロインジェクションすると (Wnt 刺激により)、二次軸を形成することを利用し、IQGAP1 等の遺伝子、及び、それらのデリーションコンストラクトの mRNA (過剰発現の場合) やアンチセンスモルフォリノオリゴ (機能欠失の場合) を共注入し、二次軸の形成能への影響から Wnt シグナル伝達への影響を調べた。ま

た、同様にマイクロインジェクションした部位から RNA を抽出し、ツメガエルでの Wnt 標的遺伝子の発現量を qRT-PCR によって解析した。

(4) 培養細胞での遺伝子発現解析

IQGAP1 等の遺伝子、及び、それらのデリーションコンストラクトのプラスミド (過剰発現の場合) や siRNA (機能欠失の場合) をトランスフェクションし、Wnt 標的遺伝子の発現量を RT-PCR によって解析した。

4. 研究成果

(1) IQGAP1 複合体の解析

IQGAP1-DVL2 の結合は IQGAP1 の IQ repeat と Ras GAP like ドメインにまたがる部分と DVL2 の DEP ドメインよりさらに C 末端部分で結合することが分かった。IQGAP1- β -catenin の結合は IQGAP1 の C 末端領域で β -catenin と結合することが分かったが、 β -catenin は IQGAP1 との特定の結合ドメインを有さず、タンパク質全体として結合していることが分かった。さらに、Wnt 刺激により、 β -catenin/DVL2/IQGAP1 複合体が安定化することも明らかになった。

複合体の核内輸送に関して、質量分析より IQGAP1 と強く結合すると予測された Importin- β を核内輸送における有力候補として解析した結果、Importin- β は DVL2、 β -catenin とは結合せず、IQGAP1 とのみ結合することが分かった。この結果は IQGAP1 を介して β -catenin/DVL2/IQGAP1 複合体が核内輸送されることを示唆した。さらに IQGAP1 は核内輸送因子 Ran とも結合し、核内輸送で重要な役割を果たすことも示唆された。

(2) Wnt 標的遺伝子の発現等への影響

ツメガエル胚において、先行研究において IQGAP1 の機能欠失により、Wnt 刺激により

本来発現量が増加する標的遺伝子の発現量が抑制された。これらは、Importin- 5、Ran の機能欠失でも抑制され、新たに IQGAP1 と結合する遺伝子が Wnt シグナル伝達に関与していることが分かった。また、IQGAP1 の機能欠失による標的遺伝子の発現量の抑制は IQGAP1 の mRNA の過剰発現でレスキューされるが、DVL2、 β -catenin、Importin- 5 の結合ドメインを欠いた各 IQGAP1 コンストラクトの mRNA ではレスキューされず、IQGAP1/DVL2/ β -catenin/Importin- 5 が Wnt シグナル伝達において協調的に機能していることが示唆された。

(3) 核内移行への影響

ツメガエル胚を用いた IQGAP1 の機能欠失は細胞質中の β -catenin を減少させることはなく (β -catenin の分解機能には無関係) また、chip アッセイより IQGAP1 は Wnt の標的遺伝子のプロモーター上に結合することもなかった (核内での Wnt 標的遺伝子の転写活性化には無関係) 。このことから、先行研究で示された通り、IQGAP1 は主に β -catenin の核内の輸送に関わることが示唆された。

(4) 異性体の Wnt シグナル伝達への影響

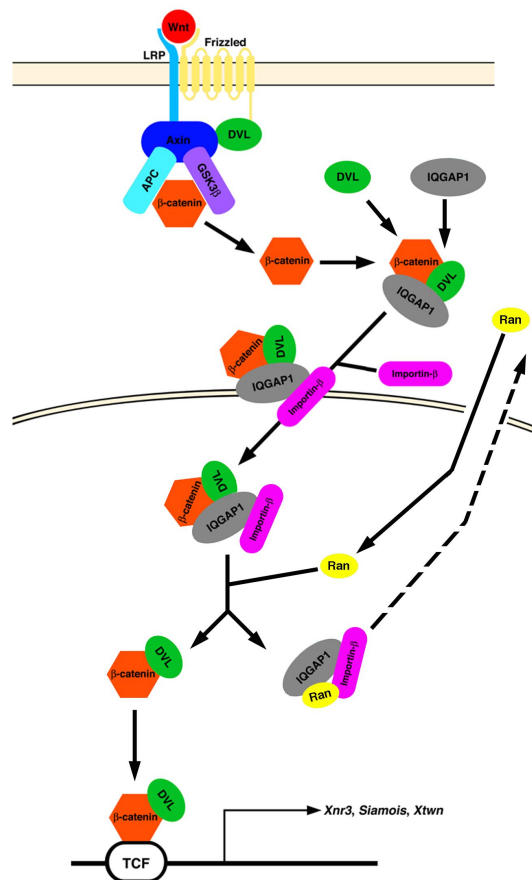
IQGAP、DVL にはそれぞれ、IQGAP1、IQGAP2、IQGAP3、DVL1、DVL2、DVL3 が存在する。IQGAP-DVL の結合は各異性体間で確認できた。しかし、ツメガエル胚における実験から、IQGAP1 の機能欠失は Wnt 標的遺伝子の発現を抑制する一方で、IQGAP2 の機能欠失では発現を増加させ、IQGAP3 では発現への影響はほとんど確認できなかった。これは IQGAP1 の Wnt シグナル伝達での機能の多様性を示唆する。DVL に関しては DVL2 単独の機能欠失よりも DVL1,2,3 の 3 異性体全ての欠失において、IQGAP1 や β -catenin の核内移行、及び、

Wnt 標的遺伝子の発現量の減少が確認されたことから、DVL においては機能が重複していることが示唆された。IQGAP1 と結合する Importin- ファミリー遺伝子として、Importin- 7 も同定されたが、Wnt シグナル伝達への明確な影響は確認できず、Importin- ファミリー間でも Wnt シグナル伝達における機能の多様性が確認できた。

(5) IQGAP1 の核内輸送における役割

Ran は核内では RanGEF の作用により GTP 結合型が多く、細胞質中では RanGAP の作用により GDP 結合型が多く存在する。IQGAP1 は核内輸送因子の Ran と結合するだけでなく、RanGAP と Ran との結合を阻害することで、Ran の GTP 結合タイプの存在比を増加させていた。これは IQGAP1 の核内輸送における新たな役割を示唆するものである。

本研究の成果から、下図のようなモデルが示唆された。



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

□ Goto T, Sato A, Adachi S, Iemura S, Natsume T, Shibuya H. (2013). IQGAP1 protein regulates nuclear localization of -catenin via importin- 5 protein in Wnt signaling. *J Biol Chem*. 査読有、 **288** 36351-36360. doi:

10.1074/jbc.M113.520528.

□ Goto T, Michiue T, Ito Y, Asashima M. Characterization of CXC-type chemokine molecules in early *Xenopus laevis* development. (2013). *Int J Dev Biol*. 査読有、 **57** 41-47. doi: 10.1387/ijdb.120223ma.

□ Goto T, Sato A, Shimizu M, Adachi S, Satoh K, Iemura S, Natsume T, Shibuya H. (2013). IQGAP1 functions as a modulator of dishevelled nuclear localization in Wnt signaling. *PLoS One*. 査読有、 **8** e60865. doi: 10.1371/journal.pone.0060865.

□ Shimizu M, Goto T (co-1st author), Sato A, Shibuya H. WNK4 is an essential effector of anterior formation in FGF signaling. (2013). *Genes Cells*. 査読有、 **18** 442-449. doi: 10.1111/gtc.12048.

[学会発表](計 3 件)

□ Goto T, Sato A, Adachi S, Iemura S, Natsume T, Shibuya H. IQGAP1 regulates nuclear localization of -catenin in canonical Wnt signaling. 第 36 回日本分子生物学会 (2013.12.05、神戸)

□ 後藤利保、伊藤弓弦、道上達男 アフリカツメガエル初期発生におけるケモカイン遺伝子の役割 第 7 回日本ツメガエル研究

集会 (2013.09.24、山口)

□ Goto T, Sato A, Shimizu M, Adachi S, Iemura S, Natsume T, Shibuya H. IQGAP1 functions as a modulator of Dishevelled nuclear localization in Wnt signaling. 第 8 回研究所ネットワーク国際シンポジウム (2013.06.27、京都)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

後藤 利保 (Toshiyasu Goto)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授
研究者番号 : 00517518

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし