

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590279

研究課題名（和文） シナプス形成における Wnt シグナル伝達経路の役割

研究課題名（英文） Function of Wnt signal in the formation of synapse

研究代表者

岸田 昭世（KISHIDA SHOSEI）

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50274064

研究成果の概要：

シナプス形成における Wnt-7a の作用機構の解析をするために、Wnt-7a 蛋白質の発現系の確立を行った。マウス L 細胞において Wnt-7a 蛋白質を培養上清中に分泌する細胞株を樹立した。

新規 Dvl 結合蛋白質候補 Hect 型ユビキチンリガーゼの全長 cDNA をクローニングして、動物細胞で発現ベクターを構築して Dvl との哺乳動物細胞内での分子間相互作用を解析したが、有意な複合体形成は認められなかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

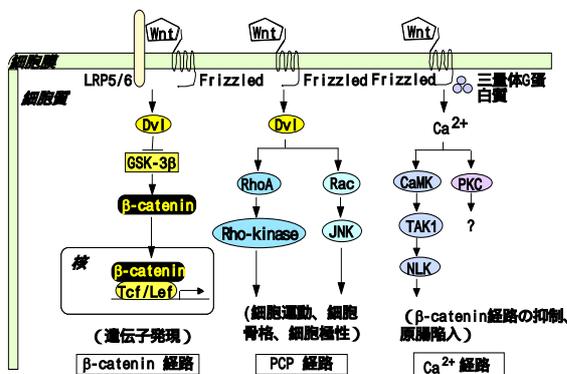
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：シグナル伝達、分子間相互作用、Wnt、シナプス形成

1. 研究開始当初の背景

Wnt は分子量約 4 万の分泌蛋白質である。ヒトでは、Wnt は 19 種類のホモログからなるファミリーを形成しており、それぞれ異なった機能を担うと考えられている。Wnt のシグナルが細胞膜上の受容体 Frizzled/LRP 複合体に結合するとそのシグナルは少なくとも 3 つの経路に分かれて細胞内に伝達される。すなわち、 β -カテニン経路、PCP 経路、Ca 経路である（下図参照）。



β -カテニン経路では、Wnt のシグナルは受容体から細胞内の Dvl を介して蛋白質リン酸化酵素 GSK3 を抑制し、 β -カテニンの安定化、転写因子 TCF による遺伝子発現促進を行う。PCP 経路は、低分子量 G 蛋白質、JNK、Rho キナーゼを介して細胞骨格を制御する。Ca 経路は、細胞内のカルシウムを動員して、PKC、CaM キナーゼを活性化する。それぞれの Wnt とどの Frizzled 受容体が結合してシグナルを伝えるか、あるいはどの経路が刺激されて亢進するかについても、不明な部分が多い。ノックアウトマウスの解析から、Wnt-7a は小脳顆粒細胞のシナプス形成に関わることが示唆されているが、どのようなシグナルを介してかは明らかではない。

2. 研究の目的

Wnt-7a の細胞内シグナル伝達機構を明らかにするため、細胞内で Wnt-7a の作用を仲介する Dvl に着目して、Dvl の結合蛋白質を検索する。Dvl 結合蛋白質を検索するとともに、Dvl と HECT 型ユビキチンリガーゼが生理的な条件下で複合体を形成するか否かを解析し、この結合たんぱく質が Dvl のユビキチン化と分解や神経細胞におけるシナプス形成を制御するか否かを培養神経細胞などを用いて解析する。

そこで、本研究では Wnt-7a が制御する細胞内シグナルを明らかにして、シナプス形成の制御機構の解明に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Wnt-7a の精製と機能の解析：Wnt-7a は小脳でのシナプス形成の時期に、神経細胞（顆粒細胞）から分泌されている。Wnt-7a の細胞内シグナル伝達機構を明らかにするため、可溶性 Wnt-7a の発現系を構築し、各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製を試みる。

(2) 新規 Dvl 結合蛋白質の検索：私どもは Dvl がシナプトタグミンと結合し、シナプス小胞に存在することを見いだしている。Dvl はシナプス形成に与与する可能性が示唆され、シナプス前領域の Cytomatrix マーカー蛋白質 Basoon と共局在することが報告されているが、その直接の作用機構は不明である。そこで、酵母 two-hybrid 法やマウス、ラットの神経組織抽出液から新規 Dvl 結合蛋白質をアフィニティクロマトグラフィーによ

り精製して、その一次構造を同定し cDNA クローニングを行う。

4. 研究成果

(1) 新規 Dvl-2 結合蛋白質について

今回行った酵母 two-hybrid 法による Dvl-2 結合蛋白質候補として -galactosidase 陽性のクローンは 400 個以上を単離したが、cDNA として in frame となっている分子は表 1 のとおりであった。casein kinase I epsilon や Dapper、Daple、Synaptotagmin XI、Dvl-3、adaptor-related protein complex 2 mu subunit についてはいずれも既に他のグループや私どもが Dvl 結合蛋白質として報告している分子であった。

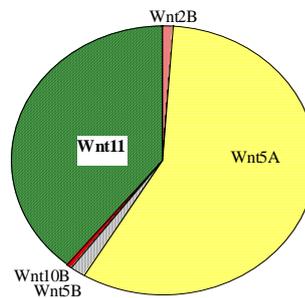
そこで、これまでに報告の無い HECT domain をもつユビキチンリガーゼ NM_015902.4 と MGC 164367 coiled-coil type PKB/Akt-binding protein については、動物細胞での発現ベクターを作製し、細胞内で発現させ Dvl-2 との複合体形成を解析したが、両者とも全長 cDNA では Dvl-2 と複合体を形成しなかった。

表 1 Dvl-2 結合蛋白質候補

NM_001894.4	casein kinase 1 epsilon
NM_016651.5	Dapper
NM_001080414.2	Daple
NM_152280.2	synaptotagmin XI
MMU41285	Dvl-3
NM_004068.3	adaptor-related protein complex 2, mu subunit
NM_015902.4	ubiquitin protein ligase E3, HECT domain
MGC 164367	coiled-coil type PKB/Akt-binding protein

(2) 脳腫瘍 (glioma) 由来細胞における Wnt ファミリーの発現

ヒト glioma 由来 U251 細胞における Wnt1 ~ 16 cDNA の発現を示す (下図参照)。Wnt-5 と Wnt-11 の発現が多く (いずれも total RNA 1 µg あたり 1,000,000 コピー以上) 認められ、その他に Wnt-2b と Wnt-5b の発現も中等度認められた。他の Wnt ファミリーについては全体の 1%以下であったため、表示していない。



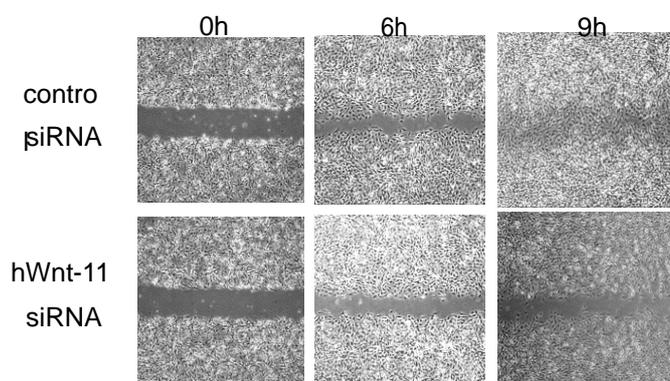
U251 ヒト glioma 由来細胞株における Wnt 遺伝子の発現 total RNA 1 µg 当たりの各 Wnt ファミリーの発現量を定量し、コピー数を基に全 Wnt 発現コピー数を 100% として表示した。

(3) ヒト glioma 細胞における Wnt-11 の役割の解析

大腸がんや悪性黒色腫などで Wnt の細胞内シグナル伝達経路の異常により遺伝子発現亢進が生じた結果、過剰な細胞増殖が起こり発癌のきっかけとなることは広く認められている。最近、Wnt-5a については glioma での発現が細胞増殖と関与する事が韓国のグループより報告されている。Wnt-11 は細胞極性を制御して、初期発生時の原腸陥入に関与することが知られており、二次性の glioblastoma での高発現が報告されているが、その生理的意義については明らかにされていない。glioma では、腫瘍細胞が正常脳組織に浸潤することが治療上、治癒的切除を困難にしており、腫瘍細胞の接着や細胞運動が病態に関与する可能性があると考えられる。

そこで、wound healing アッセイにより、

Wnt-11 を RNAi でノックダウンした細胞と対照群を比較し、細胞運動における Wnt-11 の働きを解析した。ノックダウンにより glioma 由来 U251 細胞での Wnt-11 の遺伝子発現は約 30% に抑制された。この条件下で、スクラッチ後の細胞を観察すると、対照群では 9 時間で完全に wound healing がみとめられたが、Wnt-11 ノックダウン群では 9 時間後でも wound healing が完了せず、細胞運動の遅延が示唆された（下図参照）。



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. Tabata A., Sheng JS., Ushikai M., Song YZ., Gao HZ., Lu YB., Okumura F., Iijima M., Mutoh K., Kishida S., Saheki T. and Kobayashi K. Identification of 13 novel mutations including a retrotransposal insertion in SLC25A13 gene and frequency of 30 mutations found in patients with citrin deficiency., J. Hum. Genet., 査読：有, 53 巻, (2008), 534-545

2. Kishida S., Hamao K., Inoue M., Hasegawa M., Matsuura Y., Mikoshiba K., Fukuda M. and Kikuchi A. Dvl regulates endo- and exocytotic processes through binding to synaptotagmin., Genes Cells, 査読：有, 12 巻, (2007), 49-61

3. Kikuchi A., Yamamoto H. and Kishida S., Multiplicity of the interaction of Wnt proteins and their receptors., Cell Signal., 査読：有, 19 巻, (2007), 659-671

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸田 昭世 (KISHIDA SHOSEI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50274064

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし