

平成 21 年 4 月 28 日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2007 -2008
 課題番号： 19390082
 研究課題名 (和文) 新規 Dlg シグナル伝達経路の解析

研究課題名 (英文) The Dlg signal transduction pathway

研究代表者

秋山 徹 (Akiyama Tetsu)
 東京大学・分子細胞生物学研究所・教授
 研究者番号： 7 0 1 5 0 7 4 5

研究成果の概要： Dlg-Runx-sFRP2-Wntシグナル伝達経路の実体と生理的意義を明らかにすることを目的として研究を行い、以下の成果を得た。1) RunxがA-MybおよびRhoA特異的 guanine nucleotide exchange factor Net1と複合体を形成することを見出した。3) Dlg^{-/-}細胞ではProBからPreBへの分化に異常があることが確認された。4) Dlg^{-/-}マウスでは、心室中核欠損、口蓋裂、腎泌尿器系の発生異常を起こすことを見出した。5) ヒト乳癌培養細胞株 3 5 種類についてDlgの変異が存在しないことを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2 0 0 7 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2 0 0 8 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・病態医化学

キーワード： Dlg、Runx、Wnt シグナル、sFRP2、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

癌抑制遺伝子 *dlg* に変異が起きて失活すると、*Drosophila* の成虫原基の上皮細胞が極性を失うと同時に異常増殖を起こして癌化することや、神経細胞のシナプス構造に異常が生じることが知られている。*dlg* 遺伝子産物、そのヒトホモログ Dlg、シナプスに多量に存在する PSD95 などの蛋白質は、共通して

PDZ ドメイン、SH3 ドメインおよび GK (guanylate kinase-like) ドメインからなっている。これらの蛋白質は、細胞膜裏打ち蛋白質として、受容体やイオンチャンネルのクラスタリングを引き起こす活性をもち、細胞膜での蛋白質複合体の構築に重要な役割を果たしている。また、シグナル伝達分子と結合してシグナルを伝えるための足場にもなることが明らかにされており、これらの機能

を通して増殖制御、シナプス可塑性などに関与していると推定されてきた。

我々は、Dlgが大腸癌の癌抑制遺伝子APCの産物と複合体を形成し、細胞周期の進行を負に制御する活性をもつこと、パピローマウイルスのE6やHTLVのTaxなどと複合体を形成することを明らかにし、Dlgがほ乳類でも癌抑制遺伝子として機能する可能性があることを見出した。事実、Dlgノックアウトマウスを作製すると、マウスのbackgroundによっては、ヘテロマウスに乳癌、B-NKリンフォーマ、悪性繊維性組織球腫、poroid hydradenomaが発症することを見出した。

さらに、Dlgの機能を明らかにするために、wild-typeとDlgノックアウトマウスから調製したMEFのアレイ解析を行ったところWntシグナル抑制因子sFRP2の発現がDlg^{-/-}マウスで低下していることが明らかとなった。その結果、RunxがsFRP2のプロモーター領域に結合して転写活性化を引き起こすこと、Dlg^{-/-}MEFではこの活性化が起こらないことを見出した。さらに、Dlg^{-/-}MEFでは、sFRP2の発現が低下した結果、β-cateninが蓄積しWntシグナルの異常な亢進が起きていることを見出した。

また、MEFだけでなく胎児血球系細胞においても同様にDlg-Runx-sFRP2というシグナル伝達経路が機能していることを明らかにした。Dlg^{-/-}マウスの胎児血球系細胞ではsFRP2の発現が低下して、β-catenin量が増大しWntシグナルが亢進していることも確認した。そこで、このシグナル伝達経路の血球分化における重要性を明らかにするために、E14.5 Dlg^{-/-}マウスの肝臓から得た血球系細胞を成体マウスに移植し、キメラマウスを構築することによって成体での解析を行った(Dlg^{-/-}マウスは出生直後に死亡するため成体マウスの血球系細胞の解析はできない)。その結果、Dlg^{-/-}細胞では、pro-B (B220⁺/CD43⁺)に異常は見られないが、Pre-B (B220⁺/CD43⁻)が減少することが明らかになった。さらに成熟B細胞もやや減少傾向を示すことから、Pro-BからPre-Bへの分化の移行が阻害されていると考えられた。また、この現象は細胞自律的に起こると考えられた。したがって、DlgシグナルはPro-BからPre-Bへの分化の移行を促進するはたらきをもつと考えられた。

2. 研究の目的

Dlg-Runx-sFRP2-Wntシグナル伝達経路の実体と生理的意義を明らかにすることを目的として以下の研究を行う。

(1) DlgからRunxに至るシグナル伝達経路を構成する因子群を同定し、このシグナル伝達経路の分子レベルでの実体を明らかにする。

(2) B細胞の分化におけるDlg-Runx-sFRP2-Wntシグナル伝達経路の生理的重要性をさらに明らかにする。

(3) 上顎骨の低形成、腎臓、泌尿器の発生異常、心室中隔欠損症の発症とDlg-Runx-sFRP2-Wntシグナル伝達経路の異常との関連を明らかにする。

(4) ヒト乳癌でのDlgの変異を検索する。変異の見出される細胞を用いてDlg-Runx-sFRP2-Wntシグナル伝達経路の異常を解析し、癌化における重要性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) DlgからRunxに至るシグナル伝達経路を構成する因子群の解析:

Dlg-Runxシグナル伝達経路の実体をDlgの側から明らかにするために、Dlgをbaitとしたyeast two-hybrid systemによりDlg結合蛋白質を検索する。

Dlg-Runxシグナル伝達経路の実体をRunxの側から明らかにするために、Runxをbaitとしたyeast two-hybrid systemによりRunx結合蛋白質を検索する。

同様の趣旨で、Flag-DlgあるいはFlag-Runxを293細胞に発現させて免疫沈降し、共沈する蛋白質を質量分析により同定する(産総研 夏目徹博士との共同研究)。

上記1) - 3)により得られた候補につきin vitroおよびin vivoのpull-down assayによるDlgあるいはRunxとの結合、局在の一致を確認する。

(2) B細胞の分化におけるDlg-Runx-sFRP2-Wntシグナル伝達経路の生理的重要性の解明:

IL-7を添加したメチルセルロース培地でのPreBコロニーアッセイを行う。さらにレンチウイルスを用いてsFRP2を過剰発現してDlg^{-/-}血球系細胞におけるB細胞系の異常がrescueされるかを確認する。

(3) 上顎骨の低形成、心室中隔欠損症、腎臓、泌尿器の発生異常とDlg-Runx-sFRP2-Wntシグナル伝達経路の異常との関連の解析:

Wild-typeとDlg^{-/-}マウスの胎児組織について継時的にDlg、sFRP2、β-cateninの発現を抗体染色によって検討する。腎臓、神経堤についても同様の検討を行う。

(4) ヒト乳癌細胞株におけるDlg変異の検索とDlgシグナル伝達経路の役割の解析:

乳癌培養細胞株36種類からcDNAを抽出しPCRによりDlg遺伝子を増幅し塩基配列を決定する。変異の見出される細胞が得られた場合には、Dlg-Runx-sFRP2-Wntシグナルの異常が起きているかどうかを検討する。異常が起きている場合には、その癌化における重要性を、構成因

子のRNAiによる発現抑制、強制発現などの手法を用いて明らかにする。

4 . 研究成果

(1) Dlg から Runx に至るシグナル伝達経路を構成する因子群の解析:

wild-type と Dlg-/- の MEF に Flag-Runx2 を発現して共沈蛋白質を質量分析によって同定し比較することにより、wild-type の MEF からは Runx2-A-Myb 複合体が共沈するが、Dlg-/- MEF からは共沈しないことを見出した。さらに、In vitro および in vivo の pull-down assay により、Runx2 と A-Myb が複合体を形成することを確認した。C-Myb、B-Myb は Runx2 と複合体を形成しないと考えられた。また、A-Myb が Runx による sFRP2 の転写に及ぼす影響をレポーターアッセイ、RT-PCR、immunoblotting などにより検討した。Wild-type と Dlg-/- の MEF で A-Myb の発現量は変わらないので、Dlg-/- MEF で Runx2 と A-Myb が複合体を形成出来ない理由を明らかにするために、リン酸化等の修飾、他の結合蛋白質との相互作用等についての解析を手がけたが明確な結果は得られなかった。

Dlg 側から Dlg-Runx-sFRP2-Wnt シグナル伝達経路を明らかにするために、Dlg 結合蛋白質を yeast two-hybrid 法を用いて検索し、RhoA 特異的 guanine nucleotide exchange factor Net1 が Dlg の PDZ ドメインに結合することを見出した。

(2) B細胞の分化におけるDlg-Runx-sFRP2-Wntシグナル伝達経路の生理的重要性の解明:

B細胞の分化における Dlg-Runx-sFRP2-Wnt シグナル伝達経路の生理的重要性を明らかにするために、IL-7 を添加したメチルセルロース培地での PreB コロニーアッセイを行った。その結果、Dlg-/- 細胞では ProB から PreB への分化に異常があることが確認された。さらにレンチウイルスを用いて sFRP2 を過剰発現して Dlg-/- 血球系細胞における B細胞系の異常が rescue されることを明らかにした。

(3) 上顎骨の低形成、心室中隔欠損症、腎臓、泌尿器の発生異常と Dlg-Runx-sFRP2-Wntシグナル伝達経路の異常との関連の解析:

Dlg-/- マウスでは、心室中核欠損 (VSD)、口蓋裂、腎臓の低形成、尿管の異所開口、ミューラー管およびウォルフ管の発生異常などを起こすことを見出した。neural crest 由来の組織で Wnt シグナルが異常に亢進するとアポトーシスが起これば上顎骨の低形成や心室中隔欠損症がおこることが既に報告されているので[例えば PNAS 99, 297 (2001)]、Dlg シグナルの異常に

より Wnt シグナル抑制因子 sFRP2 の発現が低下するために Wnt シグナルが亢進して neural crest 由来の組織に apoptosis が起き、上顎骨の低形成や心室中隔欠損症が起きた可能性が考えられた。そこで、Wild-type と Dlg-/- マウスの胎児組織(心臓、腎臓、神経堤)について継時的に Dlg、sFRP2、b-catenin の発現を抗体染色、in situ hybridization によって検討したが明快な結果は得られなかった。

(4) ヒト乳癌細胞株におけるDlg変異の検索と Dlgシグナル伝達経路の役割の解析:

ヒト乳癌の一部で Dlg の変異が見出されることが報告されているので[Cancer Res. 64, 942 (2004)]、乳癌培養細胞株 36 種類について Dlg の変異を検索し、変異の見出される細胞を用いて Dlg-Runx-sFRP2-Wnt シグナル伝達経路の癌化における重要性を解析しようと試みたが、意味があると思われる変異は見出されなかった。

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 22 件)

Niida A., Smith A. D., Imoto S., Aburatani H., Zhang M. Q. and Akiyama T. Gene set-based module discovery in the breast cancer transcriptome BMC Bioinformatics 10, 71 (2009).

Sagara M., Kawasaki Y., Iemura S. I., Natsume T., Takai Y., Akiyama T. Asef2 and Neurabin2 cooperatively regulate actin cytoskeletal organization and are involved in HGF-induced cell migration. Oncogene 28, 1357-1365 (2009).

Togo N., Ohwada S., Sakurai S., Toya H., Sakamoto I., Yamada T., Nakano T., Muroya K., Takeyoshi I., Nakajima T., Sekiya T., Yamazumi Y., Nakamura T., Akiyama T. Prognostic significance of BMP and activin membrane-bound inhibitor in colorectal cancer. World J. Gastroenterol. 14, 4880-4888 (2008).

Niida A., Smith A. D., Imoto S., Tsutsumi S., Aburatani H., Zhang M. Q., Akiyama T. Integrative bioinformatics analysis of transcriptional regulatory programs in breast cancer cells. BMC Bioinformatics. 9, 404 (2008).

Kouzmenko A. P., Takeyama K., Kawasaki Y.,

Akiyama T., Kato S. Truncation mutations abolish chromatin-associated activities of adenomatous polyposis coli. *Oncogene* 27, 4888-4899 (2008).

Kouzmenko, A. P., Takeyama, K. I., Kawasaki, Y., Akiyama, T., Kato, S. Ligand-dependent interaction between estrogen receptor alpha and adenomatous polyposis coli. *Genes Cells*. 13, 723-730 (2008).

Itoh, R. E., Kiyokawa, E., Aoki, K., Nishioka, T., Akiyama, T., Matsuda, M. Phosphorylation and activation of a Rac1/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor Asef in A431 cells stimulated by epidermal growth factor. *J Cell Sci*. 121, 2635-2642 (2008).

Toritsu, Y., Watanabe, A., Nonaka, A., Midorikawa, Y., Makuuchi, M., Shimamura, T., Sugimura, H., Niida, A., Akiyama, T., Iwanari, H., Kodama, T., Zeniya, M., Aburatani, H. A human homolog of Notum, over-expressed in hepatocellular carcinoma, is transcriptionally regulated by β -catenin/TCF. *Cancer Sci*. 99, 1139-1146 (2008).

Nakamura T., Hayashi T., Yukiko Nasu-Nishimura Y., Sakaue F., Okabe T., Ohwada S., Matsuura K., Akiyama T. PX-RICS mediates ER-to-Golgi transport of the N-cadherin/ β -catenin complex. *Genes Dev*. 22, 1244-1256 (2008).

Haraguchi K., Ohsugi M., Abe Y., Semba K., Akiyama T., Yamamoto T. Ajuba negatively regulates the Wnt signaling pathway by promoting GSK-3 β -mediated phosphorylation of β -catenin. *Oncogene*, 27, 274-284 (2008).

Shibata, H., Takano, H., Ito, M., Shioya, H., Hirota, M., Matsumoto, H., Kakudo, Y., Ishioka, C., Akiyama, T., Kanegae, Y., Saito, I., Noda T. α -catenin is essential in intestinal adenoma formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104, 18199-18204 (2007).

Hasegawa, Y., Satoh, K., Iizuka-Kogo, A., Shimomura, A., Nomura, R., Akiyama, T., Senda, T. Loss of ICAT gene function leads to arrest of ureteric bud branching and renal agenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 362, 988-994 (2007).

Shimomura A., Ohkuma M., Iizuka-Kogo A., Kohu K., Nomura R., Miyachi E., Akiyama T., Senda T. Requirement of the tumor suppressor

APC for the clustering of PSD-95 and AMPA receptors in hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci* 26, 0-3-912 (2007).

Ito E., Honma R., Yanagisawa Y., Imai JI., Azuma S., Oyama T., Ohwada S., Akiyama T., Nomura N., Inoue JI., Watanabe S, Semba K. Novel clusters of highly expressed genes accompany genomic amplification in breast cancers. *FEBS Letters* 581, 3909-3914 (2007).

Kawasaki Y., Sagara M., Shibata S., Shirouzu M., Yokoyama S., Akiyama T. Identification and Characterization of Asef2, a guanine-nucleotide exchange factor specific for Rac1 and Cdc42. *Oncogene* 26, 7620-7627 (2007).

Murata-Kamiya, N., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Yamahashi, Y., Saito, Y., Higashi, H., Aburatani, H., Akiyama, T., Peek Jr., R. M., Azuma, T., Hatakeyama, M. Helicobacter pylori CagA interacts with E-cadherin and deregulates the β -catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene* 26, 4617-4626 (2007).

Hayashi T., Okabe T., Nasu-Nishimura Y., Sakaue F., Ohwada S., Matsuura K., Akiyama T., Nakamura T. PX-RICS, a novel splicing variant of RICS, is a main isoform expressed during neural development. *Genes Cells* 12, 929-939 (2007).

Muroya, K., Kawasaki, Y., Hayashi, T., Ohwada, S., Akiyama T. PH-domain-mediated membrane targeting of Asef. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 355, 85-88 (2007).

Sakamoto I., Ohwada S., Toya H., Togo N., Kashiwabara K., Oyama T., Nakajima T., Ito H., Adachi S., Jigami T., Akiyama T. Up-regulation of a BCL9-related beta-catenin-binding protein, B9L, in different stages of sporadic colorectal adenoma. *Cancer Sci*. 98, 83-87 (2007).

Iizuka-Kogo A., Ishidao T., *Akiyama T., *Senda T. (*equal corresponding authors) Abnormal development of urogenital organs in Dlg1-deficient mice. *Development* 134, 1799-1807 (2007).

Ⓣ Toya H., Oyama T., Ohwada S., Togo N., Sakamoto I., Horiguchi J., Koibuchi Y., Adachi S., Jigami T., Nakajima T., Akiyama T. Immunohistochemical expression of the beta-catenin-interacting protein B9L is associated with histological high nuclear grade and

immunohistochemical ErbB2/HER-2 expression in breast cancers. *Cancer Sci.* 98, 484-490 (2007).

Ⓔ Murayama K., Shirouzu M., Kawasaki Y., Kato-Murayama M., Hanawa-Suetsugu K., Sakamoto A., Katsura Y., Suenaga A., Toyama M., Terada T., Taiji M., Akiyama T., Yokoyama S. Crystal structure of the rac activator, asef, reveals its autoinhibitory mechanism. *J Biol Chem.*, 282, 4238-4242 (2007).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

秋山 徹 (Akiyama Tetsu)
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授
研究者番号：70150745

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし