

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770109

研究課題名（和文） Wnt-11 蛋白質の精製とその生理機能の解析

研究課題名（英文） Purification and characterization of Wnt-11 protein

研究代表者

岸田 想子（KISHIDA MICHIKO）

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40274089

## 研究成果の概要：

本研究においては、リガンドとして細胞に作用させるためのWnt蛋白質の作製を行った。

マウスL細胞においてWnt-11蛋白質やC末端側にヒスチジン6個を付加した蛋白質（Wnt-11-His6）を培養上清中に分泌する細胞株を樹立した。

また、Wnt-4 ノックアウトマウスでは腎臓が欠損することが知られていることより Wnt-4 は腎臓形成に必須であると考えられる。そこで、Wnt-4 の細胞内シグナルを解析するために、Wnt-4 蛋白質を発現する細胞株を樹立した。この培養上清で NIH3T3 細胞を処理すると Dvl がリン酸化することや 293 細胞において Tcf の転写活性化が亢進することを見出した。

## 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	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：機能生物化学

キーワード：Wnt-11、 Wnt-4、 PCP、 シグナル伝達、 Dvl

## 1. 研究開始当初の背景

細胞外分泌蛋白質Wnt（ウイント）とWntにより活性化される細胞内シグナル伝達経路は種を越えて保存されており、 $\beta$ -カテニン経路と平面内細胞極性（PCP）経路、 $Ca^{2+}$ 経路の3種類が存在し（図1参照）、細胞の増殖や分化等の種々の細胞機能を制御する。Wntはヒトやマウスでは19種類存在し、それぞれ

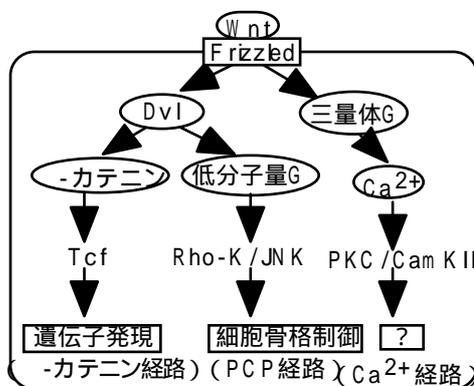


図1 Wnt シグナル伝達経路

れが細胞膜上の7回膜貫通型受容体Frizzledと共役受容体である low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6（LRP5/6）に結合する。WntとFrizzledの組み合わせによって活性化されるシグナル経路が決められていると考えられるが、その詳細は不明である。PCP経路や $Ca^{2+}$ 経路の活性化が形態形成に重要であることが判明し、注目を集めている。ゼブラフィッシュにおいてWnt-11をリガンドとしたPCP経路が原腸形成の制御に関与していることや、マウスでの心臓形成にWnt-11が必要であることが報告されているが、詳しい作用機構は明らかでない。

$\beta$ -カテニン経路では、Wnt刺激のない時は、 $\beta$ -カテニンはAxin/APC複合体中においてGSK-3により効率よくリン酸化され、ユ

ビキチン/プロテアソームによって分解されるために細胞質内での蛋白質量は低く保たれている。WntがFrizzled/LRP受容体複合体に結合すると、Dvlを介してGSK-3による $\beta$ -カテニンのリン酸化が抑制され、 $\beta$ -カテニンが安定化し蓄積し、核内へ移行する。その結果 $\beta$ -カテニン/Tcf複合体を形成してTcfによる転写を活性化して遺伝子発現を促進し、細胞の増殖や分化を制御している。PCP経路では、Wntが低分子量G蛋白質RhoやRacを介してRhoキナーゼやJunキナーゼ（JNK）を活性化して細胞骨格を制御する。 $Ca^{2+}$ 経路では $Ca^{2+}$ 動員を引き起こして、蛋白質リン酸化酵素Cキナーゼ（PKC）やカルモデュリン依存性キナーゼII（CamKII）を活性化することや $\beta$ -カテニン経路による遺伝子発現を抑制することが見出されている。

## 2. 研究の目的

解析が進まない理由として、Wnt蛋白質の精製が困難であったため、リガンドとして細胞に作用させる際は未精製品を使わざるを得ず、純粋なWntの作用を解析することが不可能であった。そこで本研究では、Wnt/PCP経路におけるWnt-11の作用に着目し、以下の3点を目的とした。

マウス Wnt-11 蛋白質を高度に精製する。

Wnt-11 蛋白質の受容体 Frizzled を決定する。

哺乳動物細胞での Wnt-11 の生理機能を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) Wnt-11 蛋白質の精製

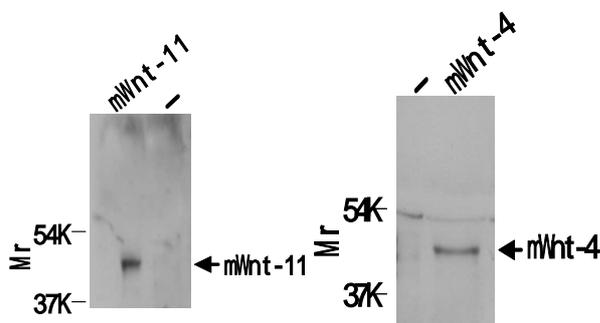
私共は哺乳動物細胞 L 細胞の培養上清 (コンディションドメディウム: CM) 中に Wnt-11 蛋白質を発現している細胞株を樹立した。Wnt-3a と Wnt-5a 蛋白質が発現する CM から一度に数十  $\mu$ g 単位で単一標品に精製できる手法を確立している。その実績を基に Blue Sepharose やゲル濾過、ヘパリン Sepharose を組み合わせたカラムクロマトグラフィーを行い、Wnt-11 蛋白質の精製を行なう。

#### (2) 哺乳動物細胞における Wnt-11 蛋白質の作用機構の解析

上記 (1) により精製した Wnt-11 蛋白質を用いて、哺乳動物細胞で Wnt-3a 依存性の Tcf の転写因子活性化に対する影響や JNK や Rho-キナーゼ、PKC の活性化を解析し、Wnt-11 蛋白質が細胞内でどの経路を活性化するか否かを決定する。

### 4. 研究成果

Wnt-11 蛋白質に特異的に反応する抗体を作製した。さらに、Wnt-11 蛋白質の発現系の確立マウス L 細胞において Wnt-11 蛋白質や C 末端側にヒスチジン 6 個を付加した蛋白質 (Wnt-11-His6) を培養上清中に分泌する細胞

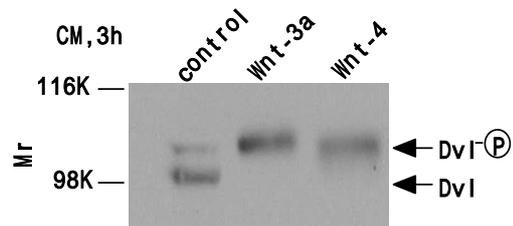


マウス L 細胞で Wnt-11 が恒常的に発現している細胞株、および、Wnt-4 が、L 細胞で恒常的に発現している細胞株を樹立した。それぞれの細胞株を、37、4 日間培養した後、培養上清を回収し、Wnt-11 蛋白質および Wnt-4 蛋白質を含むコンディションドメディウムを得た。

株を樹立した。

これらの培養上清を用いて、哺乳動物細胞において、 $\beta$ -カテニンの蓄積抑制や Tcf の転写活性化の抑制効果、Dvl や JNK のリン酸化の有無を検討した。結果、それらに対する効果は認められなかった。

また、Wnt-4 ノックアウトマウスでは腎臓が欠損することが知られていることより Wnt-4 は腎臓形成に必須であると考えられる。そこで、Wnt-4 の細胞内シグナルを解析するために、Wnt-4 蛋白質特異的抗体を作製し、Wnt-4 蛋白質を発現する細胞株を樹立した。この培養上清で NIH3T3 細胞を処理すると Dvl がリン酸化することや 293 細胞において Tcf の転写活性の亢進を見いだした。これを指標に現在部分精製を行っている。



NIH3T3 細胞にそれぞれのコンディションドメディウムで 37、3 時間処理した後、細胞を可溶化し、電気泳動後、抗 Dvl 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。Wnt-3a コンディションドメディウム同様に、Wnt-4 コンディションドメディウムによる Dvl のモービリティシフトアップが認められ、Wnt-4 依存性に Dvl のリン酸化が引き起こされることを見出した。

CM; コンディションドメディウム, (P): リン酸化

## 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)

[学会発表](計 1 件)

岸田想子、哺乳動物細胞におけるWnt/PCPシグナル伝達経路の働き Wnt-11 蛋白質の精製とその生理機能の解析-、病態代謝研究会、平成 20 年 10 月 18 日、東京

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

岸田 想子 (KISHIDA MICHIKO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
研究者番号：40274089

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし