

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20770179

研究課題名（和文）脊椎動物の頭部形成に関わる新規 Dvl 結合因子 DBP の機能解析

研究課題名（英文）Characterization of a novel modulator of Wnt signaling

研究代表者

佐藤 朗（SATO AKIRA）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70464302

研究成果の概要（和文）：ハエやヒトに至るまで種間を超えて個体発生に重要な役割を果たす Wnt シグナル伝達経路の新規制御因子 DBP を単離し、その機能解析を行った。その結果、この因子が Wnt シグナル伝達経路の細胞内因子 Dvl に結合し、Wnt/ β -catenin 経路を負に制御することを明らかにした。また、ヒトにおいて 19 種類存在する細胞外分泌因子 Wnt のうち、Wnt5a が受容体に競合的に結合することで Wnt/ β -catenin 経路を抑制する新たな分子機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Wnt signaling pathway play important roles in many developmental processes in animals. I identified a new modulator of the Wnt/ β -catenin pathway, named DBP, to negatively control this pathway via binding to Dvl. In addition, it was found that Wnt5a, a member of 19 Wnts, inhibits Wnt3a-dependent activation of the Wnt/ β -catenin pathway by competing with Wnt3a for binding to the Wnt receptor Frizzled 2.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：シグナル伝達、発生・分化、Wnt、Dvl、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

種間を超えて保存された Wnt シグナル伝達経路は、個体発生において様々な段階で重要な役割を担っている。Wnt が細胞膜受容体に結合した後に引き起こされる細胞

内シグナル伝達経路としては、これまでに β -カテニン経路、平面内細胞極性（PCP）経路、Ca²⁺経路の少なくとも 3 種類が存在し、細胞増殖、分化、運動、極性、老化等の種々の細胞応答に重要であると考えられている。

ショウジョウバエを用いた遺伝学から、Wntの受容体として最初に同定されたのは七回膜貫通型である Frizzled (Fz) であり、ヒトには10種類存在する。また、近年、一回膜貫通型受容体 (LRP5/6、Ror1/2、Ryk 等) が共役受容体として機能し、下流のシグナル伝達経路の選択的活性化に関与することが示唆されている。

β -カテニン経路において、Wnt が受容体 Fz と共役受容体 LRP5/6 に作用すると、LRP5/6 の細胞内領域がリン酸化され、細胞内の β -カテニンが安定化する。蓄積した β -カテニンは核内に移行し、DNA 結合性の転写因子 Tcf/Lef と複合体を形成し遺伝子の発現を介して、細胞の増殖や分化を制御する。PCP 経路においては、低分子量 G 蛋白質である Rho や Rac が活性化され、 Ca^{2+} 経路においては蛋白質リン酸化酵素である C キナーゼやカルモジュリンキナーゼが活性化されることが、ショウジョウバエの遺伝学的解析やツメガエル受精卵を用いた発生生物学的解析から示唆されている。これらの経路は β -カテニン非依存性経路とも呼ばれ、細胞運動や極性決定を制御すると考えられているが、その詳細な分子機構は依然として十分に理解されていない。

2. 研究の目的

Wnt が特異的なシグナル伝達経路を如何にして活性化し制御するのかに着目し、その分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

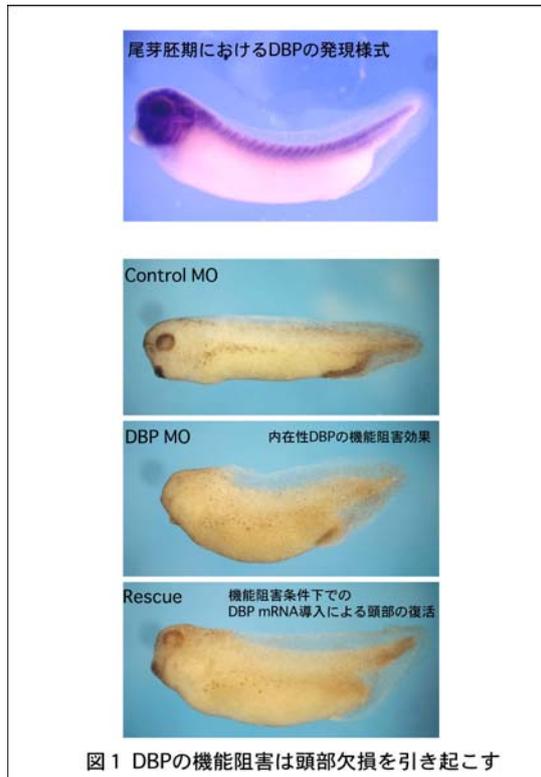
(1) Wnt が活性化する複数の細胞内シグナル伝達経路において共通の細胞内因子 Dvl に着目し、Dvl に結合する新規因子の単離とその機能解析を通して、シグナル伝達経路の詳細を明らかにする。

(2) ヒトにおいて19種類存在する Wnt のうち現在までに精製可能な Wnt 蛋白質は、Wnt3a と Wnt5a である。Wnt3a は Wnt/ β -catenin 経路を活性化するが、Wnt5a は、むしろその経路に対して抑制的に作用することが判明している。しかし、その詳細な分子機構には不明な点が多い。そのため、これら活性の異なる精製 Wnt 蛋白を用いて、受容体レベルでの細胞内シグナル伝達経路の活性化とその制御機構を明らかにする。

4. 研究成果

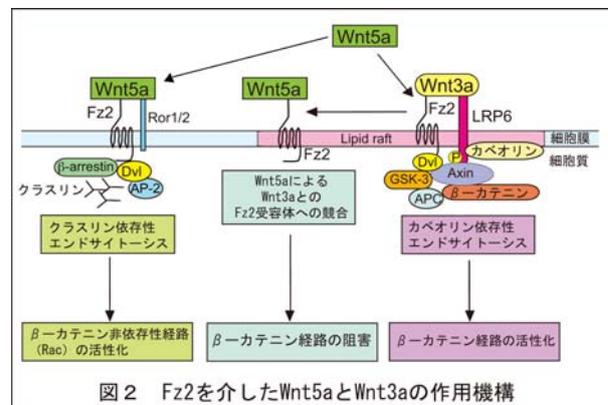
(1) Dvl を bait に用いた Yeast two hybrid screening を行い、脊椎動物では全くの新規 Dvl 結合因子 Dishevelled Binding Protein (DBP) を単離した。DBP は、そのアミノ酸配列から Wnt シグナルの必須因子 Casein Kinase I (CKI) による推定のリン酸化セリンを少なくとも4つ有し、脊椎動物のみに高度に保存された遺伝子であった。これまでに DBP が Dvl と結合することのみならず、実際に CKI にも結合しリン酸化を受けること、さらにリン酸化された DBP は Dvl によって間接的に脱リン酸化を受けることを見出した。また、ツメガエル初期胚の発生過程において DBP は、前方神経領域に特異的な発現を示す。その発現様式と一致して、モルフォリーノ・オリゴ (MO) によるツメガエル初期胚での内在性 DBP の機能阻害は頭部形成不全を引き起こした。この内在性 DBP の機能阻害による頭部欠損は、MO と共にマイクロインジェクションされた DBP mRNA によってレスキューされることから、少なくともツメガエルの頭部形成において DBP は必須の因子と考えられる (図1)。脊椎動物の頭部形成においては、Wnt/ β カテニン経路が抑制されることが重

要であると考えられている。培養細胞を用いたレポーターアッセイにおいて、DBP はその発現量に依存して Wnt/ β -カテニン経路応答性レポーターの活性を抑制したことから、少なくとも DBP は Wnt/ β -カテニン経路における負の調節因子である可能性が示唆された。



(2) HeLaS3 細胞は、Wnt3a による β -カテニン経路の活性化と Wnt5a による β -カテニン非依存性経路 (Rac の活性化) の両経路の解析が容易な細胞株である。siRNA を用いたノックダウンによる解析から、少なくともこの細胞株では、両経路の活性化に必須な Fz 受容体は Fz2 であることが明らかになった。当研究室は以前に β -カテニン経路の活性化にはカベオリン依存性のエンドサイトーシスが関与することを明らかにしているが、本研究では、HeLaS3 細胞における Wnt5a 依存性の Rac の活性化には Fz2 がクラスリン依存性にエンドサイトーシスされることが重要であり、同一細胞上で異なる生理活性を持

つ Wnt リガンドが Fz2 を介した異なるエンドサイトーシス経路によって、特異的な細胞内シグナル伝達経路を選択的に活性化することを明らかにした。また、Wnt 精製蛋白質を用いて個々の受容体との相互作用を解析したところ、Wnt5a は LRP6 への親和性が Wnt3a よりも弱く、Fz2 に対しては、Wnt3a、Wnt5a 共に同等の結合能を有していた。その結果、Wnt5a が Wnt3a の Fz2 への結合に対して競合することによって β -カテニン経路を抑制するという新しい知見が得られた (図 2)。



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 Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase.
Yamamoto H, Oue N, Sato A, Hasegawa Y, Yamamoto H, Matsubara A, Yasui W, Kikuchi A.
Oncogene. In press (2010). (査読有)

② Wnt5a regulates distinct signaling pathways by binding to Frizzled2

Sato A, Yamamoto H, Sakane H, Koyama H,
Kikuchi A.

EMBO J., 29:41-54. (2010) (査読有)

③ Selective activation mechanisms of Wnt
signaling pathways.

Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A.

Trends Cell Biol., 19:119-29. (2009) (総
説) (査読有)

[学会発表] (計2件)

① 佐藤朗、Wnt5a regulates distinct
signaling pathways by binding to Frizzled
2、第32回日本分子生物学会年会、200
9年12月9日、パシフィコ横浜

② 佐藤朗、Wnt5aによるWnt3a- β -catenin
経路の新規抑制機構の解析、第31回日本分
子生物学会年会、2008年12月11日、
神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 朗 (SATO AKIRA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科

・助教

研究者番号：70464302

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：