

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790320

研究課題名 (和文)

異なる受容体のエンドサイトーシス経路を介する Wnt シグナルの制御機構

研究課題名 (英文)

Regulation of Wnt signaling by different endocytic pathway

研究代表者

山本 英樹 (YAMAMOTO HIDEKI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20372691

研究成果の概要 (和文)：

Wnt シグナルに対して拮抗的に機能する分泌性蛋白質の Dkk1 は脂質ラフトに局在する LRP6 を非脂質ラフト分画に移行させ、クラスリン依存性に LRP6 のエンドサイトーシスを誘導することにより β -カテニン経路を抑制した。一方、 β -カテニン非依存性経路を活性化する Wnt5a は Rac を活性化するが、その活性化には共役受容体の Ror1/2 やアレスチンとクラスリン依存性のエンドサイトーシス経路が必要であった。以上の知見はエンドサイトーシスによる Wnt シグナル経路の活性制御機構の一端を明らかにしたものである。

研究成果の概要 (英文)：

We examined whether the internalization of Wnt receptors affects the ability of Dkk1 and Wnt5a to regulate Wnt signaling pathways. A secreted protein Dkk1, which acts as an inhibitor of Wnt signaling, reduced the amount of LRP6 from the lipid raft and induced clathrin-mediated internalization of LRP6 to suppress β -catenin pathway. Wnt5a activated Rac in the β -catenin-independent pathway, and Frizzled 2 (Fz2), clathrin, arrestin, and Ror1 or Ror2 were required for this action. These results indicate that Wnt signaling pathway is regulated by the internalization of Wnt receptors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：分子病態学 Wnt

1. 研究開始当初の背景

(1) Wnt は分泌性蛋白質で受容体に結合することにより、細胞の増殖や分化、運動等の種々の細胞機能を制御する。Wnt が細胞膜の受容体に結合すると、そのシグナルは β -カテニンの安定化とそれに伴う遺伝子発現を介して細胞増殖や分化を制御する β -カテニン経路と細胞運動や極性を制御する β -カテニン非依存性経路を活性化する。

① Wnt3a に対して拮抗的に機能する分泌性蛋白質の Dickkopf1 (Dkk1) は Wnt 受容体の LRP6 に結合することにより、 β -カテニン経路を抑制することが明らかにされていたが、その分子機構は明らかにされていなかった。

② β -カテニン非依存性経路を活性化する Wnt5a は Dvl を介して Rac や Rho を活性化することが示唆されていたが、受容体エンドサイトーシスとシグナル伝達の活性化の関連

は明らかにされていなかった。

(2) β -カテニン非依存性経路を活性化する Wnt として Wnt5a の他にも Wnt11 が存在するが、その生理機能は不明である。また、Wnt11 の生化学的性状や哺乳動物細胞における細胞応答の詳細は明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

Wnt 研究領域において未解決であり重要課題とされている 3 点を明らかにすることを目的としている。

(1) エンドサイトーシスによる Wnt シグナルの活性制御について解析する。

① Wnt 阻害因子 DKK1 による β -カテニン経路の抑制機構を解明する。

② Wnt と受容体の結合の特異性や受容体エンドサイトーシスによる β -カテニン非依存性経路の活性制御機構を解明する。

(2) Wnt11 の生化学的性状や細胞応答を明らかにするために Wnt11 の精製法を確立する。

3. 研究の方法

(1) エンドサイトーシスによる Wnt シグナルの活性制御機構について以下の方法を用いて解析した。

① Dkk1 刺激により内在性の LRP6 と低分子量 G 蛋白質 Rab ファミリーや各小胞のマーカ蛋白質の局在を免疫染色によって経時的に解析する。また、LRP6 の一部はラフトに局在するが、Dkk1 が細胞膜上の脂質ラフトに局在する LRP6 に影響するか否かを解析した。Dkk1 による LRP6 の細胞内小胞輸送経路を解析した。

② エンドサイトーシスによって β -カテニン非依存性経路が活性化されるか否かを明らかにするため、RNAi によるクラスリンやアレシチン 2 の発現抑制や優性抑性型変異体のアレシチン 2 の発現によって、Wnt3a や Wnt5a の細胞応答に対して影響するか否かを解析した。また、クラスリンやカベオリン依存性エンドサイトーシスをダンシルカダベリンやナスタチンにより抑制することによって、Wnt3a や Wnt5a の細胞応答に対して影響するか否かを解析した。

(2) アフィニティカラムやゲルろ過カラムを組み合わせた数段階のクロマトグラフィーにより調製した分画を抗 Wnt11 抗体による検出と Dvl のリン酸化、Rac の活性化を指標に活性画分を検出した。

4. 研究成果

(1)

① Dkk1 は脂質ラフトに存在する LRP6 受容体を非脂質ラフトに移行させた後、クラスリンを介するエンドサイトーシスによって LRP6 を細胞質に移行させることにより、 β -カテニン経路を抑制することを明らかにした (図 1-4)。

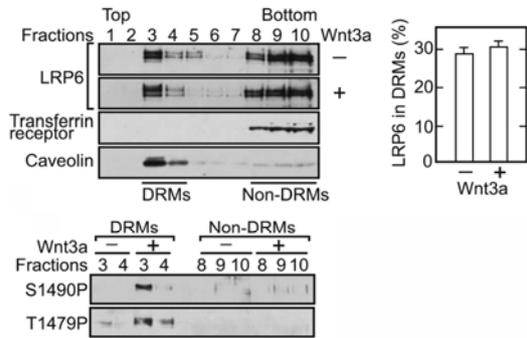


図1 Wnt3a刺激により脂質ラフトにおける内在性のLRP6の蛋白質レベルは影響しないが LRP6の1490番のセリンや1479番のトレオニンのリン酸化が促進された。

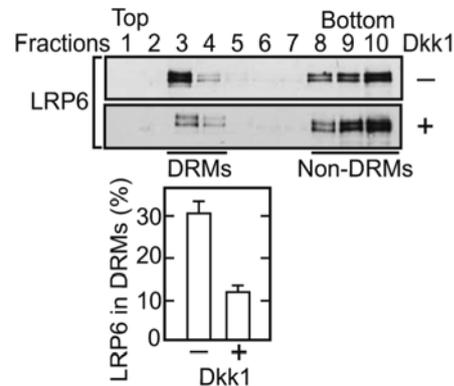


図2 Dkk1刺激により脂質ラフトにおける内在性のLRP6の局在が減少した。

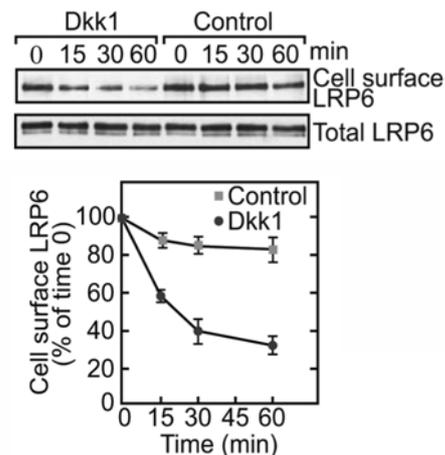


図3 Dkk1刺激により時間依存性に内在性のLRP6が細胞質に移行した。

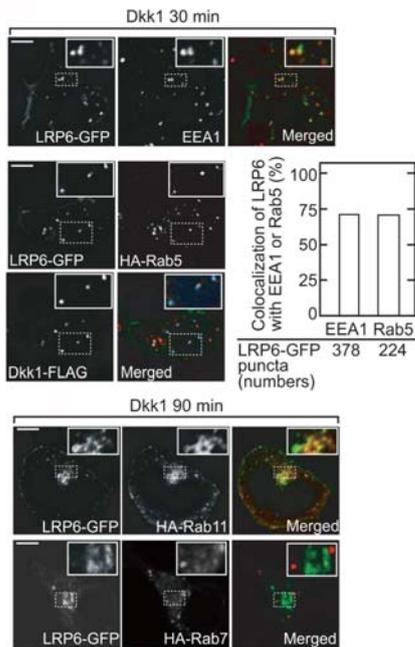


図4 Dkk1刺激30分後、LRP6とDkk1は初期エンドソームマーカーのEEA1やRab5と局在が一致した。Dkk1刺激90分後、LRP6はリサイクルエンドソームマーカーのRab11と局在が一致したが、後期エンドソームマーカーのRab7とは一致しなかった。

② Wnt5a は Frizzled2 受容体のクラスリン依存性のエンドサイトーシスを誘導した。さらに、Wnt5a 刺激により Rac が活性化されるがその活性化には Ror2 やアレスチンとクラスリン依存性のエンドサイトーシス経路が必要であることを明らかにした。これまでに、私は Wnt3a 刺激により LRP6 受容体がカベオリン依存性に細胞質へ移行することを明らかにしている。したがって、同一の Wnt 受容体においても細胞膜における局在やリガンドと受容体の組み合わせに加えて、異なるエンドサイトーシス経路によって Wnt シグナルの活性化が制御されることが示唆された (図 5-10)。

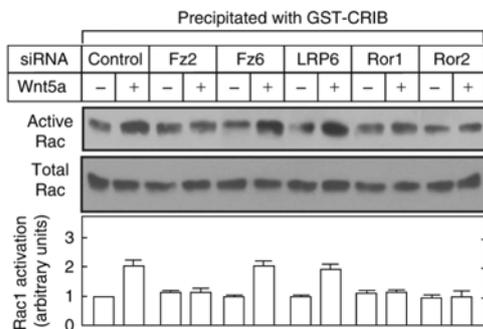


図5 Fz2やRor1/2の発現を抑制すると Wnt5a依存性のRac1の活性化が抑制された。

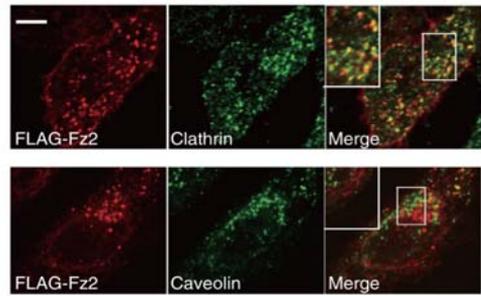


図6 Wnt5a刺激によりFz2はクラスリンを介して細胞質に移行した。

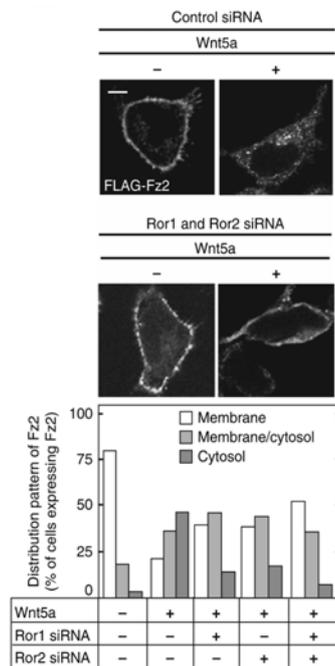


図7 Ror1/2の発現を抑制すると、Wnt5a刺激によるFz2の細胞質移行が抑制された。

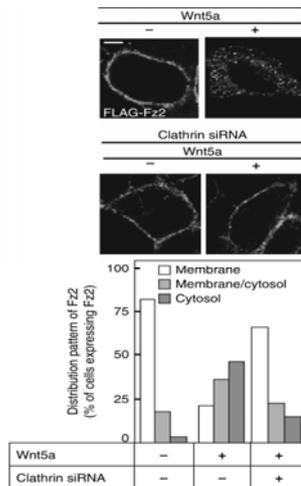


図8 クラスリンの発現を抑制すると、Wnt5a刺激によるFz2の細胞質移行が抑制された。

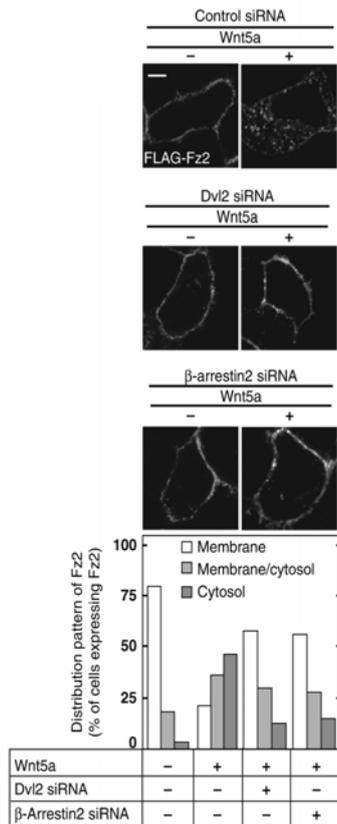


図9 Dvl2、あるいはβアレスチン2の発現を抑制するとWnt5a刺激によるFz2の細胞質移行が抑制された。

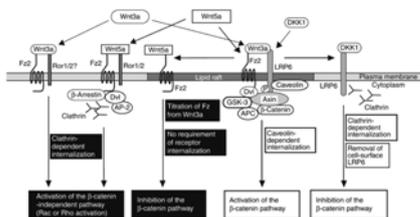
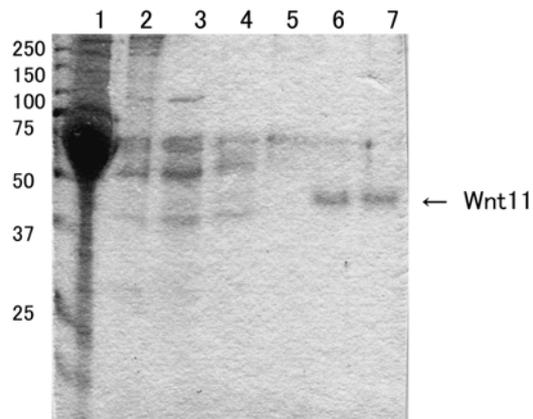


図10 Wntシグナルの選択的活性化の分子機構
Wnt3aは脂質ラフトにおいてLRP6のリン酸化とカベオリンを介するエンドサイトーシスによってβカテニン経路を活性化する。Dkk1はLRP6を脂質ラフト外に移行させた後、細胞表面のLRP6をクラスリンを介するエンドサイトーシスによって細胞質に移行させることにより、βカテニン経路を抑制する。一方、Wnt5aは受容体レベルでWnt3aがFz2受容体に結合するのを抑制することにより、Wnt3a依存性のβカテニン経路の活性化を阻害する。一方、Wnt5aはFz2のクラスリン依存性エンドサイトーシスを介してβカテニン非依存性経路を活性化する。

(2)

Blue sepharose、Superdex200 (ゲルろ過)、Hydroxyapatite、ConA sepharose、Cu chelate column の5段階のカラムを用いて、抗Wnt11抗体による検出とDvl1のリン酸化、Racの活性化を指標にWnt11の活性画分を検出し、同一蛋白質にまで精製することに成功した(図11)。



- 1 Wnt11 CM
- 2 Blue sepharose eluate
- 3 Superdex200 sepharose eluate
- 4 Hydroxyapatite Flow through
- 5 ConA sepharose eluate
- 6 Cu chelate column eluate Fr. 8
- 7 Cu chelate column eluate Fr. 9

図11 Wnt11の精製

Blue sepharose、Superdex200、Hydroxyapatite、ConA sepharose、Cu chelate columnによってWnt11を精製した。

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5件)

1. Yamamoto, H., Oue, N., Sato, A., Hasegawa, Y., Yamamoto, H., Matsubara, A., Yasui, W., and Kikuchi, A. Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. *Oncogene* 29, 2036–2046, 2010 (査読有り)
2. Sakane, H., Yamamoto, H., and Kikuchi, A. LRP6 is internalized by Dkk1 to suppress its phosphorylation in the lipid raft and is recycled for reuse. *J. Cell Sci.* 123, 360–368, 2010 (査読有り)
3. Sato, A., Yamamoto, H., Sakane, H., Koyama, H., and Kikuchi, A. Wnt5a regulates distinct signaling pathways by binding to Frizzled2. *EMBO J.* 29, 41–54, 2010 (査読有り)
4. Yamamoto, H., Kitadai, Y., Yamamoto, H., Oue, N., Ohdan, H., Yasui, W., and Kikuchi, A. Laminin · 2 mediates Wnt5a-induced invasion of

Gastric Cancer Cells.

Gastroenterology, 137, 242-252,
2009 (査読有り)

5. Kikuchi, A., Yamamoto, H., and Sato, A. Selective activation of mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol.*, 19, 119-129, 2009 (査読有り)

[学会発表] (計2件)

1. 山本 英樹、佐藤 朗、坂根 洋、菊池 章 :
Wnt5a-dependent activation of Rac through
the internalization of Frizzled receptor
第83回日本生化学会大会 神戸 2010年12月
7日～10日
2. 山本 英樹、坂根 洋、菊池 章 : 異なる受
容体エンドサイトーシス経路を介するWntシ
グナル伝達の制御機構 第82回日本生化学会
大会 神戸 2009年10月21日～24日

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molbiobc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 英樹 (Yamamoto Hideki)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号 : 20372691

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :