

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770127

研究課題名（和文） Wnt シグナルを制御するリン酸化酵素の探索とその機能解析

研究課題名（英文） Identification of novel kinases in Wnt signaling

研究代表者

佐藤 朗 (SATO AKIRA)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70464302

研究成果の概要（和文）：Wnt によって活性化される複数のシグナル伝達経路は、主として細胞の分化・増殖を制御する β -カテニン経路と細胞運動・極性を制御する β -カテニン非依存性経路に大別される。両経路で機能する細胞内因子 Dvl にはリン酸化される可能性の高いセリン、スレオニン、チロシンが多く存在し、実際に幾つかの細胞株において Wnt で刺激をすると内在性の Dvl のリン酸化が観察される。しかし、現在までに両経路における Dvl のリン酸化制御やリン酸化の意義に関する知見は乏しい。そこで、ヒトの 710 種類のリン酸化酵素を網羅した siRNA library を用いて HeLaS3 細胞における Wnt5a シグナル依存性 Dvl のリン酸化に関与するリン酸化酵素のスクリーニングを試みた。

研究成果の概要（英文）：Wnts control various cellular functions including proliferation, differentiation, death, migration, and polarity, by activating multiple intracellular signaling cascades including the β -catenin-dependent and -independent pathways. Dishevelled (Dvl), which has multiple phosphorylation sites, is an essential intracellular component for both pathways. However, the detailed mechanisms and regulations of Wnt signaling cascades through Dvl have still been poorly understood. In this study, I performed siRNA library screenings to identify novel kinases that phosphorylate Dvl.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：Wnt シグナル、リン酸化酵素、Dvl、LRP5/6

1. 研究開始当初の背景

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、 Ca^{2+} 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 (Kikuchi, A., et al., Trends. Cell Biol., 2009)。

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 (Polakis, P., Curr. Opin. Genet. Dev., 2007)。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。(Kikuchi, A., et al., Trends. Cell Biol., 2009)。

2. 研究の目的

Wnt シグナル伝達経路のうち比較的解析の進んでいる β -カテニン経路では、Wnt が受容体に結合した後、最初に共役受容体 LRP5/6 がリン酸化される。これまでに私どもは、Wnt3a 依存的な β -カテニン経路の活性化には、Lipid raft と呼ばれるコレステロールやスフィンゴミエリンといった脂質が豊富に存在する細胞膜上のマイクロドメインにおいて、Wnt3a が受容体 Fz と LRP6 に作用するとカベオリン依存性にエンドサイトーシスされることが、 β カテニンの安定化に重要であることを明らかにした。現在までに LRP6 の細胞質領域をリン酸化する酵素としては GSK3 と CKI γ が同定されているが、最近、ホスファチジルイノシトール 4,5 ビスリン酸 (PI(4,5)P₂; PIP₂) の合成に関わるリン酸化酵素 (PI4 キナーゼ II α , PI5 キナーゼ I β) が Wnt3a 依存性の LRP6 のリン酸化に重要な役割を果たすことが示唆された。PIP₂ は細胞膜の構成成分の一つでありシグナル伝達のセカンドメッセンジャーとしての機能の他に、その陰性の電化をもつ性質から細胞膜上に電気的に陽性のドメインを持つ蛋白質をリクルートする性質を持つ。そのため、 β -カテニン経路の活性化の最初のトリガーと

なる LRP6 のリン酸化には、PIP₂ を介して細胞膜直下に局在するような他の因子が局在する可能性がある。このように、Lipid raft での LRP6 のリン酸化に関与する全ての因子は明らかにはなっていない。

β -カテニン経路と β -カテニン非依存性経路 (PCP 経路) で共通に機能する細胞内因子として Dvl が知られている。Dvl にはリン酸化される可能性が高いセリン、スレオニン、チロシンが多く存在し、クラスターを形成している領域が存在する。実際に培養細胞に Wnt3a もしくは Wnt5a を作用させると Dvl はリン酸化され、そのバンドが上方にシフトする。しかし、両経路において Dvl をリン酸化する酵素は共通であるのか異なるのか、また、そのリン酸化状態や下流へのシグナル伝達機構との関連に関しては依然として不明な点が多い。さらに、両経路において Wnt 依存性にリン酸化された Dvl がどのような機能を有し、下流のシグナル伝達を制御しているのかも不明である。私共は、既に β -カテニン経路の活性化に導く Wnt として Wnt3a を、また β -カテニン非依存性経路を活性化する Wnt として Wnt5a の精製方法を確立している。また、培養細胞にこれら精製 Wnt 蛋白質を作用させることによって内在性の β -カテニン経路と β -カテニン非依存性経路の活性化を容易に検出できる系を持っている。本研究目的は、これらの系にリン酸化酵素特異的な siRNA library を用いたスクリーニングを組み合わせることによって、Wnt シグナルを制御する未同定のリン酸化酵素の探索とその作用機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) Wnt3a 依存性の LRP6 のリン酸化に関する新規リン酸化酵素を同定とその機能解析

Wnt3a が LRP6 に結合すると、GSK3 によって 1490 番目のセリンがリン酸化される。そのリン酸化セリンを特異的に認識する抗体を用いたウェスタンブロットによって、私共が調べた限り全ての細胞株において Wnt3a 依存性の LRP6 のリン酸化が容易に検出できる。NIH3T3 細胞は siRNA の導入に優れた細胞株である。そこでマウスに存在するほぼ全てのリン酸化酵素を網羅した siRNA library (571 種類のリン酸化酵素を含む) を NIH3T3 細胞に導入して、Wnt3a 依存性の LRP6 のリン酸化に関与するリン酸化酵素の探索を行う。

(2) Wnt5a 依存性 Dvl のリン酸化に関する新規リン酸化酵素を同定とその機能解析

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 (Yamamoto, H., et al., *Dev. Cell*, 2006)、私共は、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。さらに、HeLaS3 細胞は内在性に Wnt5a を高発現しており、siRNA を用いて Wnt5a やその受容体である Fz2、Ror1/2 をノックダウンすると、Dvl のリン酸化が減弱する。つまり、HeLaS3 細胞における Dvl のリン酸化は、内在性 Wnt5a が関与するシグナル経路の活性化による。そこで、ヒトの 710 種類のリン酸化酵素を網羅した 2130 種類 (一つのリン酸化酵素につき 3 種類の siRNA で構成されている) の siRNA より構成される library を用いて HeLaS3 細胞における Dvl のリン酸化に関与するリン酸化酵素のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) Wnt3a 依存性の LRP6 のリン酸化に関与する新規リン酸化酵素を同定とその機能解析

571 種類のリン酸化酵素を網羅したマウスリン酸化酵素 siRNA library を NIH3T3 細胞に導入して、Wnt3a 依存性 LRP6 のリン酸化を減弱させるリン酸化酵素のスクリーニングを LRP6 の 1490 番目のリン酸化セリン特異的抗体を用いた western blotting によって行った。この siRNA library は、一つのリン酸化酵素に関して 3 種類の siRNA より構成されているが、最終的には、3 種類のうち少なくとも 2 つが同じ効果を引き起こすリン酸化酵素の同定を試み、一次候補として 13 種類を同定した。次に、定量的 RT-PCR を用いて、これら候補のうち Wnt3a 依存性 Axin2 遺伝子の発現を減弱させる候補の選別を行った。しかし、Axin2 遺伝子の発現を有意に減少させる因子の同定には至らなかった。

(2) Wnt5a 依存性 Dvl のリン酸化に関与する新規リン酸化酵素を同定とその機能解析
ヒトの 710 種類のリン酸化酵素を網羅

した 2130 種類 (一つのリン酸化酵素につき 3 種類の siRNA で構成されている) の siRNA より構成される library を用いて HeLaS3 細胞における Dvl のリン酸化に関与するリン酸化酵素のスクリーニングを行った。方法としては、各リン酸化酵素に対する 3 種類の siRNA を同時に HeLaS3 細胞に導入し、内在性 Dvl のリン酸化を減弱させる (Dvl の band のシフトダウンを引き起す) 一次候補を選別した。さらに、一次候補の 3 種類の siRNA を個別に HeLaS3 細胞に導入し、少なくとも 2 種以上が依然として Dvl のリン酸化を減弱させる候補を二次スクリーニングした。その結果、32 個のリン酸化酵素が同定された。これらの候補の中には、これまでに Dvl のリン酸化に関与すると報告されている CKI δ や Ror2 も含まれているため、スクリーニングは機能していたと考えられた。次に、siRNA を導入後 Wnt5a で刺激しても依然として Dvl のリン酸化が減弱したままの候補を選別しようと試みた。しかし、Wnt5a シグナル下流で機能する決定的なリン酸化酵素の同定には至らなかった。受容体 Fz2 のノックダウンでは、Wnt5a 刺激を行っても Dvl のリン酸化は減弱したままであることから、Fz2 下流で複数のリン酸化酵素が作用し Dvl のリン酸化を引き起しているものと考えられた。

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 6 件)

1. Localization of glypican-4 in different membrane microdomains is involved in the regulation of Wnt signaling. Sakane H., Yamamoto H., Matsumoto S., Sato A., and Kikuchi A. *J. Cell Sci.* 2012, 125(Pt 2), 449-460. (査読: 有)
2. An anti-Wnt5a antibody suppresses metastasis of gastric cancer cells in vivo by inhibiting receptor-mediated endocytosis. Hanaki H., Yamamoto H., Sakane H., Matsumoto S., Ohdan H., Sato A., Kikuchi A. *Mol. Cancer Ther.* 2012, 11, 298-307. (査読: 有)
3. New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. Kikuchi A., Yamamoto H., Sato A., Matsumoto S. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2011, 291, 21-71. (査読: 有)

4. Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases.
Kikuchi A., Yamamoto H., Sato A., and Matsumoto S.
Acta Physiol. (Oxf). 2011, doi: 10.1111/j.1748-1716. (査読:有)
5. TRPM7 regulates gastrulation during vertebrate embryogenesis.
Liu W., Su L.T., Khadka D.K., Mezzacappa C., Komiya Y., Sato A., Habas R., and Runnels L.W.
Dev. Biol. 2011, 350, 348-357. (査読:有)
6. 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., and Kikuchi A.
Oncogene. 2010, 29, 2036-2046. (査読:有)

[学会発表] (計2件)

① 佐藤 朗

Wnt5a deficiency ameliorates the dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute colitis.、第34回 日本分子生物学会年会、2011. 12. 14、パシフィコ横浜

② 佐藤 朗

Wnt5a inhibits the Wnt/ β -catenin pathway by binding to Frizzled2. 第33回日本分子生物学会年会、2010. 12. 7、神戸ポートアイランド

[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

佐藤 朗 (SATO AKIRA)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 70464302