

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 4月23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：22790316
 研究課題名（和文） Dkk1によるWntシグナル伝達の制御機構の解析
 研究課題名（英文） Regulation of Wnt signaling pathway by Dkk1

研究代表者
 坂根 洋（SAKANE HIROSHI）
 大阪大学・医学系研究科・招へい研究員
 研究者番号：80457291

研究成果の概要（和文）：Wnt受容体であるLRP6が、Wnt3aによって脂質ラフトにおいて特異的にリン酸化されることを明らかとした。また、Wntシグナルに対して抑制的に作用するDkk1は内在性LRP6を非脂質ラフトに移行させてクラスリン依存性エンドサイトーシスを誘導した。さらにプロテオグリカンであるGlypican4は脂質ラフトに局在する時はβ-カテニン経路を活性化し、非脂質ラフトに局在する時はβ-カテニン経路を抑制する一方で、β-カテニン非依存性経路を活性化することを明らかとした。以上の知見はDkk1およびGlypican4によるWntシグナル伝達の制御機構の一端を明らかとしたものである。

研究成果の概要（英文）：We found that Wnt receptor LRP6 was phosphorylated in the lipid raft by Wnt3a stimulation. Wnt antagonist Dkk1 shifted endogenous LRP6 to the non-lipid raft fraction and induced clathrin-dependent endocytosis. We also found that glypican4, a member of proteoglycan, in the lipid raft activated the β-catenin pathway. However, glypican4 in the non-lipid raft suppressed β-catenin pathway but activated β-catenin-independent pathway. These results indicates how Wnt signaling pathway is regulated by Dkk1 and glypican4.

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	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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) 分泌性蛋白質であるWntは細胞膜上の受容体と結合して、細胞の増殖や分化など多くの細胞機能を制御しており、Wntシグナルの異常は発癌と密接に関連することが知られている。そのシグナルにはβ-カテニンの安定化に伴う遺伝子発現を介する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

がある。分泌性蛋白質Dkk1はβ-カテニン経路の抑制因子であり、その抑制機構を解明することは発癌機構を解明する一助になると考えられる。

①私共はこれまでにWntシグナルに受容体のエンドサイトーシスが関わることを解析してきているが、Dkk1が内在性のWnt受容体LRP6のエンドサイトーシスを誘導するか否か明らかでない。

②細胞膜上には脂質ラフトと呼ばれるコレステロールやスフィンゴ脂質に富んだマイクロドメインが存在するが、Wnt シグナルにおいてどのような役割を持つのかについては明らかではない。

(2) 細胞表面にはプロテオグリカンが存在しており、様々なシグナル伝達に関与する。その一つである Glypican4 (GPC4) は GPI アンカーにより細胞膜上の脂質ラフトに局在するが、GPI アンカーが切断されると細胞膜から解離する。GPC4 は Wnt シグナルに関与することが報告されているが、GPC4 による Wnt シグナルの制御機構については明らかではない。

2. 研究の目的

Wnt シグナル伝達において、明らかとなっていない以下の点について解析を行う。

(1) エンドサイトーシスと脂質ラフトによる Wnt シグナルの制御機構を明らかとする。

①Wnt シグナル抑制因子である Dkk1 による内在性 LRP6 のエンドサイトーシス経路について解析する。

②脂質ラフトにおける LRP6 のリン酸化について解析を行う。

(2) GPC4 による Wnt シグナルの制御機構について明らかとなっていない以下の点について解析を行う。

①GPC4 の脂質ラフトあるいは非脂質ラフトへの局在に依存した Wnt シグナル伝達の制御機構について解析する。

②細胞膜から解離して分泌された GPC4 による Wnt シグナルの制御機構を解析する。

3. 研究の方法

(1) エンドサイトーシスと脂質ラフトによる Wnt シグナルの制御機構を解明するため、以下の方法により解析した。

①内在性の LRP6 はショ糖密度勾配遠心法により一部が脂質ラフトに局在するが、Dkk1 刺激による局在変化を検討した。また、Dkk1 刺激によって内在性 LRP6 がエンドサイトーシスされるか否かを細胞表面の蛋白質をピオチン化する方法で検討した。また、Dkk1 による LRP6 のエンドサイトーシスが RNAi によるクラスリンの発現抑制の影響を受けるか否かを検討した。

②Wnt3a 刺激により脂質ラフトに局在する LRP6 がリン酸化を受けるか検討した。また、ナスタチンにより脂質ラフトの機能を阻害することで、そのリン酸化がどのようになるかを検討した。

(2) GPC4 による Wnt シグナルの制御機構を解明するため、以下の方法により解析した。

①GPC4 の脂質ラフトへの局在に依存した Wnt シグナルの制御機構を解析するため、GPC4 あ

るいは脂質ラフトに局在しない GPC4/SDC1 キメラ蛋白質を安定発現する HeLaS3 細胞を複製し、 β -カテニン経路を活性化する Wnt3a で刺激して LRP6 のリン酸化を検討し、さらに Dkk1 の抑制効果を検討した。また、 β -カテニン非依存性経路を活性化する Wnt5a で刺激して、受容体である Ror2 のエンドサイトーシスや Rac1 の活性化に対する GPC4 あるいは GPC4/SDC1 の影響を検討した。

②細胞外に分泌された GPC4 存在下で、 β -カテニン経路を活性化する Wnt3a による LRP6 のリン酸化と β -カテニン非依存性経路を活性化する Wnt5a による Rac の活性化を検討した。

4. 研究成果

(1)

①内在性の LRP6 は脂質ラフトと非脂質ラフトの両方に局在したが、Dkk1 で細胞を刺激すると、LRP6 が非脂質ラフトに移行することを明らかとした(図1)。また、Dkk1 は内在性 LRP6 のクラスリン依存性エンドサイトーシスを誘導することを明らかとし、Dkk1 による Wnt シグナル伝達の抑制機構について新たな知見を得ることができた(図2)。

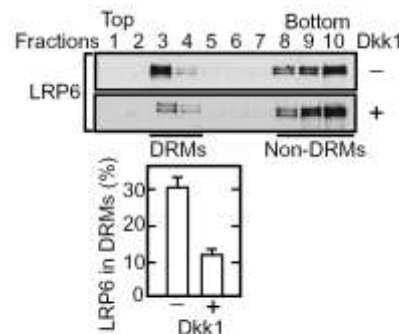


図1. Dkk1刺激によって、脂質ラフト(DRM)に局在する内在性LRP6が減少した。

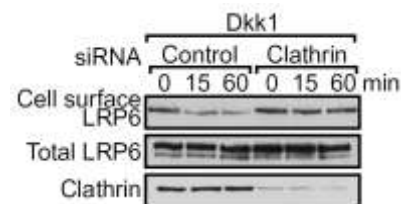


図2. Dkk1によるLRP6のエンドサイトーシスはsiRNAによるクラスリンの発現抑制により阻害された。

②Wnt3a 刺激によって脂質ラフトに局在する LRP6 のみリン酸化を受けた(図3)。また、そのリン酸化はナスタチンによる脂質ラフトの機能阻害によって抑制され、Wnt シグナルにおける脂質ラフトの役割の一端を明らかとした(図4)。

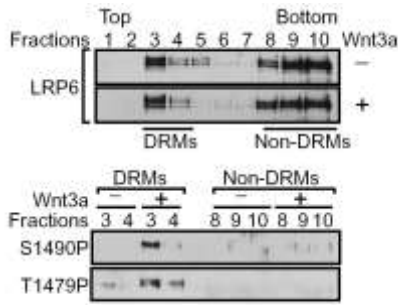


図3. Wnt3aで刺激すると、脂質ラフト (DRM) に局在するLRP6のみ1490番目のSerineと1479番目のThreonineがリン酸化を受けた。

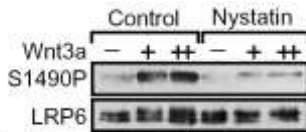


図4. ナイスタチンによる脂質ラフトの阻害によってWnt3aによるLRP6の1490番目のセリンのリン酸化が抑制された。

(2)

①安定発現した GPC4 はショ糖密度勾配遠心法において、脂質ラフトと非脂質ラフトの両方に局在したが、GPC4/SDC1 は非脂質ラフトにのみ局在した(図 5)。GPC4 の発現は Wnt3a による LRP6 のリン酸化を促進したが、GPC4/SDC1 の発現は抑制したことから、GPC4 が脂質ラフトに局在することが β -カテンン経路の活性化に重要であることを明らかとした(図 6)。Wnt3a 刺激により細胞内 Axin2 mRNA が増加し、これは Dkk1 により抑制された(図 7)。この時、GPC4 の発現は Wnt3a による Axin2 mRNA の増加を亢進したが、Dkk1 の抑制作用は減弱した(図 7)。よって、GPC4 は Wnt3a を脂質ラフトに集積するが、Dkk1 を集積しないことを明らかとした。GPC4 および GPC4/SDC1 の発現は Wnt5a による Rac の活性化と Ror2 のエンドサイトーシスを亢進したことから、GPC4 が非脂質ラフトに局在することが β -カテンン非依存性経路の活性化に重要であることを明らかとした(図 8, 9)。以上の結果から、GPC4 による Wnt シグナル伝達の制御機構について新たな知見を得ることができた。

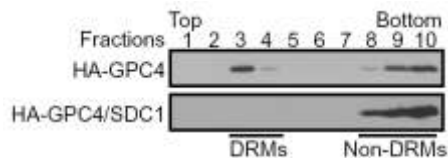


図5. GPC4は脂質ラフトと非脂質ラフトの両方に局在したが、GPC4/SDC1は非脂質ラフトにのみ局在した。

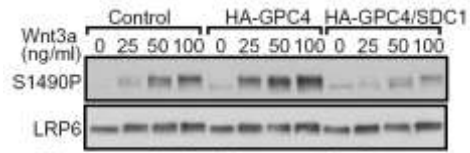


図6. GPC4の発現によりWnt3aによるLRP6の1490番目のセリンのリン酸化は増強したが、GPC4/SDC1の発現により抑制された。

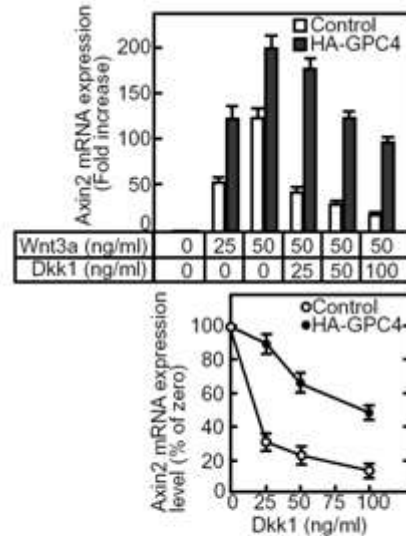


図7. Wnt3aによるAxin2 mRNAの増加はGPC4の発現により亢進した。一方、Dkk1によるWnt3a依存性Axin2 mRNA増加の抑制はGPC4の発現により抑制された。

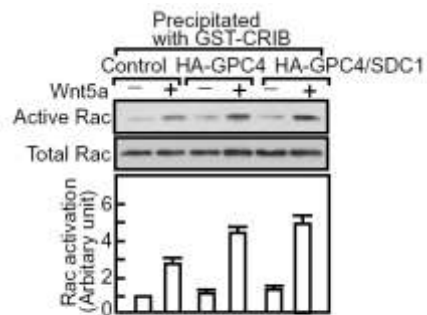


図8. Wnt5aで刺激するとRacは活性化したが、GPC4およびGPC4/SDC1の発現によりRacの活性化は増強した。

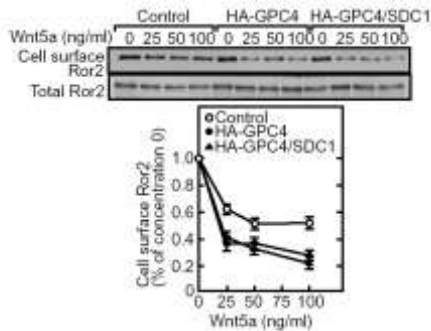


図9. Wnt5aで刺激すると受容体であるRor2のエンドサイトーシスが起きたが、GPC4およびGPC4/SDC1の発現によりWnt5a依存性Ror2のエンドサイトーシスは亢進した。

②分泌された GPC4 存在下で HeLaS3 細胞を Wnt3a で刺激すると、LRP6 のリン酸化が抑制され (図 10)、さらに Wnt5a による Rac の活性化も抑制された (図 11)。

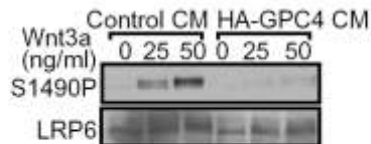


図10. 分泌されたGPC4 (HA-GPC4 CM) 存在下ではWnt3aによるLRP6の1490番目のセリンのリン酸化は抑制された。

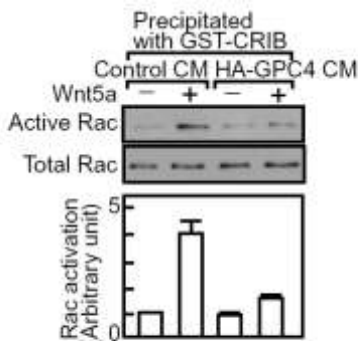


図11. 分泌されたGPC4 (HA-GPC4 CM) 存在下ではWnt5aによるRacの活性化が抑制された。

以上の結果から、GPC4 が Wnt の β -カテニン経路と β -カテニン非依存性経路を細胞膜上の脂質ラフトへの局在に依存して制御することを明らかとし、さらに細胞外に分泌された GPC4 においては、どちらの Wnt シグナルについても抑制することを明らかとし、GPC4 による Wnt シグナルの制御機構について新たな知見を得ることができた。

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 2 件)

1. Sakane H., Yamamoto H., Matsumoto S., Sato A., and Kikuchi A. Localization of glypican-4 in different membrane microdomains is involved in the regulation of Wnt signaling. *J. Cell Sci.* 125, 449-460, 2012 (査読有)
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)

[学会発表] (計 2 件)

1. 坂根 洋、山本英樹、松本真司、佐藤 朗、菊池 章、Glypican-4 の脂質ラフトへの局在に依存した Wnt シグナル伝達の制御機構、第 84 回日本生化学会大会、2011. 9. 23、国立京都国際会館
2. 坂根 洋、山本英樹、菊池 章、脂質ラフトにおける Wnt3a 依存性の LRP6 リン酸化の制御機構の解析、第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会、2010. 12. 8、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

坂根 洋 (Sakane Hiroshi)

大阪大学・医学系研究科・招へい研究員

研究者番号：80457291

(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：