

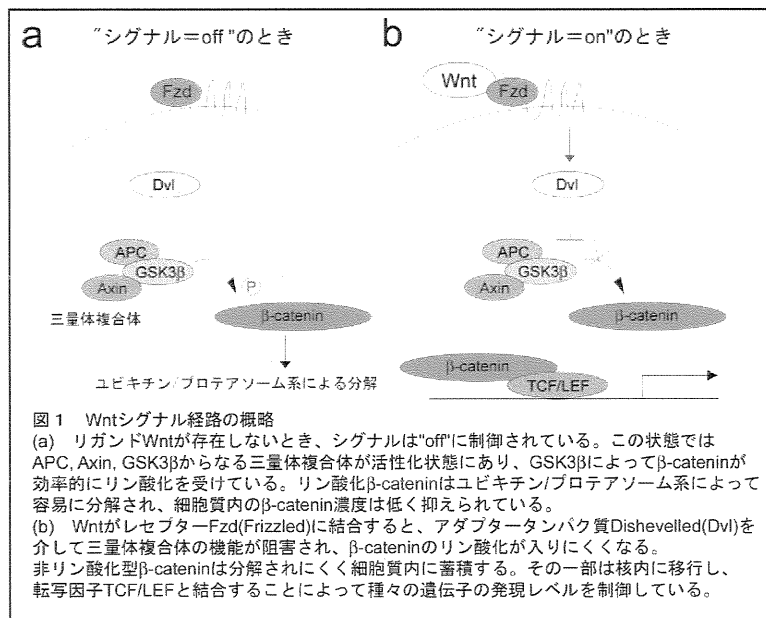
論文内容の要旨

論文題目

nucleoredoxin(NRX)の Wnt シグナル経路における役割の研究

氏名 船戸 洋佑

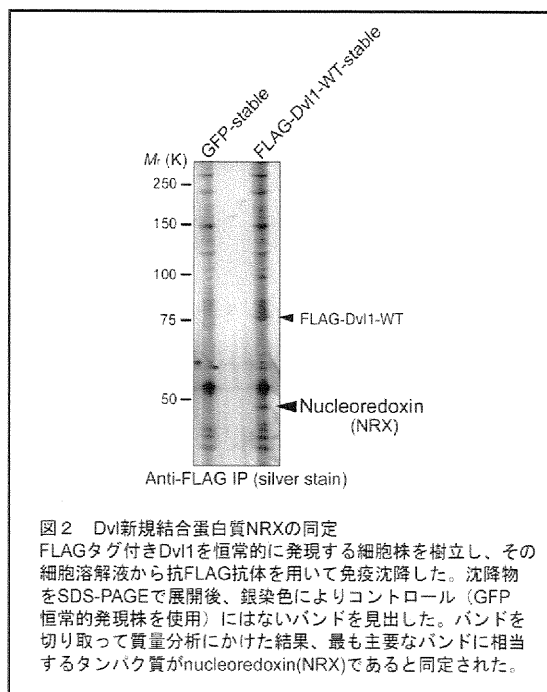
Wnt/ β -catenin 経路は生命の初期発生や幹細胞の多分化能維持に重要な役割を果たしている。また、Wntシグナルの異常な活性化は種々のがんの要因となることが知られている。これまでの解析により、Wnt/ β -catenin 経路の大まかな流れが判明している (図1)。シグナルが「off 状態」のとき、APC, Axin,そしてセリン/スレオニンキナーゼ GSK3 β からなる三量体複合体が活性化状態にあり、 β -catenin を効率よくリン酸化する。リン酸化 β -catenin はユビキチン/プロテアソーム系によって速やかに分解され、それにより細胞質内の β -catenin の濃度が低く抑えられている。リガンド Wnt がその受容体 Frizzled に結合すると、アダプタータンパク質 Dishevelled (Dvl) を介して上記 APC/Axin/GSK3 β 三量体複合体の働きが抑えられ、 β -catenin がリン酸化を受けにくくなる。非リン酸化型 β -catenin は分解を免れ細胞質内に蓄積し、一部は核内に移行して転写因子 TCF/LEF と結合し標的遺伝子の転写を活性化させることが知られている。



このような大まかな流れが明らかとなっている Wnt/ β -catenin 経路であるが、その詳細な分子メカニズムについては不明な点を多く残している。特にアダプタータンパク質 Dvl は Wnt/ β -catenin 経路のシグナル伝達に非常に重要であるにもかかわらず、どのようにして上流 (Wnt 及びその受容体 Fzd) からシグナルを受け取り、下流 (APC/Axin/ GSK3 β 三量体複合体) に伝えているのか、依然未解明のままである。

1. Dvl 新規結合蛋白質 NRX の同定

そこで私は Dvl による Wnt シグナル伝達の作用機序を明らかにすべく、Dvl の結合タンパク質を網羅的に探索することにした。この目的のために、私は FLAG タグをつけた Dvl1 の恒常的安定発現株を樹立し、その細胞溶解液から抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降することで Dvl の複合体を精製するという方法を用いた。質量分析法により、Dvl の主要な結合タンパク質として nucleoredoxin (NRX) が同定された(図 2)。NRX はチオール基(主にジスルフィド結合)還元酵素チオレドキシン(thioredoxin, TRX)に代表される TRX ファミリーに属しており、実際 NRX もジスルフィド結合還元活性を保持していることを私は突き止めた。



2. NRX による Wnt/ β -catenin 経路の抑制

培養細胞を用いた強制発現系により、私は NRX が Dvl の強制発現や Wnt リガンド刺激による Wnt/ β -catenin 経路の活性化を抑制することを見出した。また RNA 干渉法による NRX 発現抑制によって Wnt/ β -catenin 経路の活性化が観察され、内在性 NRX も Wnt/ β -catenin 経路の阻害因子として機能していることが確認された。NRX の発現抑制細胞においては細胞増殖能、並びにフォーカス形成能の亢進が見受けられ、細胞のがん化と関連している可能性が想起された。

3. Dvl と NRX のレドックス依存的な結合

私は NRX が TRX ファミリータンパク質の一員であり酸化/還元(レドックス)応答性因子であることから、Dvl/NRX 複合体に対する酸化/還元の影響を調べてみた。Dvl と NRX の精製タンパク質を混ぜ合わせ、酸化/還元状態下での両タンパク質の結合を解析したところ、還元状態では両者はより強固に結合し、酸化状態下では両タンパク質が解離することを見出した。また、細胞に対する過酸化水素処理によって抗 NRX 抗体による Dvl の共沈量が減少し、内在性の Dvl/NRX 複合体もまたレドックス依存的であることが判明した。この実験結果と似た結合様式として、TRX1 と ASK1 との結合が報告されている。

4. NRX による Wnt/ β -catenin 経路の酸化ストレス依存的活性化の制御

Dvl と NRX がレドックス依存的に結合し、また NRX が Wnt/ β -catenin 経路の抑制因子であることから、私は Wnt/ β -catenin 経路がレドックス依存的に活性化されるのではないかと考えた。その仮説を検証するため細胞に過酸化水素処理を施したところ、 β -catenin の蓄積、ならびに Wnt 経路の転写因子 TCF/LEF の活性化が観察され、確かに Wnt/ β -catenin 経路がレドックス依存的に活性化されることが明らかとなった。この現象は NRX の RNAi

細胞では顕著に抑制されており、レドックス依存性の Wnt/ β -catenin 経路の活性化が NRX を介して制御されていることが強く示唆された。

5. アフリカツメガエルの初期発生における NRX の役割

私はさらに生体内での NRX の機能を探るため、モデル動物としてアフリカツメガエル *Xenopus laevis* を用いて実験を行った。NRX は Dvl の mRNA 注入による二次軸形成を抑制し、ツメガエルにおいても Wnt/ β -catenin 経路を阻害することが確かめられた。また、NRX に対するアンチセンスモルフォリーノオリゴ (RNA 類似化合物モルフォリーノでできたアンチセンスオリゴ。生体内で安定に存在し、内在性タンパク質の合成を比較的長時間阻害できる) を注入し内在性の NRX タンパク質の合成を阻害したところ、頭部形成に異常をきたしたツメガエル胚が観察され (図 3) NRX がツメガエルの初期発生において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

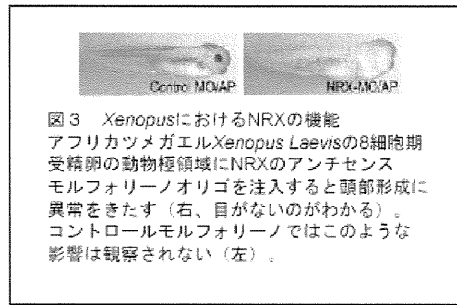


図3 *Xenopus*におけるNRXの機能
アフリカツメガエル*Xenopus laevis*の8細胞期受精卵の動物極領域にNRXのアンチセンスモルフォリーノオリゴを注入すると頭部形成に異常をきたす(右、目がないのがわかる)。コントロールモルフォリーノではこのような影響は観察されない(左)。

また、NRX mRNA をツメガエル胚の背側に注入すると、体軸が曲がった幼生が観察された。これはもう一つの Wnt 経路である Wnt/PCP 経路に特徴的な表現形である。実際、NRX mRNA の共注入は Dvl mRNA による軸形成不全を抑制し、また NRX の mRNA やアンチセンスモルフォリーノオリゴの注入によってアフリカツメガエル胚における細胞運動に異常をきたしていることが確認された。

本研究によって、私は Dvl の新規結合蛋白質として NRX を同定した。解析の結果 NRX は Wnt/ β -catenin 経路を負に制御する因子であり、Wnt/ β -catenin 経路のレドックス依存的制御 (図 4) という今まで知られていなかったシグナル伝達経路を担っていることが明らかとなった。またアフリカツメガエルを用いた研究によって NRX がアフリカツメガエルの正常発生に必要なこと、また Wnt/ β -catenin 経路のみならず Wnt/PCP 経路をも制御していることが突き止められた。今後の課題としてさらなる個体レベルでの NRX の生理的意義を明らかにすること、また Wnt/ β -catenin 経路の異常が大腸がんを始めとする多くの疾病の原因となっていることから、NRX の病理的意義、特にがん化およびその悪性化への関与の可能性を追求していくことが挙げられる。

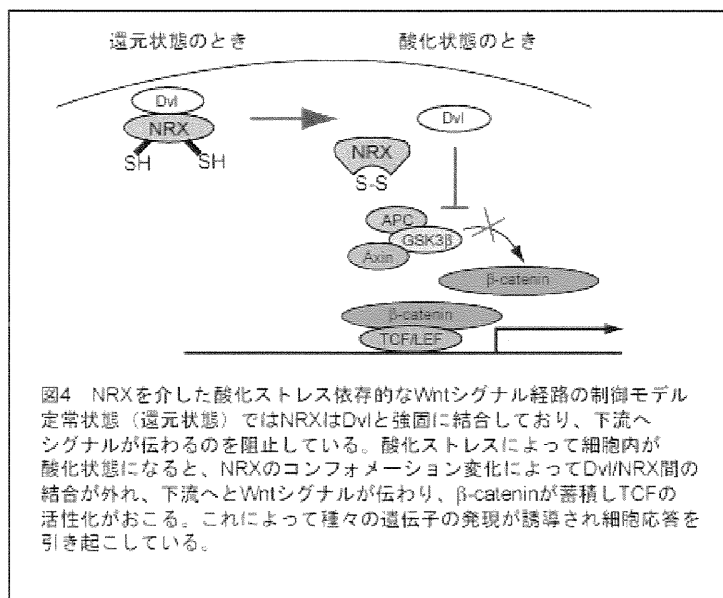


図4 NRXを介した酸化ストレス依存的なWntシグナル経路の制御モデル
定常状態(還元状態)ではNRXはDvlと強固に結合しており、下流へシグナルが伝わるのを阻止している。酸化ストレスによって細胞内が酸化状態になると、NRXのコンフォメーション変化によってDvl/NRX間の結合が外れ、下流へとWntシグナルが伝わり、 β -cateninが蓄積しTCFの活性化がおこる。これによって種々の遺伝子の発現が誘導され細胞応答を引き起こしている。