

審査の結果の要旨

氏名 船戸 洋 佑

Wnt/ β -catenin 経路は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。Wnt/ β -catenin 経路においては、シグナルが「off 状態」の時、APC, Axin,そしてセリン/スレオニンキナーゼ GSK3 β から成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。一方、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 のリン酸化が抑制される。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することが知られている。しかし、その詳細な分子メカニズムには不明な点が多く、本研究ではアダプタータンパク質 Dvl が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) に伝えているのかという点に着目し、研究を進めた。

1. Dvl 新規結合蛋白質 NRX の同定

Dvl による Wnt シグナル伝達の作用機序を明らかにするため、Dvl の結合タンパク質を探索した。この目的のために、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。NRX はチオール基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明らかにした。

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、NRX が Dvl の発現や 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 経路の活性化を観察し、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を確認した。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示唆された。

3. Dvl と NRX のレドックス依存的な結合

NRX が酸化/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。

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、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いう可能性が考えられた。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

更に生体内での 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。その結果、NRX は受精卵への 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示された。また、NRX に対するアンチセンスモルフォリーノオリゴを受精卵の動物極に注入し内在性の NRX タンパク質の合成を阻害すると、頭部形成に異常をきたした幼生が観察され、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になった。更に、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が異常をきたしていることを確認した。

以上、本研究は Dvl の新規結合蛋白質として NRX を同定し、機能解析の結果 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を明らかにした。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であること、Wnt/ β -catenin 経路のみならず Wnt/PCP 経路をも制御していること等を見出した。以上のことから、本研究は博士（薬学）の学位授与に十分に値するものと判定した。