

学 位 論 文

β -カテニン結合蛋白質 Duplin の核内輸送の分子機構とその意義

学位申請者 小 林 雅 史

広島大学大学院歯学研究科歯学専攻
口腔生体防御医学分野

(主任：岡本哲治教授)

2002 年

目次

| | |
|------------|----|
| I. 略記 | 1 |
| II. 序論 | 2 |
| III. 材料と方法 | 5 |
| IV. 結果 | 10 |
| V. 考察 | 14 |
| VI. 総括 | 18 |
| VII. 謝辞 | 19 |
| VIII. 参考文献 | 20 |
| IX. 図表 | 27 |

I. 略記

APC ; adenomatous polyposis coli protein

GSK-3 β ; glycogen synthase kinase-3 β

LRP ; low-density lipoprotein receptor-related protein

TCF ; T cell factor

HA ; hemagglutinin

GFP ; green fluorescent protein

SV40 ; simian virus 40

NLS ; nuclear localization signal (核移行シグナル)

MBP ; maltose-binding protein

GST ; glutathione S-transferase

NPC ; nuclear pore complex (核膜孔複合体)

II. 序論

Wnt <ウイント> 蛋白質は分子量約 4 万の分泌性糖蛋白質で，線虫やショウジョウバエから哺乳動物に至るまで広く保存されており，初期発生や形態形成に重要な役割を果たしている (1-6). Wnt の名はマウスの乳癌発生にかかわる癌遺伝子 *int-1* とショウジョウバエのセグメントポラリティー遺伝子 *wingless* が類似していることに由来する. β -カテニンは細胞膜裏打ち蛋白質として細胞接着や細胞骨格を制御するが，細胞質や核内にも存在して，Wnt シグナル伝達経路の重要な構成因子であることが明らかになっている (図 1). Wnt 刺激がない場合， β -カテニンは Axin, adenomatous polyposis coli protein (APC), glycogen synthase kinase-3 (GSK-3 β), および protein phosphatase 2A と複合体を形成し (7-16), この複合体中で，GSK-3 β は β -カテニンや Axin, APC を効率良くリン酸化する (7-9, 12, 15, 17-19). リン酸化された β -カテニンはユビキチンリガーゼのサブユニットである Fbw1 の WD ドメインに認識されてユビキチン化され，プロテアソームで分解される (20, 21). その結果，細胞質中での β -カテニンの蛋白質量は低く保たれる. 一方，Wnt が細胞膜上の Frizzled とその共役受容体である low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) に結合すると (22), シグナルが Dvl に伝達され，GSK-3 β の作用が抑制される. その結果， β -カテニンは低リン酸化状態となり，分解されずに細胞質に蓄積し核内に移行する. β -カテニンは核内で転写因子 T cell factor (TCF) と複合体を形成し，TCF を活性化する. その結果，哺乳動物では c-myc, c-jun, fra-1, サイクリン D1 など (4-6), 両生類では *siamois*, *twin* などの標的遺伝子の発現が促進され，体軸形成や種々

の細胞機能が制御される (1-3).

一方、大腸癌症例において、Wnt シグナル伝達経路の構成分子の遺伝子変異が認められており、いずれも β -カテニンが細胞内に蓄積することが報告されている (4, 23-26). また、胃癌、肝癌、メラノーマなど種々の癌症例においても β -カテニンが細胞内に蓄積しているという報告があることから (4)、 β -カテニンの機能の解明および β -カテニンに關与する因子の解明は癌化の機構の解明に非常に重要であると考えられる.

これまでに核内で Wnt シグナルを制御する種々の因子が報告されている. Groucho, Creb-binding protein, C-terminal-binding protein, NEMO-like kinase, Pontin52, Sox17 そして ICAT などである. いずれも β -カテニン, TCF に作用し, Wnt シグナルを制御する (27-34).

これら核内での種々の因子の他に、 β -カテニンに結合する核内蛋白質 Duplin (axis duplication inhibitor) が見出された (35). Duplin は 749 個のアミノ酸からなる核内蛋白質であり、C 末端側に塩基性アミノ酸のクラスター領域を有している. また、Duplin は C 末端で β -カテニンのアルマジロリピートと直接結合し、 β -カテニンと TCF の複合体形成を阻害する (図 2). Duplin を発現させたマウス線維芽細胞 L 細胞 (L 細胞) では、Wnt による細胞質内の β -カテニンの蓄積は抑制されないが、Wnt 依存性の TCF の転写活性の促進が抑制される. また、アフリカツメガエルの初期胚の背側に Duplin の mRNA を注入すると頭部が欠損し、背側化マーカーである siamois (36, 37) の遺伝子発現が抑制される. さらに、Duplin は Xwnt-8 や β -カテニン依存性の二次体軸形成を抑制する. このように、Duplin は β -カテニンの下流で、Wnt シグナル伝達経路を抑制的に制御

していると考えられる。

そこで、Wnt— β -カテニン経路に重要な役割を果たしていると考えられる Duplin の機能をさらに解明することを目的に研究を行った。

Ⅲ. 材料および方法

1. プラスミド

以下に示すプラスミドを作製し、実験に用いた。

pBTM116HA/Duplin-(482-749), pBJ-Myc/Duplin, pBJ-Myc/Duplin-(1-482), pBJ-Myc/Duplin-(482-749), pBJ-Myc/Duplin^{Δ500-584}, pMALc-2/importin α -P, pGEX-GFP/Duplin-(500-584), pGEX-GFP/Duplin-(500-565), pGEX-GFP/Duplin-(565-668), pGEX/Duplin-(500-521)-GFP, pGEX/Duplin-(542-546)-GFP, pGEX-GFP, pGEX/SV40NLS-GFP, pCGN/Duplin, pCGN/Duplin^{Δ500-584}, pEF-BOS-HA/hTCF-4E, pSP-Myc/Duplin, pSP-Myc/Duplin^{Δ500-584}, pSP/GFP

すべてのプラスミドの構造は制限酵素分析によって、またほとんどの場合 DNA シーケンスによって確認した。

2. Duplin 結合蛋白質の検索 (酵母 two-hybrid 法)

酵母 two-hybrid 法は、酵母 *S.cerevisiae* L40 (MATa trp1 leu2 his3 ade2 LYS2::lexA-HIS3 URA3::lexA-lacZ) を用いて行った。L40 は栄養培地 (2% glucose, 2% Bacto-yeast extracts, 0.002% adenine sulfate) で育てた。L40 へのプラスミドの導入は酢酸リチウム法で行った。導入後の L40 は、2% glucose と 0.67% yeast nitrogen base without amino acids (DIFCO) からなる SD 培地に、必要時に適当なアミノ酸を添加した培地で生育させた。L40 に pBTM116HA/Duplin-(482-749) と pACT2 ベクターに組み込まれたマウスの脳の cDNA ライブラリープラスミドを導入した。pBTM116HA/Duplin-(482-749) は ADH プロモーターから転

写翻訳され LexA の DNA 結合ドメインと Duplin との融合蛋白質として発現する。26 万のライブラリーをスクリーニングし、トリプトファン、ロイシン、ヒスチジンを欠いた SD プレートに植菌した。pACT2 ベクター中に挿入された cDNA からの蛋白質が Duplin 蛋白質と相互作用すると、LexA-HIS3 レポーター遺伝子からヒスチジン合成酵素系が誘導され、ヒスチジンを欠く培地で生育することができる。ヒスチジンを欠く培地で生育する L40 のコロニーは β -galactosidase も、ヒスチジン合成酵素と同様に、Duplin と cDNA からの蛋白質が相互作用することによって誘導され発現する。 β -galactosidase 活性が陽性 (LacZ⁺) の L40 からプラスミドを回収し、electroporation により大腸菌 HB101 に導入し、ロイシンを欠く M9 プレートに植菌した。HB101 は leuB⁻であり、この欠損は pACT2 ライブラリープラスミドの LEU2 遺伝子により相補される。ライブラリープラスミドを HB101 から回収し、pBTM116HA/Duplin-(482-749)を導入した L40 に再度トランスフォームした。この L40 の LacZ⁺を確認した後に、DNA シーケンスを行いプラスミドの塩基配列を決定した。

3. Duplin と importin α の培養細胞内結合実験

pBJ-Myc-Duplin 変異体を発現させた COS 細胞を lysis buffer A (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 1% Nonidet P-40, 20 μ g/ml leupeptin, 20 μ g/ml aprotinin, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) で溶解した。その溶解物を抗 Myc 抗体で免疫沈降し、この免疫複合体を SDS-polyacrylamide gel electrophoresis で分離した後、ニトロセルロースフィルターに転写し、抗 Myc 抗体および抗 importin α 抗体でウエスタンブロッティングを行った。尚、哺乳

類の importin α は大きく 3 つのサブファミリーを形成しており、マウスには P, Q, S のサブファミリーが存在することから、本実験では importin α -P, -Q, -S それぞれを認識する抗体を用いた。

4. 精製蛋白を用いた In vitro における Duplin と importin α の結合実験

GST-GFP (1 μ M) または GST-GFP-Duplin-(500-584) (1 μ M) と MBP-importin α -P (30 pmol) を固定したアミロースレジンを reaction mixture (20mM Tris/HCl pH7.5 and 1mM dithiothreitol) 中で 4°C, 1 時間インキュベートした後、アミロースレジンを沈降した。この沈降物を抗 MBP 抗体および抗 GST 抗体でウエスタンブロットングにて解析した。

5. Duplin の局在観察 (免疫染色)

L 細胞に、pBJ-Myc-Duplin および pBJ-Myc-Duplin ^{Δ 500-584} を発現させた。発現細胞を phosphate-buffered saline にて洗浄後、4%パラホルムアルデヒドで固定した。続いて、0.1% Triton X-100 と 2 mg/ml 牛血清アルブミンで 1 時間ブロッキングした後、抗 Myc 抗体、蛍光ラベルした抗マウス IgG でそれぞれ 1 時間インキュベートした。観察は confocal laser-scanning microscopy (Zeiss LSM510, Jena, Germany) で行った。

6. マイクロインジェクション

GST-GFP 融合 Duplin 蛋白質を、micromanipulator5171[®] および transjector 5246[®] (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Germany) を用いて、L 細胞の

細胞質内にマイクロインジェクションにて導入した。30 分後 4%パラホルムアルデヒドで固定した後、GST-GFP 融合 Duplin 蛋白質の細胞内局在を confocal laser-scanning microscopy で観察した。

7. Duplin と β -カテニンの培養細胞内結合実験

pBJ-Myc-Duplin および pBJ-Myc-Duplin ^{Δ 500-584} を発現させた COS 細胞を lysis buffer B (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 20 μ g/ml leupeptin, 20 μ g/ml aprotinin, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) で溶解し、sonication 後 100,000g で遠心し、上清を回収した。その上清を抗 Myc 抗体で免疫沈降し、この免疫複合体を抗 Myc 抗体および抗 β -カテニン抗体によるウエスタンブロットングにて解析した。

8. Wnt 依存性の β -カテニンの蓄積

L 細胞に HA-Duplin, HA-Duplin ^{Δ 500-584} を恒常的に発現させた細胞 (L/Duplin 細胞, L/ Duplin ^{Δ 500-584} 細胞) を用いた。コントロールとして Neo 耐性因子のみを発現させた細胞 (L/Neo 細胞) を用いた。L/Neo 細胞 (-)と L/Duplin 細胞 (full)と L/ Duplin ^{Δ 500-584} 細胞 (Δ 500-584) を Wnt-3a コンディショニングメEDIUM (38)で 8 時間刺激した後、lysis buffer A で溶解した。その溶解物を抗 β -カテニン抗体によるウエスタンブロットングにて解析した。

9. ルシフェラーゼ分析

L/Neo 細胞 (−)と L/Duplin 細胞 (full)と L/Duplin^{Δ500-584} 細胞(Δ 500-584)に pTOPFLASH、 pEF-BOS-HA/hTcf-4E および pME18S/lacZ を発現させて (17, 23, 39), 46 時間後に Wnt-3a コンディショニングメディウムで 8 時間刺激した。ルシフェラーゼ分析は PicaGene (Toyo B-NET Co., Ltd., Tokyo, Japan) および lumiphotometer TD4000 (Futaba Medical, Tokyo, Japan)を用いて行った。

10. アフリカツメガエルの表現型の分析

pSP-Myc/Duplin, pSP-Myc/Duplin^{D500-584} および pSP/GFPをテンプレートとして、SP6-mMESSAGE mMACHINE kit (Ambion, Texa, USA) を用いてmRNAを作製した。4細胞期のアフリカツメガエルの受精卵の背側2割球および腹側2割球にmRNAを等量ずつ注入し、3日後のstage 40 から41の尾芽期でその形態を観察した。

IV. 結果

今回の研究で用いた種々の Duplin の変異体を示す (Fig. 4).

1. 酵母 two-hybrid 法による Duplin の結合蛋白質の検索

Duplin の結合蛋白質を酵母 two-hybrid 法を用いて検索した. Duplin の 482-749 のアミノ酸領域 (Duplin-(482-749)) に結合する蛋白質を, マウスの脳の cDNA ライブラリーから単離する事を試みたところ, 26 万クローンのスクリーニングから 4 個の陽性クローンを単離し, そのうちの 하나가 importin α -Q2 であった.

2. Duplin と importin α の結合

Duplin が importin α と哺乳動物細胞内で複合体を形成するか否かについて検討した. Myc-Duplin を COS 細胞に発現させ, その細胞溶出液を抗 Myc 抗体で免疫沈降すると, Myc-Duplin 複合体中に内在性の importin α -P を検出した (Fig. 5A, 1-4). また, Myc-Duplin 複合体中に内在性の importin α -Q, -S も検出した (Fig. 5A, 5-12). これらの結果から, Duplin が importin α の 3 つのサブファミリー全てと複合体を形成することが明らかとなった.

Duplin のどの領域が importin α との複合体形成に必要であるか否かについても検討した. Duplin の種々な変異体を COS 細胞に発現させ (Fig. 5B, 2-5), 抗 Myc 抗体で免疫沈降すると, importin α は Duplin 全長および Myc-Duplin-(482-749) と共沈し, Myc-Duplin-(1-482) とは共沈しなかった (Fig. 5B, 7-9). アミノ酸 500-584 の領域には 5 つの塩基性アミノ酸クラスターが存在する (35). この

塩基性アミノ酸領域を欠失させると(Duplin^{Δ500-584}), importin αとは共沈しなかった (Fig. 5B, 10) ことから, Duplin は 500-584 の塩基性アミノ酸領域で importin αと複合体を形成ことが明らかとなった。

そこで, この塩基性アミノ酸領域が importin αと直接結合するカリコンビナント蛋白質を用いて検討した。GST-GFP-Duplin-(500-584)は MBP-importin αと共沈したが, GST-GFP は共沈しなかった (Fig. 5C) ことから, Duplin は 500-584 の領域で importin αと直接結合することが明らかとなった。

3. Duplin の核移行シグナル (nuclear localization signal : NLS) の検索

Duplin の 500-584 の領域が核内局在に必要であるか否か検討した。Duplin 全長 (full) あるいは Duplin^{Δ500-584} (Δ500-584) を発現させた L 細胞を免疫染色し, その局在を観察した。Duplin 全長は核内に, Duplin^{Δ500-584} は細胞質に局在していた (Fig. 6A)。この結果から, Duplin の核内局在には 500-584 の領域が必要であり, この領域が Duplin の NLS として機能していることが示唆された。

そこで, この領域に核移行能があるか検討した。種々の GST-GFP-Duplin のリコンビナント蛋白質を, L 細胞の細胞質にマイクロインジェクションにて導入すると, 5つ全ての塩基性アミノ酸クラスターを含む Duplin-(500-584) と前半の3クラスターを含む Duplin-(500-564) は核内へと移行した。一方, 後半の2クラスターを含む Duplin-(565-668) は完全には核内へと移行しなかった (Fig. 6B, a-c)。また, 前半の2クラスターを含む Duplin-(500-521) と3番目のクラスターを含む Duplin-(542-546) も核内へと移行した (Fig. 6B, d and e)。ポジティブコントロールとし GST-NLS(SV40)-GFP を, ネガティブコントロールとして

GST-GFP を用いた (Fig. 6B, f and g). この結果から, Duplin の核移行シグナルはいずれの塩基性アミノ酸クラスターにも存在するが, 特に前半の3クラスターが重要であることが示唆された. 以上の結果から, Duplin は importin α と C 末端側の塩基性アミノ酸領域で結合して核内へ輸送されることが明らかになった.

4. Duplin の核内局在の意義

Duplin は β カテニンと結合し, そのシグナル伝達を阻害することから (35), β -カテニンのシグナル伝達に及ぼす Duplin の核内移行の影響を解析した.

まず, 核内移行しない Duplin の変異体, Duplin ^{Δ 500-584} が β -カテニンに結合できるか否か解析した. COS 細胞に Duplin 全長 (full), Duplin ^{Δ 500-584} (Δ 500-584) を発現させて抗 Myc 抗体を用いて免疫沈降した結果, 内在性の β -カテニンは両者と共沈した (Fig. 7A).

次に, Duplin ^{Δ 500-584} が Wnt-3a 刺激による β -カテニンの蓄積を制御するか否か解析した. L/Neo 細胞 (-) と L/Duplin 細胞 (full) と L/Duplin ^{Δ 500-584} 細胞 (Δ 500-584) を Wnt-3a で刺激し, それぞれの β -カテニンのレベルをイムノプロットで検討した. その結果, いずれの細胞においても Wnt-3a 依存性の β -カテニンの蓄積には差を認めなかった (Fig. 7B).

次に, L/Neo 細胞 (-) と L/Duplin 細胞 (full) と L/Duplin ^{Δ 500-584} 細胞 (Δ 500-584) を用いて, Wnt-3a 依存性の TCF 活性について解析した. その結果, Wnt-3a 刺激した L/Neo 細胞では TCF 活性は上昇したが, L/Duplin 細胞では活性の上昇は抑制された. 一方, L/Duplin ^{Δ 500-584} 細胞では抑制は認められなかった (Fig. 7C).

したがって、Duplin は Wnt-3a 依存性の TCF の活性化を核内で抑制することが示唆された (Fig. 7C).

Wnt シグナル伝達経路の構成分子は、アフリカツメガエル体軸形成、特に背腹軸形成を制御している (40). Duplin をアフリカツメガエルの背側に注入すると頭部構造が欠損したが (Fig. 7D, a), 腹側注入では表現型の変化は認めなかった (Fig. 7D, b) (35). そこで、Duplin の核内局在がアフリカツメガエルの背腹軸形成の抑制作用に影響するか解析した. アフリカツメガエル背側に Duplin $\Delta^{500-584}$ を注入しても表現型の変化は認めなかった (Fig. 7D, c). また、腹側においても Duplin を注入した時と同様に表現型の変化は認めなかった (Fig. 7D, d). これらの結果から、Duplin は背腹軸形成を抑制しているが、その機能には、核内局在が必要であることが明らかになった.

V. 考察

Duplin は β -カテニンに結合する核内蛋白質であることは報告されているが (35), その核内移行のメカニズムは明らかにされていなかった. 今回, Duplin-(482-749)の結合蛋白質として importin α が同定されたことから, Duplin の核内移行は importin α を介して行われることが示唆された.

Importin α は, 核内で機能する蛋白質を細胞質から核まで輸送するために働く因子の1つで, アルマジロモチーフという疎水性アミノ酸に富んだ 42~43個のアミノ酸からなる繰り返し配列を分子の中央部分にもつ分子量 58,000 の分子で, このアルマジロモチーフで核局在化シグナル (NLS) を認識する (41). 哺乳類の importin α は大きく3つのサブファミリーを形成しており, 3つのサブファミリーはそれぞれアミノ酸レベルで50%以上の相同性をもっている (42). マウスには P, Q, S のサブファミリーが存在する. importin α -Q ファミリーは Q1, Q2 の2つがあり, アミノ酸レベルで80%以上の相同性をもっている. Importin α は NLS を認識すると importin β , Ran と複合体を形成し, 核膜に存在する核膜孔複合体 (nuclear pore complex : NPC) を能動的に通過する (41, 43). 核内にはいると importin β と解離し, 輸送を終了する (Fig. 3).

Duplin は importin α の全てのファミリーと哺乳動物細胞内で複合体を形成する. 今回の結果で, importin α が Duplin-(482-749)と複合体を形成し, Duplin-(1-482)とは形成しなかったことは, Duplin-(482-749)が核内に, Duplin-(1-482)が細胞質に局在しているという所見と一致している (35).

典型的な NLS は, 塩基性アミノ酸が数個連なった形で存在する塩基性 NLS

である (44). この塩基性 NLS は現在大きく 2 つに分類することができる. 1 つは SV40 ウイルスの T 抗原 (126-PKKKRKV-132) に代表されるような, 1 つの塩基性アミノ酸クラスターで活性を示すもので, 単極型とよばれる. もう 1 つは, ヌクレオプスミン (155-KRPAATKKAGQAKKKK-170) に代表される 10 数個のアミノ酸を 2 つの塩基性アミノ酸クラスターが挟む形で存在している双極型と呼ばれるものである. Duplin はアミノ酸 500-584 の領域に, 5 つの塩基性アミノ酸クラスターを有している. その塩基性アミノ酸クラスターは KKRRKK⁵⁰⁵, KPKK⁵¹⁸, KKRKR⁵⁴⁶, KRR⁵⁷⁵ および KRKK⁵⁸⁴ である(35). Duplin はこの領域で importin α と直接結合し, この領域を欠失した変異体 (Duplin ^{Δ 500-584}) が importin α と複合体を形成できず, 核内に移行できない. また, Duplin-(500-584) を L 細胞の細胞質に導入すると核内へと移行した. これらの結果から, この塩基性アミノ酸領域が Duplin の NLS であると考えられる. また, Duplin--(500-521), Duplin-(565-668), および Duplin-(542-546)も核内へと移行したことから, KKRRKKSSGERLKEEKPKK⁵¹⁸ および KRRSNRQVKRKK⁵⁸⁴ は双極型, KKRKR⁵⁴⁶ は単極型の NLS として機能していることが考えられる.

Duplin の核内局在は, その機能においても重要であると考えられる. Duplin の機能は C 末端で β -カテニンのアルマジロリピートと直接結合し, β -カテニンと TCF の複合体形成を阻害することである (35). L/Duplin 細胞では, Wnt 依存性の TCF の転写活性の促進が抑制されるが, L/Duplin ^{Δ 500-584} 細胞では抑制は認めなかった. また, アフリカツメガエルの初期胚の背側に Duplin の mRNA を注入すると頭部が欠損するが, Duplin ^{Δ 500-584} の mRNA を注入してもその表現型に変化は認めなかった. このように, 塩基性アミノ酸領域を欠失した変異体

は、Duplin による Wnt 依存性の TCF 転写活性および背腹軸形成の抑制作用を示さなかった。また、塩基性アミノ酸領域を欠失した変異体も β -カテニンと結合することから、Duplin は他の β -カテニンと結合する核内蛋白質と共同して、 β -カテニン-TCF 複合体の転写活性を抑制している可能性も考えられる。

本研究に用いたアフリカツメガエルの初期胚は体軸形成制御を研究するための良いモデル生物であり、Wnt シグナル伝達経路の機能解析によく用いられる。体軸形成は動物の初期発生における「形作り」の最も重要な過程の一つであり、Wnt シグナル伝達経路の構成分子は体軸形成、特に背腹軸形成を制御している。その際、Wnt は背側化因子として機能している (45)。背腹軸形成後の外胚葉からさらに頭部が形成される際には、前後軸の決定が重要となる。その際、後方化因子である Wnt が Dickkopf や Frzb に抑制されることにより、頭部が形成されると考えられる (46, 47)。Duplin は初期発生期に恒常的に弱く発現しており、特に前後軸を決定する原腸陥入期に強く発現している (35)。この特異的な発現は、発生段階における Duplin が適切な時期と場所で発現していることを示唆している。Duplin の各発生時期における発現様式と分布や活性を明らかにすることが、動物の「形作り」の解明の一端を担うと考えられる。

一方、癌は遺伝子の変異や欠失などの異常が蓄積して生じることが明らかになり、癌の発生に関与すると考えられる遺伝子が次々に同定されている。大腸癌症例において、その約 80% に APC 遺伝子の変異、約 10% に β -カテニンの遺伝子変異が認められており、いずれも β -カテニンが細胞内に蓄積することが報告されている (4, 23-26)。また、胃癌、肝癌、メラノーマ、皮膚癌など種々の癌症例においても β -カテニンが細胞内に蓄積しているという報告があり (4)、

β -カテニンが癌の発生に関与していることは決定的である。Duplin は β -カテニンの機能を抑制するので、癌抑制遺伝子として機能する可能性が高く、Duplin の作用機構や遺伝子変異を解析することは発癌機構の解明のみならず、Wnt- β -カテニン経路の構成分子を標的とした分子標的治療の開発などにつながると考えられる。

本研究の結果から、Duplin は importin α と C 末端側の塩基性アミノ酸領域で結合して核内へ輸送され、この塩基性アミノ酸領域が Duplin の核移行シグナルとして機能していることが明らかとなり、Duplin の核内移行の分子機構の一端が解明できた。さらに、核内に移行した Duplin が β -カテニンと結合することにより β -カテニンと TCF の複合体形成を阻害し、 β -カテニン-TCF 複合体の転写活性化能を抑制すること、また、その機能発現には Duplin の核内局在が重要であることが明らかとなった。このように、Duplin は核内の β -カテニン-TCF 複合体の転写活性化能を制御し、最終的に Wnt- β -カテニン経路の標的遺伝子の発現を調整し、体軸形成や種々の細胞機能および細胞の癌化を制御していると考えられる。

VI. 総括

1. Wnt シグナル伝達経路の構成分子 Duplin に結合する蛋白質として核内輸送蛋白質である importin α を同定した.
2. Duplin は importin α の 3 つのファミリーすべてと複合体を形成し、Duplin の C 末端側の塩基性アミノ酸領域がこの複合体形成に必要であった.
3. Duplin の核内移行には C 末端側の塩基性アミノ酸領域が必要であり、その領域だけで十分であった.
4. Duplin による Wnt 依存性の TCF 転写活性, および背腹軸形成の抑制作用には Duplin の核内局在が重要であることが明らかになった.

以上の結果から, Duplin は importin α と C 末端側の塩基性アミノ酸領域で結合して核内へ輸送され, この塩基性アミノ酸領域が Duplin の核移行シグナルとして機能していることが明らかとなり, Duplin の核内移行の分子機構の一端が解明できた. さらに, 核内に移行した Duplin が β -カテニンと結合することにより β -カテニンと TCF の複合体形成を阻害し, β -カテニン-TCF 複合体の転写活性化能を抑制すること, また, その機能発現には Duplin の核内局在が重要であることが明らかとなった. このように, Duplin は核内の β -カテニン-TCF 複合体の転写活性化能を制御し, 最終的に Wnt- β -カテニン経路の標的遺伝子の発現を調整し, 体軸形成や種々の細胞機能および細胞の癌化を制御していると考えられる.

VII. 謝辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御指導、御鞭撻ならびに御校閲を賜りました広島大学歯学部応用口腔医学講座 岡本哲治教授に謹んで感謝の意を表します。また、本論文の作成に際し、御助言ならびに御校閲を賜りました本学顎口腔医療学講座 高田 隆教授ならびに応用口腔医学講座 菅井基行教授に心からお礼申し上げます。

尚、本研究に際し直接実験の御指導、御助言を賜りました本学医学部医学科生化学第一講座 菊池 章教授に深く感謝いたします。そして、本研究に御協力いただきました本学医学部医学科生化学第一講座 岸田昭世講師，東京大学大学院総合文化研究科 浅島 誠教授，福井彰雅博士ならびに道上達男博士，大阪大学大学院医学系研究科 米田悦啓教授ならびに宮本洋一博士，京都大学大学院理学研究科 高田慎治助教授に深厚なる謝意を表します。また、本研究を進めるに際し、多大の御配慮、御助言をいただいた本学応用口腔医学講座教室員ならびに本学医学部医学科生化学第一講座教室員各位に深謝いたします。

最後に、常に私を支え続けてくれた両親 豪一・里絵，妻 順子そして娘 桃子に心より感謝いたします。

VIII. 参考文献

1. Wodarz, A. and Nusse, R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 14: 59-88, 1998.
2. Dale, T. C. Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem. J.*, 329: 209-223, 1998.
3. Miller, J. R., Hocking, A. M., Brown, J. D., and Moon, R. T. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/ β -catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene*, 18: 7860-7872, 1999.
4. Bienz, M. and Clevers, H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*, 103: 311-320, 2000.
5. Polakis, P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.*, 14: 1837-1851, 2000.
6. Seidensticker, M. J. and Behrens, J. Biochemical interactions in the wnt pathway. *Biochim. Biophys. Acta*, 1495: 168-182, 2000.
7. Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S., and Kikuchi, A. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin. *EMBO J.*, 17: 1371-1384, 1998.
8. Kikuchi, A. Roles of Axin in the Wnt signalling pathway. *Cell. Signal.*, 11: 777-788, 1999.
9. Yamamoto, H., Kishida, S., Uochi, T., Ikeda, S., Koyama, S., Asashima, M.,

- and Kikuchi, A. Axin, a member of the Axin family, interacts with both glycogen synthase kinase-3 β and β -catenin and inhibits axis formation of *Xenopus* embryos. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 2867-2875, 1998.
10. Kishida, S., Yamamoto, H., Ikeda, S., Kishida, M., Sakamoto, I., Koyama, S., and Kikuchi, A. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, directly interacts with Adenomatous Polyposis Coli and regulates the stabilization of β -catenin. *J. Biol. Chem.*, 273: 10823-10826, 1998.
 11. Sakanaka, C., Weiss, J. B., and Williams, L. T. Bridging of β -catenin and glycogen synthase kinase-3 β by Axin and inhibition of β -catenin-mediated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95: 3020-3023, 1998.
 12. Hart, M. J., de los Santos, R., Albert, I. N., Rubinfeld, B., and Polakis, P. Downregulation of β -catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, β -catenin and GSK-3 β . *Curr. Biol.*, 8: 573-581, 1998.
 13. Itoh, K., Krupnik, V. E., and Sokol, S. Y. Axis determination in *Xenopus* involves biochemical interactions of axin, glycogen synthase kinase 3 and β -catenin. *Curr. Biol.*, 8: 591-594, 1998.
 14. Hsu, W., Zeng, L., and Costantini, F. Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain. *J. Biol. Chem.*, 274: 3439-3445, 1999.
 15. Ikeda, S., Kishida, M., Matsuura, Y., Usui, H., and Kikuchi, A. GSK-3 β -dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by β -catenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin.

- Oncogene, 19: 537-545, 2000.
16. Yamamoto, H., Hinoi, T., Michiue, T., Fukui, A., Usui, H., Janssens, V., Van Hoof, C., Goris, J., Asashima, M., and Kikuchi, A. Inhibition of the Wnt signaling pathway by the PR61 subunit of protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.*, 276: 26875-26882, 2001.
 17. Kishida, M., Koyama, S., Kishida, S., Matsubara, K., Nakashima, S., Higano, K., Takada, R., Takada, S., and Kikuchi, A. Axin prevents Wnt-3a-induced accumulation of β -catenin. *Oncogene*, 18: 979-985, 1999.
 18. Yamamoto, H., Kishida, S., Kishida, M., Ikeda, S., Takada, S., and Kikuchi, A. Phosphorylation of Axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3 β regulates its stability. *J. Biol. Chem.*, 274: 10681-10684, 1999.
 19. Hinoi, T., Yamamoto, H., Kishida, M., Takada, S., Kishida, S., and Kikuchi, A. Complex formation of adenomatous polyposis coli gene product and Axin facilitates glycogen synthase kinase-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin and downregulates β -catenin. *J. Biol. Chem.*, 275: 34399-34406, 2000.
 20. Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., Ishida, N., Hattori, K., Nakamichi, I., Kikuchi, A., Nakayama, K.-I., and Nakayama, K. An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of β -catenin. *EMBO J.*, 18: 2401-2410, 1999.
 21. Hart, M., Concordet, J.-P., Lassot, I., Albert, I., de los Santos, R., Durand, H.,

- Perret, C., Rubinfeld, B., Margottin, F., Benarous, R., and Polakis, P. The F-box protein β -TrCP associates with phosphorylated β -catenin and regulates its activity in the cell. *Curr. Biol.*, 9: 207-210, 1999.
22. Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J., and He, X. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*, 407, 2000.
23. Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Clevers, H. Constitutive transcriptional activation by a β -catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science*, 275: 1784-1787, 1997.
24. Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science*, 275: 1787-1790, 1997.
25. Polakis, P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim. Biophys. Acta*, 1332: F127-F147, 1997.
26. Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Munemitsu, S., and Polakis, P. Loss of β -catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res.*, 57: 4624-4630, 1997.
27. Cavallo, R. A., Cox, R. T., Moline, M. M., Roose, J., Polevoy, G. A., Clevers, H., Peifer, M., and Bejsovec, A. Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature*, 395: 604-608, 1998.

28. Waltzer, L. and Bienz, M. Drosophila CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling. *Nature*, 395: 521-525, 1998.
29. Hecht, A., Vleminckx, K., Stemmler, M. P., van Roy, F., and Kemler, R. The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of β -catenin in vertebrates. *EMBO J.*, 19: 1839-1850, 2000.
30. Takemaru, K.-I. and Moon, R. T. The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J. Cell Biol.*, 149: 249-254, 2000.
31. Brannon, M., Brown, J. D., Bates, R., Kimelman, D., and Moon, R. T. XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout Xenopus development. *Development*, 126: 3159-3170, 1999.
32. Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J., Nagai, S.-I., Nishita, M., Meneghini, M., Barker, N., Waterman, M., Bowerman, B., Clevers, H., Shibuya, H., and Matsumoto, K. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between β -catenin and transcription factor TCF. *Nature*, 399: 798-802, 1999.
33. Bauer, A., Huber, O., and Kemler, R. Pontin52, an interaction partner of β -catenin, binds to the TATA box binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95: 14787-14792, 1998.
34. Zorn, A. M., Barish, G. D., Williams, B. O., Lavender, P., Klymkowsky, M. W., and Varmus, H. E. Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17a/b and XSox3 physically interact with β -catenin. *Mol. Cell*, 4: 487-

498, 1999.

35. Sakamoto, I., Kishida, S., Fukui, A., Kishida, M., Yamamoto, H., Hino, S.-I., Michiue, T., Takada, S., Asashima, M., and Kikuchi, A. A novel β -catenin binding protein inhibits β -catenin-dependent Tcf activation and axis formation. *J. Biol. Chem.*, 275: 32871-32878, 2000.
36. Lemaire, P., Garrett, N., and Gurdon, J. B. Expression cloning of Siamois, a *Xenopus* homeobox gene expressed in dorsal-vegetal cells of blastulae and able to induce a complete secondary axis. *Cell*, 81: 85-94, 1995.
37. Brannon, M., Gomperts, M., Sumoy, L., Moon, R. T., and Kimelman, D. A β -catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev.*, 11: 2359-2370, 1997.
38. Shibamoto, S., Higano, K., Takada, R., Ito, F., Takeichi, M., and Takada, S. Cytoskeletal reorganization by soluble Wnt-3a protein signalling. *Genes Cells*, 3: 659-670, 1998.
39. Hino, S.-I., Kishida, S., Michiue, T., Fukui, A., Sakamoto, I., Takada, S., Asashima, M., and Kikuchi, A. Inhibition of Wnt signaling pathway by Idax, a novel Dvl-binding protein. *Mol. Cell. Biol.*, 21: 330-342, 2001.
40. Moon, R. T. and Kimelman, D. From cortical rotation to organizer gene expression: toward a molecular explanation of axis specification in *Xenopus*. *Bioessays*, 20: 536-545, 1998.
41. Yoneda, Y. Nucleocytoplasmic protein traffic and its significance to cell function. *Genes Cells*, 5: 777-787, 2000.

42. Tsuji, L., Takumi, T., Imamoto, N., and Yoneda, Y. Identification of novel homologues of mouse importin alpha, the alpha subunit of the nuclear pore-targeting complex, and their tissue-specific expression. *FEBS Lett.*, 416: 30-34, 1997.
43. Görlich, D. Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J.*, 17: 2721-2727, 1998.
44. Dingwall, C. and Laskey, R. A. Nuclear targeting sequences—a consensus? *Trends Biochem. Sci.*, 16: 478-481, 1991.
45. Christian, J. L., Olson, D. J., and Moon, R. T. Xwnt-8 modifies the character of mesoderm induced by bFGF in isolated *Xenopus* ectoderm. *EMBO J.*, 11: 33-41, 1992.
46. Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A. P., Blumenstock, C., and Niehrs, C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*, 391: 357-362, 1998.
47. Wang, S., Krinks, M., Lin, K., Luyten, F. P., and Moos, M., Jr. Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell*, 88: 757-766, 1997.

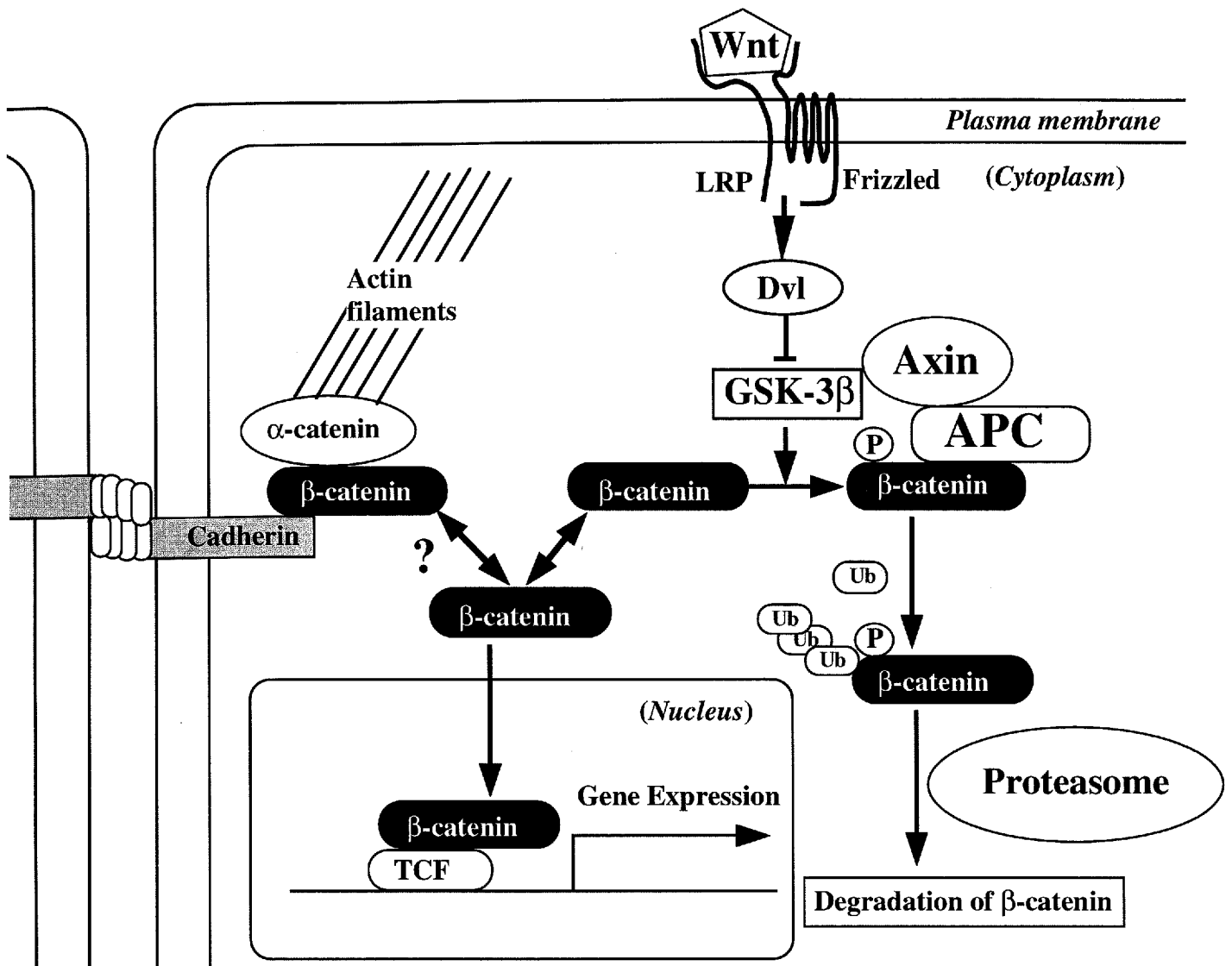


Fig. 1 Wnt Signaling Pathway

In the absence of Wnt, Axin forms a complex with GSK-3β, β-catenin, APC, and PP2A, and regulates GSK-3β-dependent phosphorylation (P) of β-catenin. Phosphorylated β-catenin forms a complex with Fbw1, resulting in the degradation of β-catenin by the ubiquitin (Ub) and proteasome pathways. As a result, cytoplasmic β-catenin levels are low.

When Wnt acts on its cell-surface receptor Frizzled and LRP, the cytoplasmic protein Dvl antagonizes the action of GSK-3β. Furthermore, it has been shown that Dvl inhibits GSK-3β dependent phosphorylation of β-catenin. Once the phosphorylation of β-catenin is reduced, it dissociates from the Axin complex, and β-catenin is no longer degraded, resulting in its accumulation in the cytoplasm. Accumulated β-catenin is translocated to the nucleus where it binds to TCF, transcription factors, and stimulates the expression of genes.

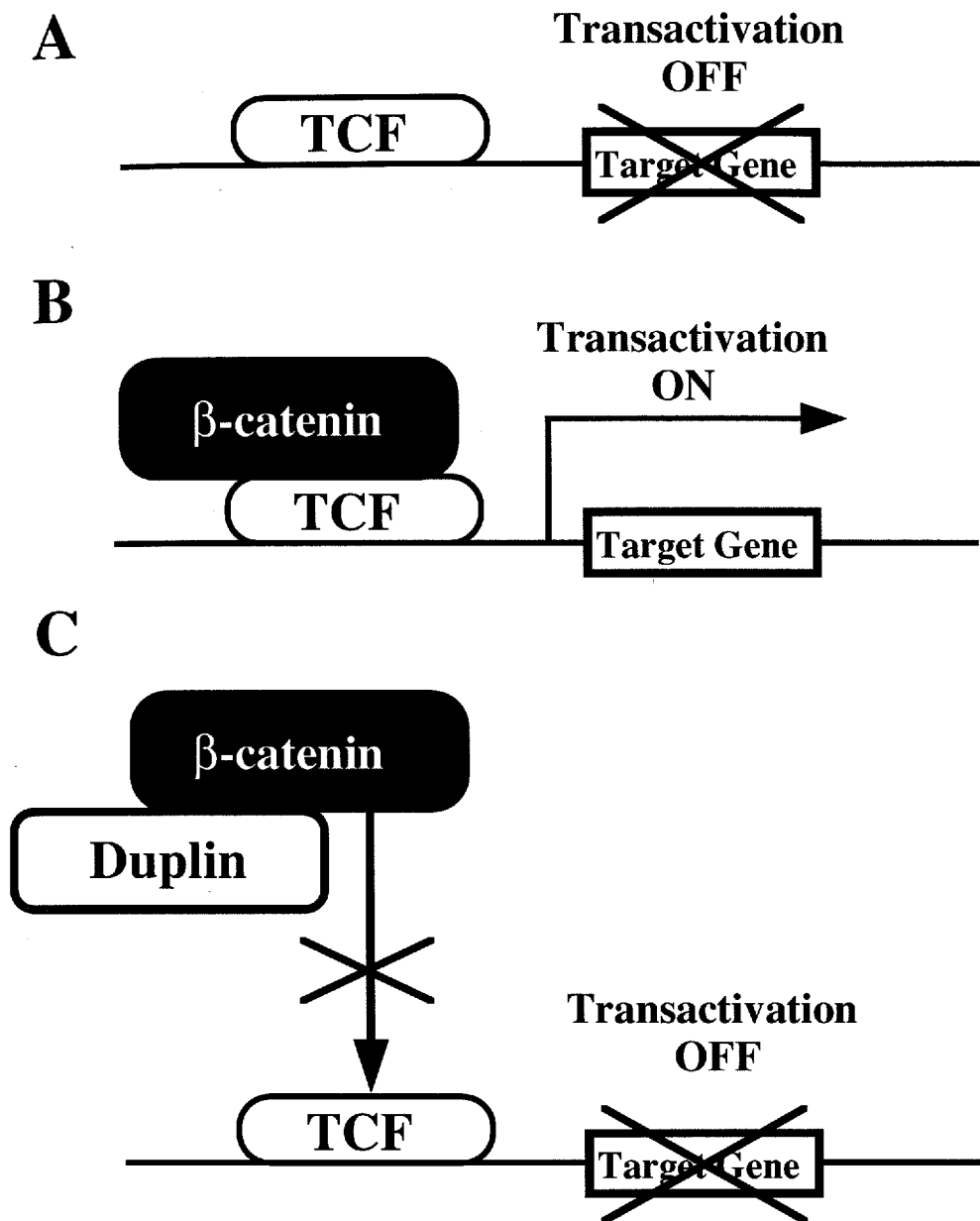


Fig. 2 Function of Duplin

In the absence of Wnt , TCF dose not stimulate the expression of genes (A).

When Wnt acts, accumulated β-catenin is translocated into the nucleus where it binds to TCF, a transcription factor, and stimulates the expression of genes (B).

Duplin forms a complex with β-catenin in the nucleus and represses the β-catenin-dependent TCF activation (C).

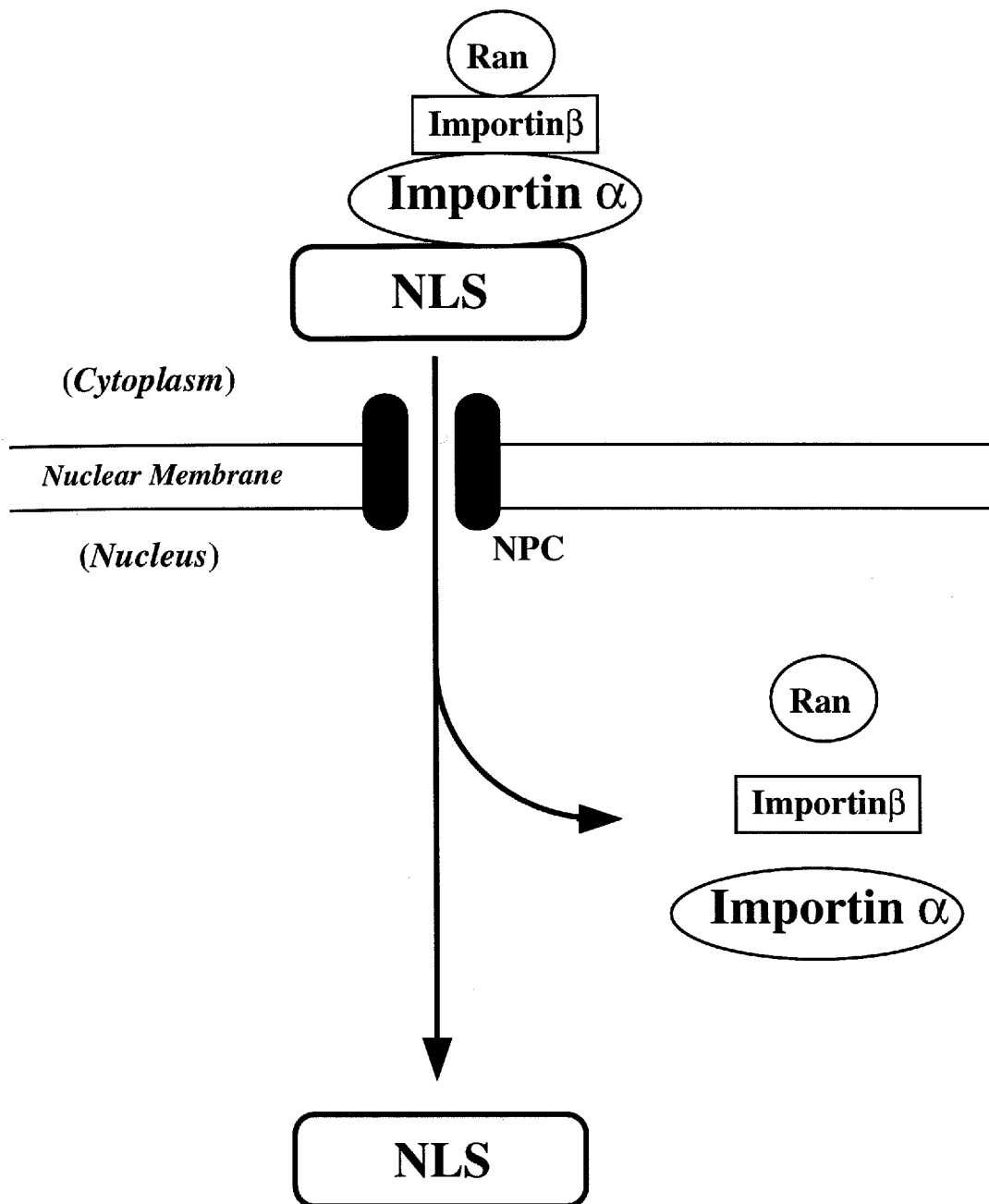


Fig. 3 Function of Import α

Importin α contains the NLS-binding site, and importin β is responsible for the docking of the importin-substrate complex to the cytoplasmic filaments of the nuclear pore complex and its translocation through the pore.

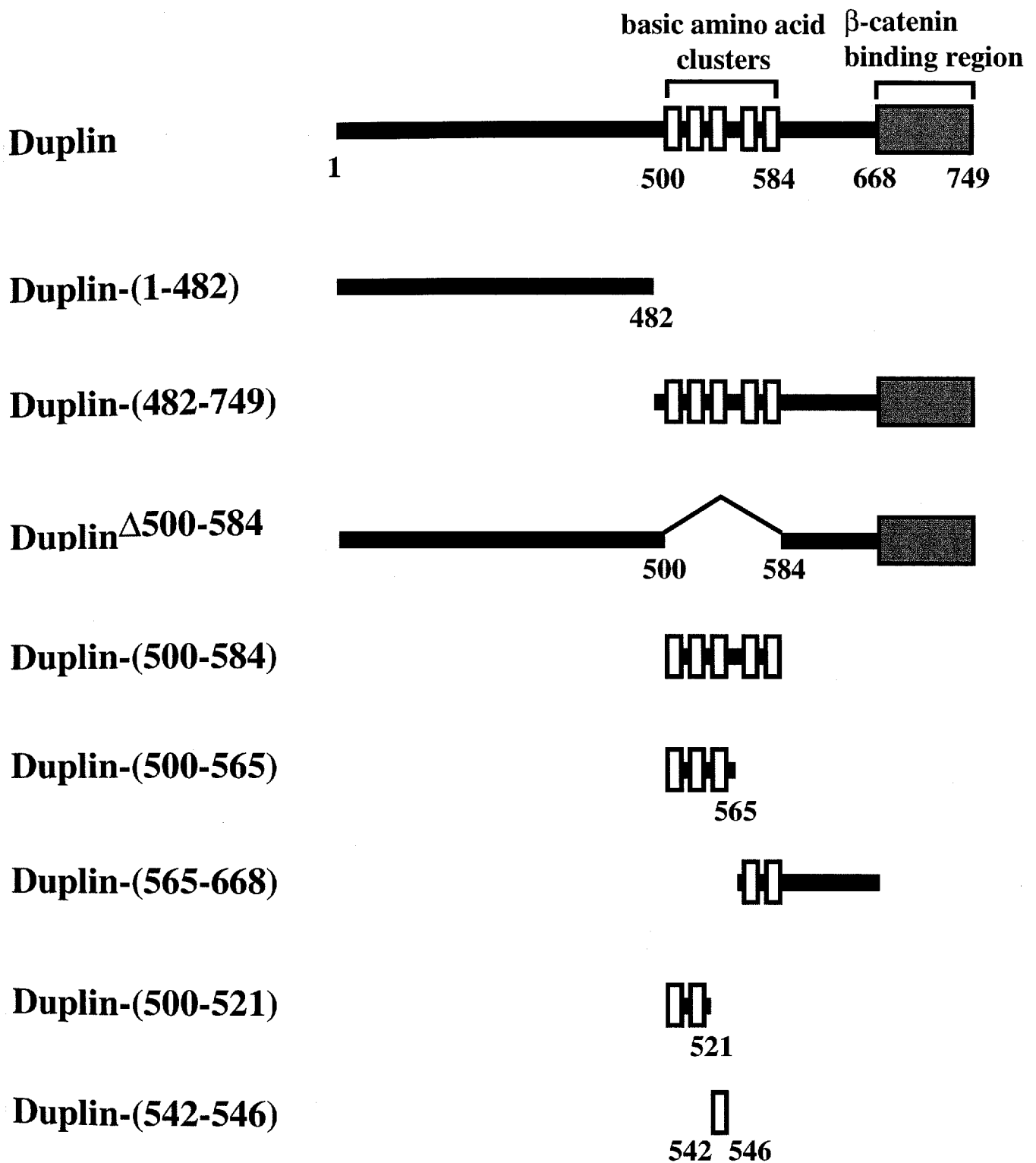


Fig. 4 Structure of Duplin

Schematic representations of Duplin constructs used in this study. The white and gray boxes indicate basic amino acid clusters and β -catenin-binding region, respectively.

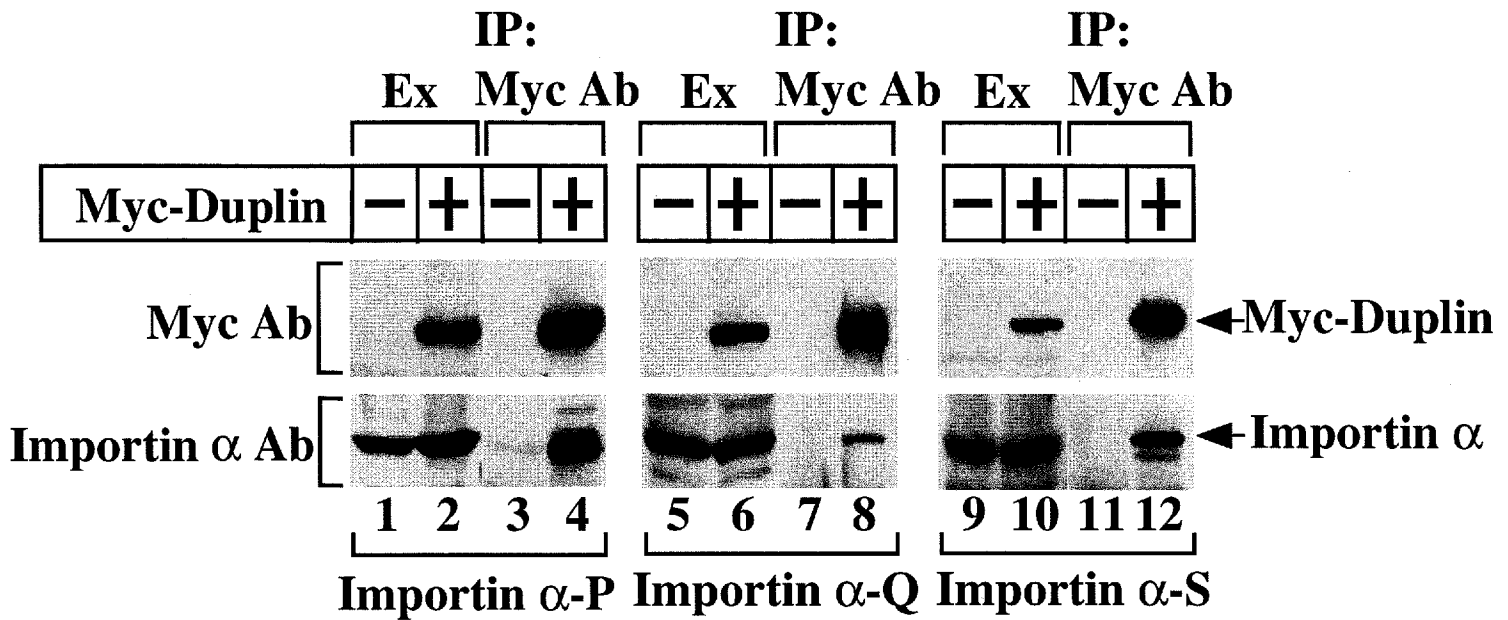


Fig. 5A Interaction of Duplin with Importin α in Intact Cells

The lysates (20 μ g of protein) of COS cells with (lanes 2, 6, and 10) or without (lanes 1, 5, and 9) expression of Myc-Duplin were probed with the anti-Myc (lanes 1, 2, 5, 6, 9, and 10) and anti-importin α -P (lanes 1 and 2), anti-importin α -Q (lanes 5 and 6), or anti-importin α -S (lanes 9 and 10) antibodies. The lysates (200 μ g of protein) described above were immunoprecipitated with the anti-Myc antibody (lanes 3, 4, 7, 8, 11, and 12) and the precipitates were probed with the anti-Myc (lanes 3, 4, 7, 8, 11, and 12) and anti-importin α -P (lanes 3 and 4), anti-importin α -Q (lanes 7 and 8), or anti-importin α -S (lanes 11 and 12) antibodies.

Ex, expression; IP, immunoprecipitation; Ab, antibody.

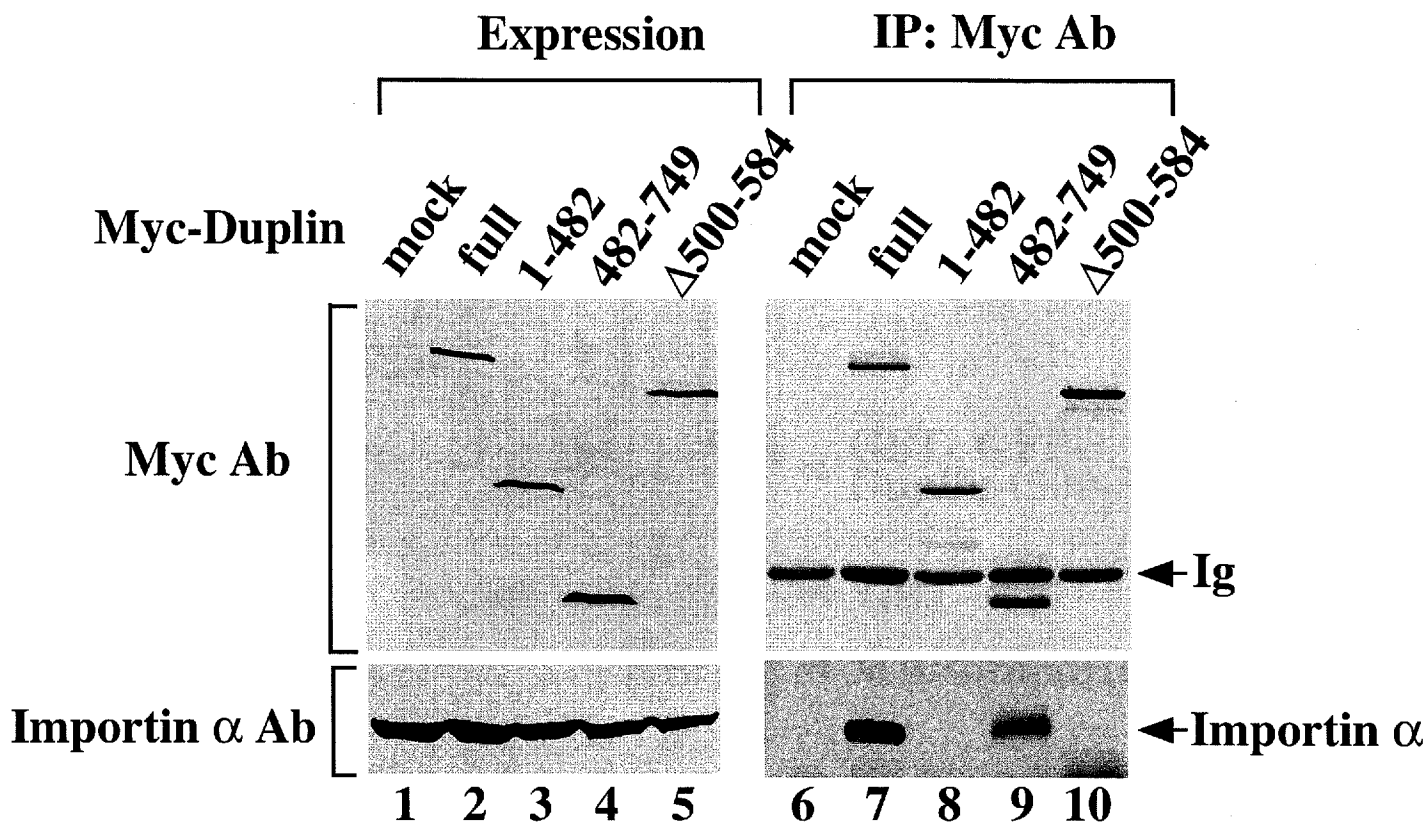


Fig. 5B Interaction of Duplin Mutants with Importin α in Intact Cells

The lysates (20 μ g of protein) of COS cells (lane 1), COS cells expressing Myc-Duplin (full-length)(lane 2), Myc-Duplin-(1-482) (lane 3), Myc-Duplin-(482-749) (lane 4), or Myc-Duplin 500-584(lane 5) were probed with the anti-Myc and anti-importin α -P antibodies. The lysates (200 μ g of protein) prepared in lanes 1 to 5 were immunoprecipitated with the anti-Myc antibody and the precipitates were probed with the anti-Myc and anti-importin α -P antibodies (lanes 6-10).

Ig, immunoglobulin.

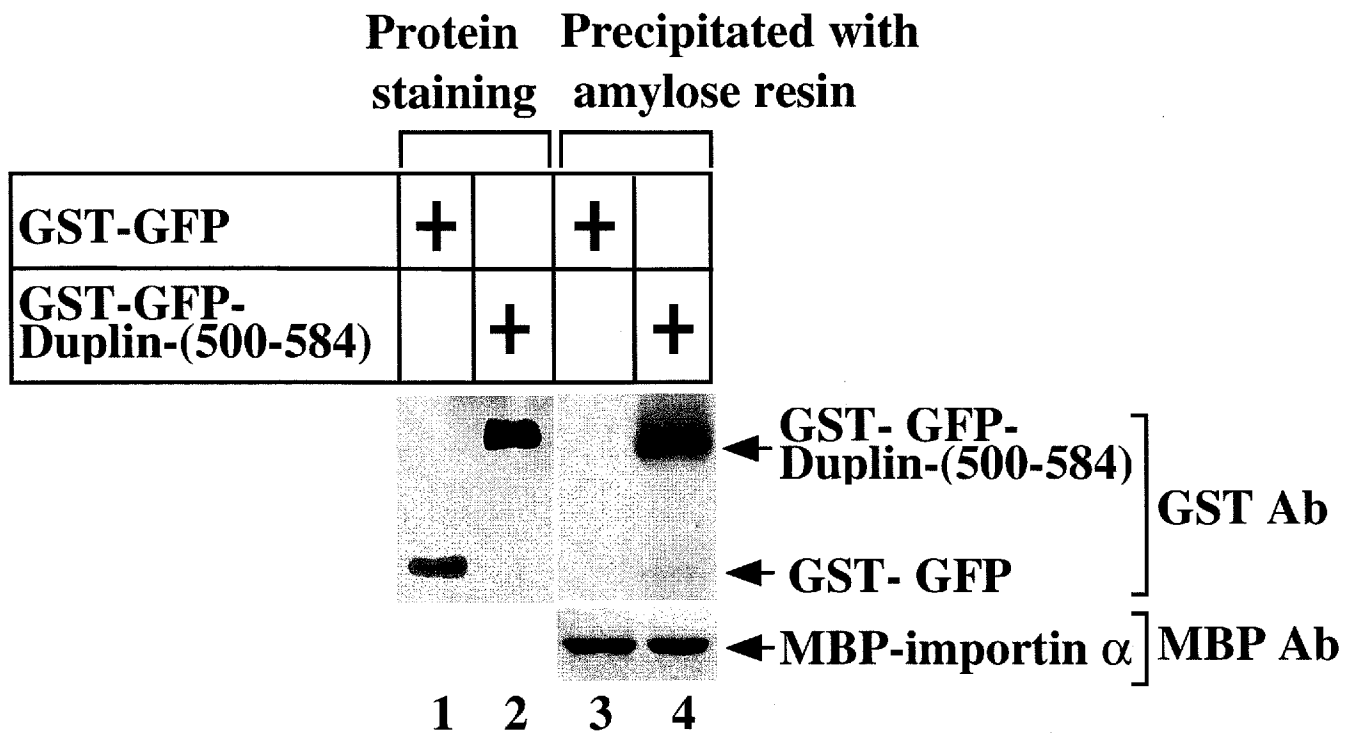


Fig. 5C Direct Interaction of Duplin with Importin α

Purified proteins (0.5 μ g protein) of GST-GFP and GST-GFP-Duplin-(500-584) were subjected to SDS-PAGE followed by Coomassie brilliant blue staining (lanes 1 and 2). GST-GFP and GST-GFP-Duplin-(500-584) (1 μ M each) were incubated with MBP-importin α -P (30 pmol) immobilized on amylose resin. MBP-importin α -P was precipitated by centrifugation and the precipitates were probed with the anti-GST antibody (lanes 3 and 4) (upper panel). 10% of MBP-importin α -P used in this assay is shown by the anti-MBP antibody (lower panel).

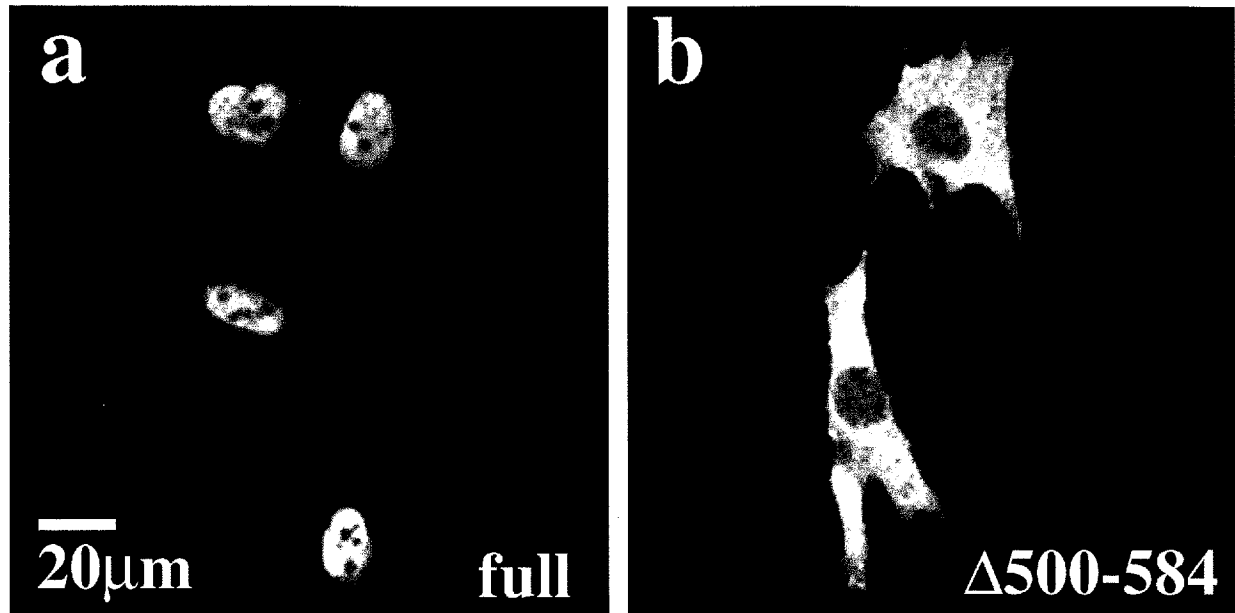


Fig. 6A Nuclear Localization of Duplin

L cells expressing Myc-Duplin (full-length) (a) or Myc-Duplin 500-584 (b) were stained with the anti-Myc antibody and viewed by confocal microscopy.

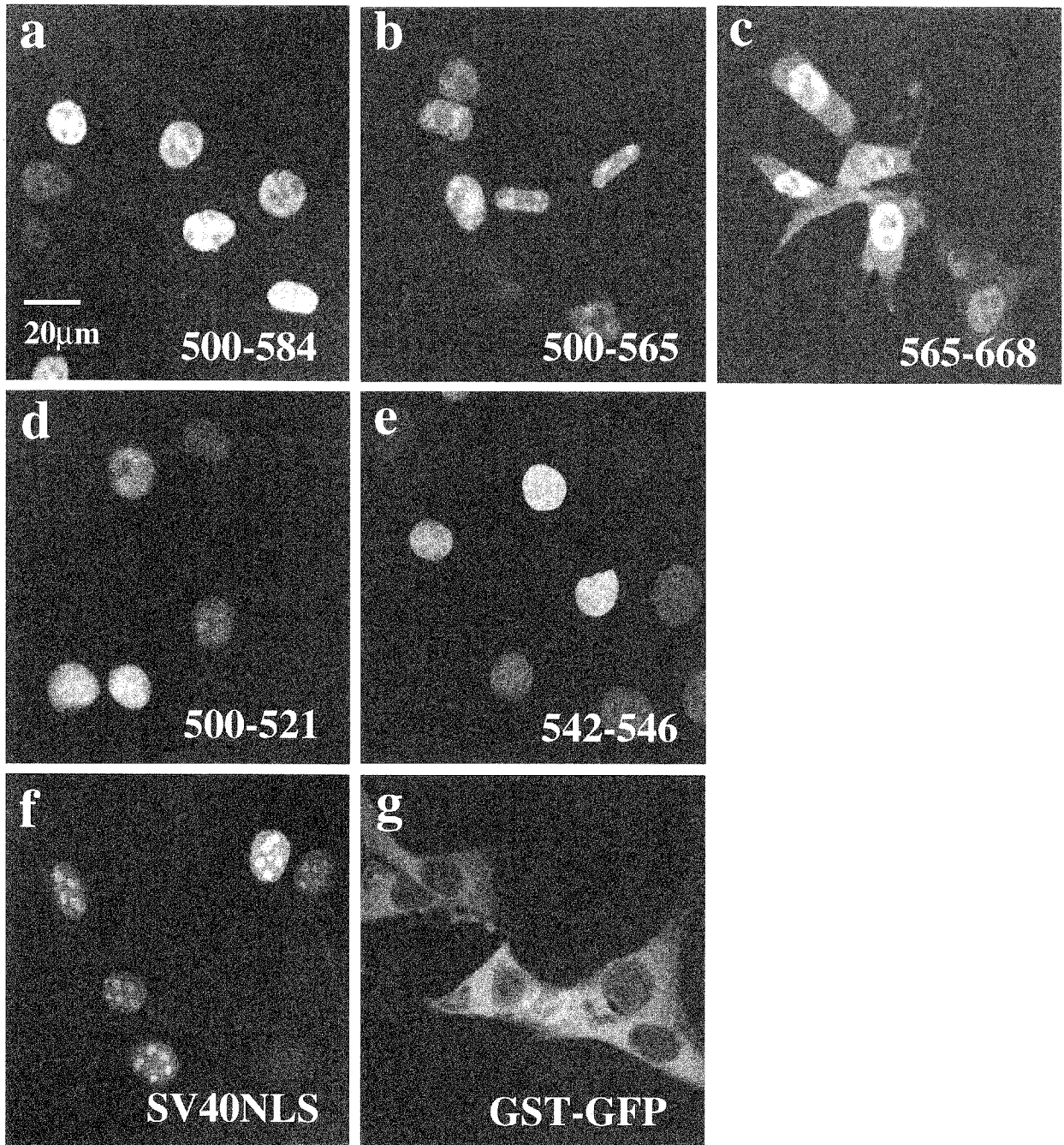


Fig. 6B Active Import of Duplin into the Nuclei

Purified recombinant GST-GFP-Duplin-(500-584) (a), GST-GFP-Duplin-(500-565) (b), GST-GFP-Duplin-(565-668) (c), GST-Duplin-(500-521)-GFP (d), GST-Duplin-(542-546)-GFP (e), GST-SV40NLS-GFP (f), and GST-GFP (g) were injected into the cytoplasm of L cells. After incubation for 30 min at 37°C, the cells were fixed and the localization of GST-GFP-fused proteins was detected by direct fluorescence microscopy.

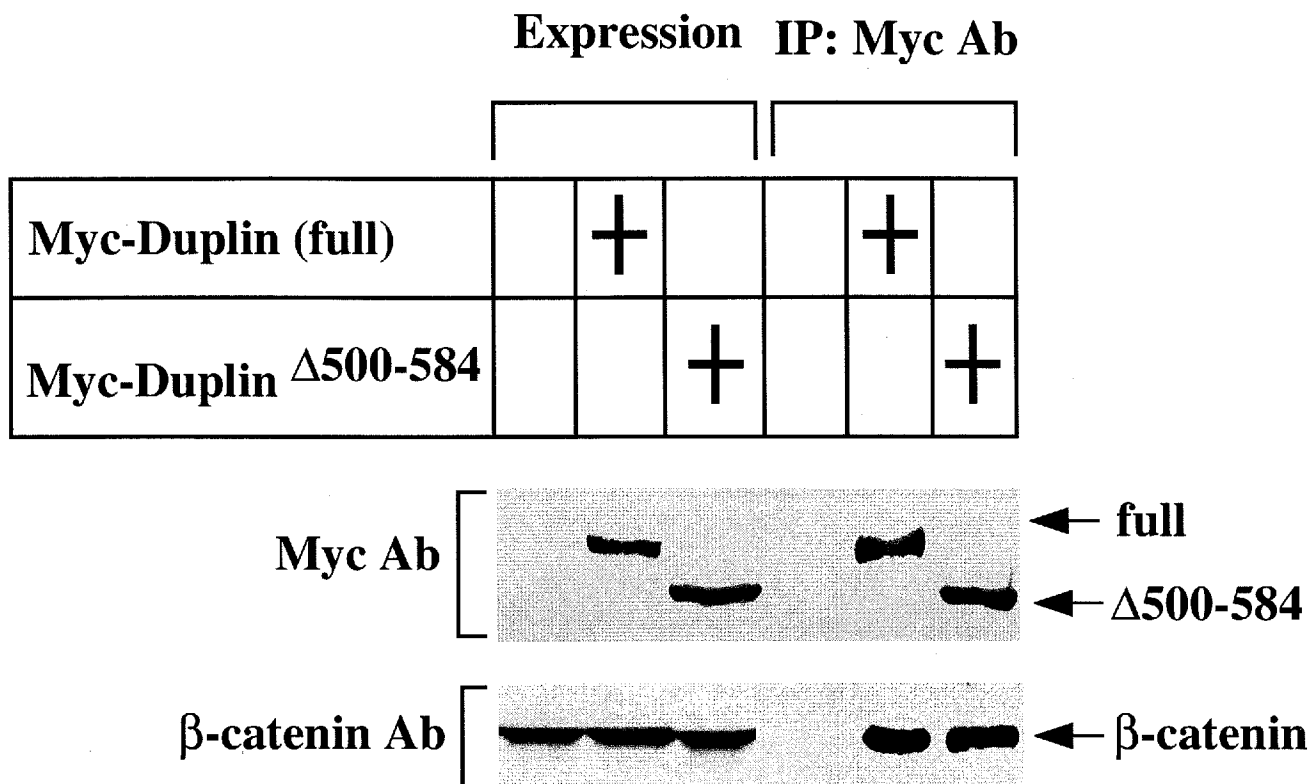


Fig. 7A Complex Formation of Duplin Mutants with β -catenin

The lysates (20 μ g of protein) of COS cells expressing Myc-Duplin (full-length) (lane 2) or Myc-Duplin Δ 500-584 (lane 3) were probed with the anti-Myc and anti- β -catenin antibodies. The lysates prepared in lanes 2 and 3 were immunoprecipitated with the anti-Myc antibody and the precipitates were probed with the anti-Myc and anti- β -catenin antibodies (lanes 5 and 6). COS cells transfected with the empty vector were used as a control (lanes 1 and 4).

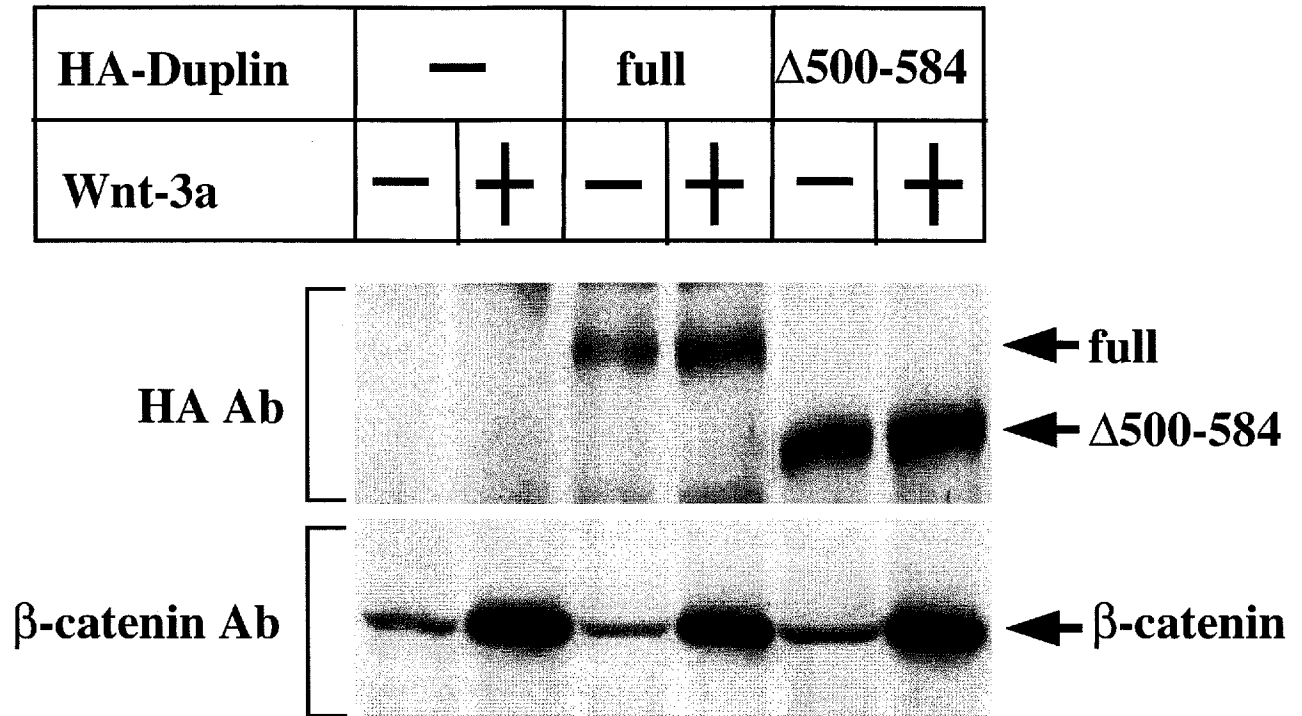


Fig. 7B Effect of Nuclear Localization of Duplin on β -catenin Signaling

Wnt-3a induced accumulation of β -catenin in L cells. L cells constitutively expressing HA-Duplin (full-length) (lanes 3 and 4) or HA-Duplin $\Delta 500-584$ (lanes 5 and 6) were treated with Wnt-3a conditioned medium (lanes 4 and 6) or control medium (lanes 3 and 5). L cells transfected with empty vectors were used as a control (lanes 1 and 2). The lysates were probed with the anti-HA (upper panel) and anti- β -catenin (lower panel) antibodies.

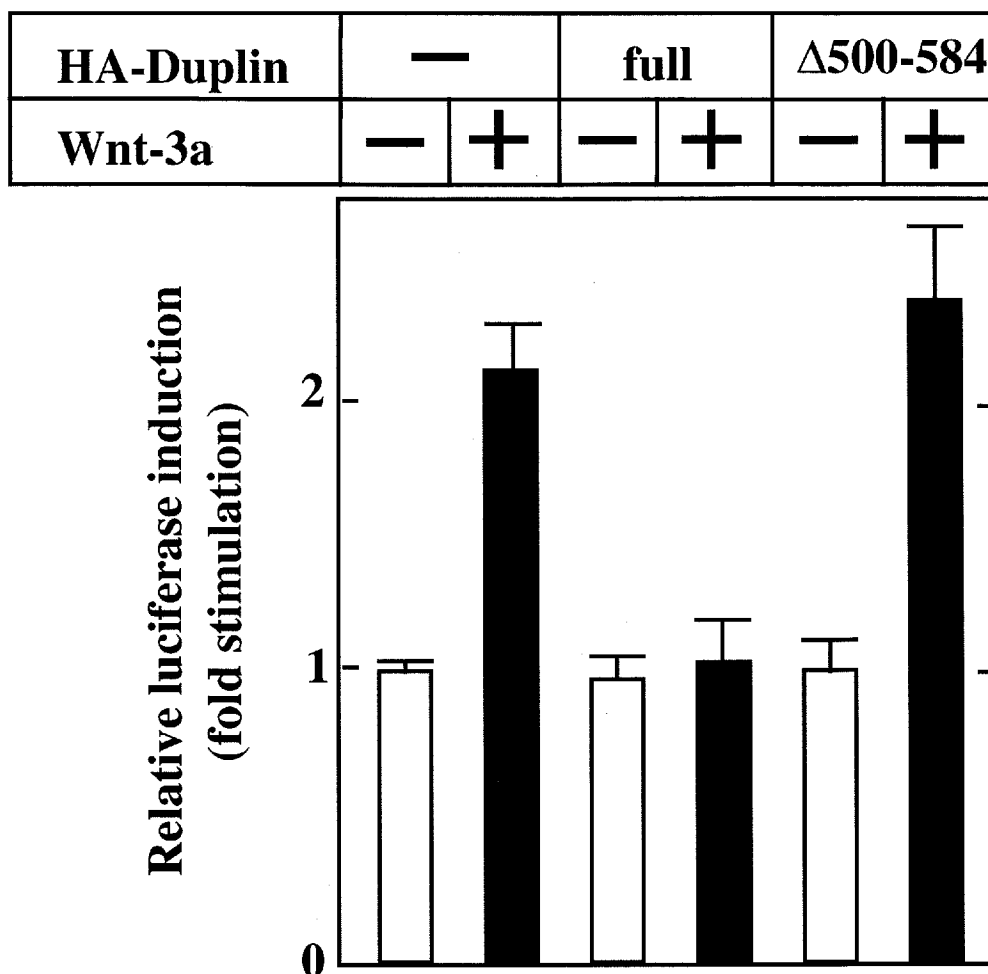


Fig. 7C NLS-Dependent Inhibition of TCF Activation by Duplin

L cells used in Fig. 4B were transfected with pEF-BOS-HA/hTCF-4E and pTOPFLASH. Luciferase activity was assayed and expressed as fold increase compared with the level observed in L cells without Wnt-3a. Black bar, treatment with Wnt-3a conditioned medium; White bar, treatment with control medium.

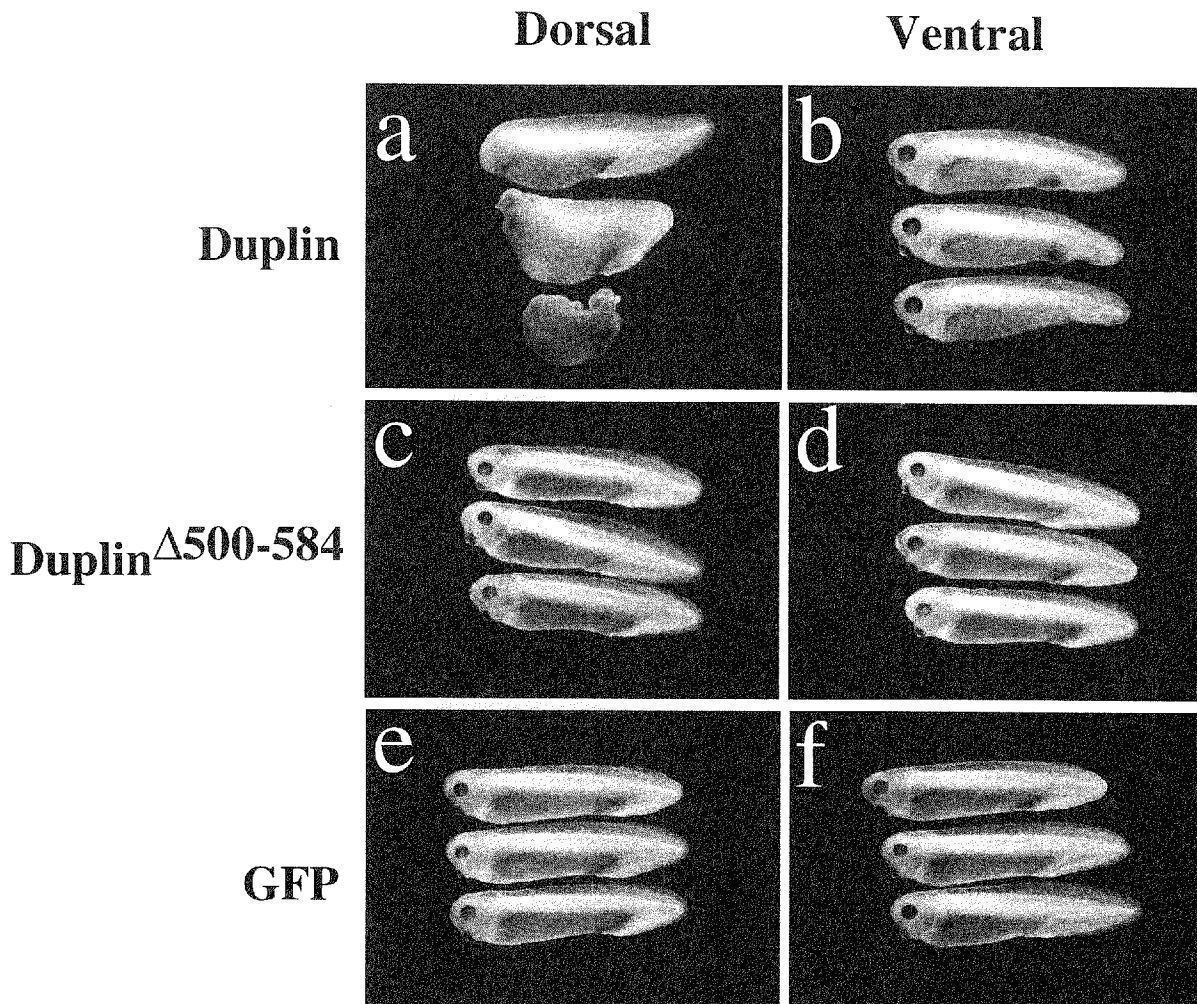


Fig. 7D NLS-dependent ventralization activity of Duplin

Embryos were injected dorsally with mRNAs of Duplin (1 ng) (a) , Duplin Δ 500-584 (1 ng) (c) or GFP (1 ng) (e) and ventrally with Duplin (1 ng) (b) , Duplin Δ 500-584 (1 ng) (d) or GFP (1 ng) (f).