

博士論文(要約)

Wnt非古典経路におけるシグナル伝達分子機構の解析

讃岐 祥一

Wntシグナルは、発生段階において様々な組織の形成に関与するばかりでなく、成体においても骨の恒常性維持など様々な生理機能を司っており、シグナル抑制分子である sclerostin に対する中和抗体が骨粗鬆症の治療薬として用いられるなど、創薬標的としての可能性も注目されている。ヒトやマウスにおいては、リガンドである Wnt が 19 分子種、受容体である Fzd が 10 分子種知られており、さらに複数の共受容体分子およびシグナル阻害因子など、様々なシグナル調節因子の関与も報告されている。加えて、下流で活性化される主なシグナル伝達経路として、古典経路 (Wnt/ $\beta$ -catenin 経路) および非古典経路 (Wnt/PCP 経路および Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ 経路) が存在し、その他に Wnt/cAMP 経路が活性化される例も報告されている。このようにシグナル起点部分の構成が複雑であり、下流経路のバリエーションも含めると、その組み合わせ数が膨大になることが、Wnt シグナル経路の全体像の理解を難しくしている。本研究では、シグナル起点部分で想定される多様な組み合わせにおいて、Wnt 分子種と Fzd 分子種間でどのような選好性があるか、シグナル経路の活性化バランスはどのようなパターンを示すか、などの点に関して系統的な解析を行い、Wnt シグナル経路の全体像の把握を目指した。また、特に不明な点が多く残されている非古典 Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ 経路に関して、シグナル伝達に関与する分子機構の解析を行った。

## 第一章 Wnt シグナル経路活性化パターンの網羅的・定量的評価

私は過去の検討において、マウス Wnt 19 分子種、Fzd 10 分子種、および機能修飾分子 5 種 (Lrp5/6, Ror1/2, 阻害因子 Dkk1) に関し、それぞれアデノウィルス発現ベクターを構築した。遺伝子発現プロモータとしては、過剰発現に汎用される CMV を用いた。また、下流シグナル経路の活性化パターンを定量的に評価するため、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路、Wnt/PCP 経路、Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ 経路、Wnt/cAMP 経路それぞれの下流で活性化する転写因子 TCF/LEF, AP-1, NFAT, CREB に対する応答配列を、それぞれルシフェラーゼ遺伝子上流に配置したレポーター・アデノウィルスを構築した。これらウィルスをマウス骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞に共導入することで、全ての Wnt-Fzd の組み合わせに関し、下流経路の活性化度合いを測定した。しかしながら、その後さらに検討を進めた結果、Wnt-Fzd の組み合わせに依存して、CMV プロモータによる遺伝子発現効率に大幅な変動が生じることが明らかとなり、活性化パターンの測定結果にも大きな影響が生じていると懸念された。そこで、Wnt-Fzd の組み合わせによる影響が少なく、安定して高発現を達成可能な発現プロモータのスクリーニングを行った結果、UbC プロモータが最も発現量が安定することが明らかになった。この結果を踏まえ、UbC プロモータを用いたアデノウィルス発現ベクターを再構築し、MC3T3-E1 細胞における Wnt シグナル経路の活性化パターンの網羅的な評価を再び行った。またこの際、UbC プロモータを用いた場合でも生じる発現量変動の影響に関しては、UbC プロモータをルシフェラーゼ上流に配置した恒常発現型のレポーター・アデノウィルスを構築し、このレポーター活性との比率とすることで補正を行った。網羅的な測定の結果、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の活性化パターンは主として Wnt 分子種への依存性が観察され、Wnt3, 3a で強い、Wnt1, 2 で中程度、Wnt7a, 9b で弱い活性化が認められた。Wnt/PCP 経路の活性化に関しても Wnt 分子種への依存性が高く、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の活性化とは相互に排他的なパターンを示し、Wnt5a, 5b, 7b, 11, 16 で一定程度の活性化が認められ

た。また、これら以外の Wnt 分子種に関しては、AP-1 レポーター活性はむしろベースラインより抑制される傾向が認められた。両経路の活性化には共受容体が関与すると考えられており、共受容体と各 Wnt 分子種の相互作用の有無が、シグナル経路の活性化を決定する主要因になっていると考えることで、一連の結果を説明可能と考えられた。一方 Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路に関しては、広範な Wnt-Fzd の組み合わせで活性化が認められたが、比較的 Fzd 分子種に依存的な傾向が観察され、特に Fzd8 において強い活性化が認められた。Wnt/cAMP 経路の活性化に関しては Fzd 分子種への依存性が高く、Fzd1, 8 などで一定レベルの活性化が認められたが、その他の広範な組み合わせにおいて、cAMP レポーター活性はベースラインよりもむしろ抑制される傾向が認められた。両経路の活性化には三量体 G タンパク質の共役が関与すると考えられており、Fzd 分子種への依存性が強い傾向を説明可能と考えられた。また、Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化には G<sub>i/o</sub> 型の三量体 G タンパク質の関与が指摘されており、Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化が認められる多くの組み合わせにおいて、逆に cAMP 応答の抑制が認められる点を説明可能であると考えられた。全ての組み合わせにおける下流シグナル経路の活性化パターンに対してクラスター解析を行ったところ、大きく 5 種類に分類されることが明らかとなった。特に Wnt に関しては、Wnt/β-catenin 経路を活性化する古典 Wnt と Wnt/PCP 経路を活性化する非古典 Wnt に大別されたが、Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路に関しては、両者に広くまたがって活性化する組み合わせが認められ、古典経路と非古典経路という単純な分類では Wnt シグナル経路の下流活性化パターンは説明できないと考えられた。

## 第二章 Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化に関与する分子機構の探索

前項の解析では、古典 Wnt および非古典 Wnt に広くまたがる組み合わせで Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化が認められたが、この特徴が Wnt シグナル経路に関する一般的な特徴かを検証するため、マウス筋芽細胞様 C2C12 細胞を用いて Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化の評価を行った。MC3T3-E1 細胞において Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化が認められた複数の Wnt-Fzd の組み合わせを C2C12 細胞に導入して検証を行ったが、いずれの組み合わせにおいても活性化は認められなかった。同時に測定した Wnt/β-catenin 経路の活性化に関しては、C2C12 細胞においても強い活性化が認められる点や、他の GPCR リガンドによる NFAT レポーターの活性化は検出される点なども考慮すれば、Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化は細胞種に大きく依存すると考えられた。そこで、Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化に関与する分子機構に着目して検討を進めることとした。現在のところ、Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化メカニズムとしては以下の2つの機構が提唱されている。一つは、Fzd が G タンパク質共役型受容体として Wnt を認識し、G<sub>i/o</sub> 型三量体 G タンパク質が共役することで、小胞体から Ca<sup>2+</sup>が動員される機構である。もう一つは、多発性嚢胞腎の原因遺伝子として知られる Pkd1 が、Fzd 非依存的に Wnt を認識する受容体として機能し、Pkd1 と共役してカチオンチャネルを形成する Trpp2 を介して、細胞外から Ca<sup>2+</sup>が動員される機構である。これらの機構が細胞ごとに使い分けられているのか、共存して機能しているのか、あるいは未知の別の機構が存在するのか、などは明らかになっていない。そこで、Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路を強く活性化する Fzd8 をモデル分子として採用し、MC3T3-E1 細胞において G<sub>i/o</sub> の関与を検証した。Wnt8a/Fzd8/Lrp5 の導入によって誘導される NFAT レポーター活性の上

昇は、百日咳毒素によって大きく抑制され、MC3T3-E1 細胞においては Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化に G<sub>i/o</sub> の関与が示唆された。そこで、MC3T3-E1 細胞には発現しているが C2C12 細胞には発現していない何らかの分子が、G<sub>i/o</sub> の共役から Ca<sup>2+</sup>動員が生じるまでのプロセスのどこかの段階で、必須機構として介在している可能性を想定し、分子の探索を試みた。MC3T3-E1 および C2C12 細胞に N 末端に His タグを付加した Fzd8 および Wnt8a/Lrp5 を導入し、細胞膜透過性のクロスリンカーでタンパク質間の架橋を行った後、Fzd8 分子を含むタンパク質複合体を回収した。得られたタンパク質複合体をプロテアーゼ消化した後、nanoLC-MS を用いたプロテオミクス解析を行って、含まれるタンパク質を網羅的に同定した。同定されたタンパク質群の機能・発現関連を GeneMANIA により解析し、Fzd8 周辺のサブネットワークを抽出した上で、両細胞間で差分解析することで、MC3T3-E1 細胞選択的な分子を抽出したところ、13 種類のタンパク質が同定された。これらの中で、Wnt シグナル経路との関連性を示唆する情報が存在するものは、Trpp2 および Ptk7 の 2 種類であった。そこで、MC3T3-E1 細胞に、これらの分子に対する shRNA を導入することで内因性の遺伝子発現を抑制した条件下で、Wnt8a/Fzd8/Lrp5 の導入によって誘導される NFAT レポーターの活性を評価した。その結果、Trpp2 の遺伝子発現抑制に伴ってレポーター活性の減弱が認められた。Trpp2 は Pkd1 以外にも、Trpc1 あるいは Trpv4 と複合体を形成して細胞膜に局在し、Ca<sup>2+</sup>透過性のカチオンチャンネルを形成することが知られており、Fzd8 が細胞膜上でこのチャンネルと機能的に相互作用して Ca<sup>2+</sup>を動員している可能性が考えられた。MC3T3-E1 細胞において、EGTA をメディアウム中に添加して Ca<sup>2+</sup>をトラップした場合、Wnt8a/Fzd8/Lrp5 による NFAT レポーターの活性誘導は強く抑制され、Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路における Ca<sup>2+</sup>動員は細胞外からであることが明らかとなった。さらに、Trpc ファミリーの阻害剤で処理した場合にも、NFAT レポーターの活性誘導の強い抑制が観察された。一連の結果から、MC3T3-E1 細胞においては、Fzd8 に共役した G<sub>i/o</sub> 型三量体 G タンパク質によって、細胞膜上の Trpp2-Trpc 複合体が活性化され、細胞外から Ca<sup>2+</sup>が動員される、という新たな機構によって Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化が生じている可能性が示唆された。

本研究により、Wnt シグナル経路に関する包括的なシグナル活性化プロファイルを明らかにし、特に Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化パターンの特徴、および強い細胞種依存性が新たに見出された。さらに、Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化分子機構として、細胞種依存性を説明できる新たな仮説の提唱に至った。