

## 6. Protrudin と Rab11 の結合による膜リサイクリングの制御

Protrudin には RBD11 (Rab11 結合ドメイン) が存在しており、この部分は GDI (GDP dissociation inhibitor) と類似していた。配列情報から予測された通り、細胞内結合実験により Protrudin は GDP 結合型の Rab11 と結合することがわかった。多くの低分子量 G タンパク質のエフェクター分子は GTP 結合型と特異的に相互作用することが知られているが、Protrudin は GTP 結合型の Rab11 とは結合せず GDP 結合型の Rab11 とのみ特異的に結合することから、この結果は非常に稀なケースで興味深い。またこの結合は、NGF の下流のシグナルにより Protrudin がリン酸化されると促進されること、およびこのリン酸化には MAPK の ERK が関与していることが明らかになった。

さらに Protrudin の膜リサイクリングへの作用について検討するために、リサイクリングエンドソームの動態を神経軸索特異的に輸送される積み荷タンパク質 NgCAM を用いて観察した<sup>7)</sup>。NgCAM は神経軸索へ特異的に輸送される小胞膜上のタンパク質である。新規に合成された NgCAM は、まず細胞膜に輸送された後、いったんエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれてリサイクリングエンドソームに運ばれ、再び限定された方向、即ち軸索方向の細胞膜へとエキソサイトーシスにより輸送される、という動態が報告されている。これは神経軸索に特異的な小胞輸送システムであり、トランスサイトーシスの一種である。Protrudin のノックダウン実験において、NgCAM の動態を指標にして小胞輸送の流れを観察した。NgCAM は、コントロール細胞では神経突起の細胞膜に特異的に分布したのに対して、ノックダウン細胞では細胞膜全体に分散した。つまり、Protrudin は神経突起の形成される限定方向への小胞輸送を促進する作用を持つことが確認された。

以上の結果より、Protrudin は小胞膜のリサイクルシステムの制御を通じて神経突起形成に関与することが明らかになった。

上述のように Protrudin の作用機序を解析し、以下のようなメカニズムで神経突起が形成されることを突き止めた(図 3)。①神経成長因子 NGF などの神経分化の誘導シグナルが細胞表面の受容体に結合する。②そのシグナルにตอบสนองして Protrudin がリン酸化される。③リン酸化された Protrudin が膜のリサイクリングを制御する Rab11 と結合する。④それに伴い、突起形成部位への細胞膜成分のリサイクル輸送が促進される。⑤その結果、神経突起形成が誘

導される。

## 7. Protrudin の神経変性疾患への関与

近年、小胞膜輸送系の異常が示唆されている遺伝性痙性対麻痺の患者家系において、Protrudin 遺伝子の変異が報告された<sup>8)</sup>。遺伝性痙性対麻痺は皮質脊髄路の神経変性により起こり、徐々に歩行困難になる病気である。Protrudin の機能異常によって細胞膜の輸送に障害が生じることが、遺伝性痙性対麻痺の原因であると考えられた。この発見はわれわれの研究成果を裏付けるものであり、今後 Protrudin による限定的細胞膜輸送システムの制御に関する研究が、この疾患の発症機構の解明や治療への応用につながると期待される。

- 1) Shirane, M. & Nakayama, K.-I. (2006) *Science*, 314, 818-882.
- 2) Tang, B.L. (2001) *J. Neurochem.*, 79, 923-930.
- 3) Behnia, R. & Munro, S. (2005) *Nature*, 438, 597-604.
- 4) Zerial, M. & McBride, H. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2, 107-117.
- 5) Maxfield, F.R. & McGraw, T.E. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 5, 121-132.
- 6) Shirane, M. & Nakayama, K.I. (2003) *Nat. Cell Biol.*, 5, 28-37.
- 7) Wisco, D., Anderson, E.D., Chang, M.C., Norden, C., Boiko, T., Folsch, H., & Winckler, B. (2003) *J. Cell Biol.*, 162, 1317-1328.
- 8) Mannan, A.U. Krawen, P., Sauter, S.M., Boehm, J., Chronowska, A., Paulus, W., Neesen, J., & Engel, W. (2006) *Am. J. Hum. Genet.*, 79, 351-357.

白根 道子

(九州大学生体防御医学研究所分子発現制御学分野)

Protrudin regulates membrane recycling system  
Michiko Shirane (Department of Molecular and Cellular Biology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8582, Japan)

## nucleoredoxin による Wnt シグナルの制御

### 1. はじめに

Wnt/ $\beta$ -カテニン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

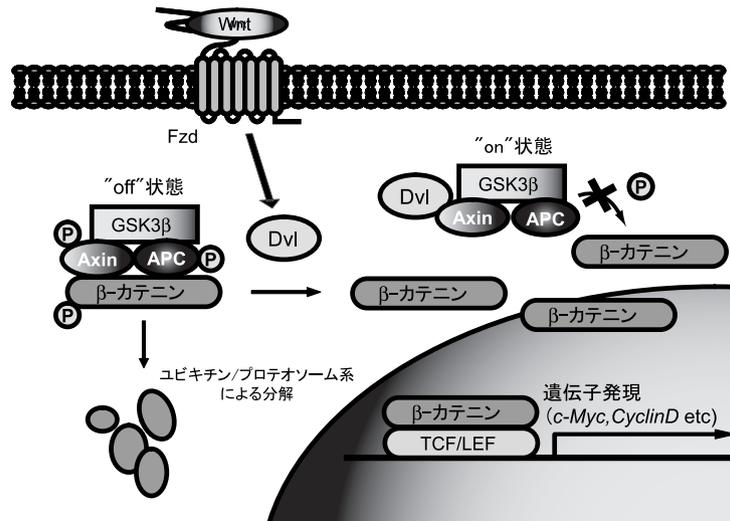


図1 Wnt/β-カテニン経路

リガンド Wnt が存在しないとき、シグナルは“off”に制御されている。この状態では APC, Axin, GSK3β からなる三量体複合体が活性化状態にあり、GSK3β によって β-カテニンが効率的にリン酸化を受けている。リン酸化 β-カテニンはユビキチン/プロテオソーム系によって速やかに分解され、そのため細胞質内の β-カテニン濃度は非常に低く抑えられている。

リガンド Wnt がレセプター Fzd (Frizzled) に結合すると、アダプタータンパク質 Dishevelled (Dvl) を介して三量体複合体の機能が阻害され、β-カテニンのリン酸化が入りにくくなる。非リン酸化型 β-カテニンは分解されにくいため、細胞質内に蓄積し、その一部は核内に移行し転写因子 TCF/LEF と結合することによって種々の遺伝子の発現レベルを制御している。

る。これまでの解析により、Wnt/β-カテニン経路の大きな流れが判明している (図1)<sup>1-3)</sup>。シグナルが off のとき、APC, Axin, そしてセリン/スレオニンキナーゼ GSK3β からなる三量体複合体が活性化状態にあり、β-カテニンを効率よくリン酸化する。リン酸化 β-カテニンはユビキチン/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-カテニンの濃度が低く抑えられている。リガンドである Wnt がその受容体である Frizzled に結合すると、アダプタータンパク質 Dishevelled (ディシェベルド, Dvl) を介して上記 APC/Axin/GSK3β 三量体複合体の働きが抑えられ、それによって β-カテニンがリン酸化を受けにくくなる。非リン酸化型 β-カテニンは分解を免れ、細胞質内に蓄積する。その一部は核内に移行し、転写因子 TCF/LEF と結合することによって標的遺伝子の転写を活性化させることが知られている。

## 2. 新規 Dvl 結合因子 nucleoredoxin (NRX) の同定

上のように大きな流れが明らかとなっている Wnt/β-

カテニン経路であるが、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-カテニン経路のシグナル伝達に非常に重要であり、また Wnt/β-カテニン経路と Wnt/JNK 経路 (Planner cell polarity, PCP 経路とも言う) との分岐点にあたることが知られているにもかかわらず、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/GSK3β 三量体複合体) に伝えているのか、未解明のままである。そこで我々は Dvl による Wnt シグナル伝達的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、われわれは FLAG タグをつけた Dvl1 (ヒトには Dvl1-3 の 3 種の Dvl が存在している) の恒常的安定発現株を樹立し、その細胞溶解液を抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降することによって Dvl の複合体を精製した。質量分析により、Dvl の主要な結合タンパク質として nucleoredoxin (ヌクレオレドキシシン, NRX) が同定された<sup>4)</sup>。NRX はチオール (主にジスルフィド結合) 還元酵素チオレドキシシン (thio-

redoxin, TRX) に代表される TRX ファミリーに属しており<sup>5)</sup>, 実際 NRX もジスルフィド結合還元活性を保持している<sup>4,6)</sup>.

### 3. NRX による Wnt/ $\beta$ -カテニン経路の抑制

培養細胞を用いた強制発現系により, NRX は Dvl の強制発現, ないしは Wnt リガンド刺激による Wnt/ $\beta$ -カテニン経路の活性化を抑制することが判明した. また, RNA 干渉 (RNAi) による NRX の発現抑制によって Wnt/ $\beta$ -カテニン経路の活性化が観察され, 内在性の NRX も Wnt/ $\beta$ -カテニン経路の阻害因子として機能していることが確認された. さらに, 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. 我々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/ $\beta$ -カテニン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 に類似した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)<sup>7)</sup> 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, NRX が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.

### 4. Dvl と NRX のレドックス依存的な結合

TRX1 はセリン/スレオニンキナーゼである ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) とレドックス依存的に結合していることが知られている (図 2)<sup>8)</sup>. すなわち, 定常状態下では TRX1 と ASK1 は強固に結合しているのに

対して, 酸化ストレスを与えられた状態では TRX1 が分子内ジスルフィド結合を形成し, それによって ASK1 と解離し, ASK1 の自己リン酸化 (=活性化) を促す. その結果, 下流のストレスキナーゼカスケード (p38MAPK, JNK) を活性化させ, 最終的にアポトーシスを誘導するのである. 我々は NRX が TRX ファミリータンパク質の一員であることから, NRX も TRX1 と同様に Dvl とレドックス依存的に結合しているのではないかと考えた. 実際 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.

### 5. NRX による Wnt/ $\beta$ -カテニン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/ $\beta$ -カテニン経路の抑制因子であることから, 我々は Wnt/ $\beta$ -カテニン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,  $\beta$ -カテニンの蓄積, 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/ $\beta$ -カテニン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, レドックス依存的な Wnt/ $\beta$ -カテニン経路の活性化が NRX を介して制御されていることが強く示唆された.

以上の結果から, 図 3 のようなモデルが想起される. 定常状態では NRX は還元状態にあり, Dvl と強く結合することで Wnt/ $\beta$ -カテニン経路の活性化を阻害している. 酸

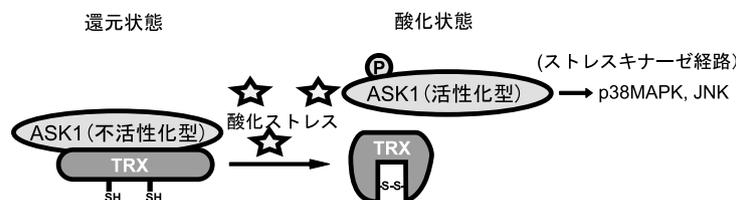


図 2 TRX/ASK1 によるストレスキナーゼ経路の制御

定常 (還元) 状態のとき, TRX は ASK1 と結合しその活性化を抑えている. 酸化ストレスによって TRX に分子内ジスルフィド結合が形成されると TRX のコンフォメーションが変化し, ASK1 から解離する. その結果, ASK1 は自己リン酸化によって活性化し, 下流のストレスキナーゼ経路を活性化することによってアポトーシスを誘導する.

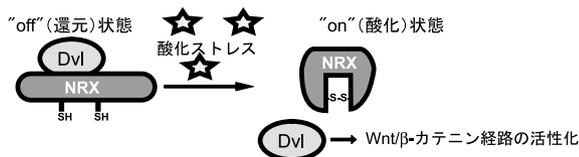


図3 NRXを介したWnt/ $\beta$ -カテンン経路の制御

定常状態下ではNRXは還元状態にあり、Dvlと強固に結合している。酸化ストレスによってNRXが酸化されると分子内ジスルフィド結合を形成し、それに伴ってコンフォメーションを変化させてDvlから解離する。その結果、Dvlは下流のシグナルを活性化させる。

化ストレスが発生するとNRXに分子内結合が形成され、そのコンフォメーションが変化し、それに伴ってDvlから解離する。そしてフリーとなったDvlが下流へとシグナルを伝え、 $\beta$ -カテンンの蓄積を促すのである。

## 6. 終わりに

活性酸素種 (reactive oxygen species, 以下ROS) は細胞の酸素呼吸に応じて産生される副産物として広く知られてきた。生命はROSによって生じる障害から自らを守るため、種々のストレス応答経路を進展させてきた。その一方で、細胞は自らの手で積極的にROSを産生し、それをシグナル伝達に利用していることも知られつつある<sup>9,10)</sup>。しかしながら、生体内でのROSによるシグナル制御機構は未解明の領域が多く残されている。今回我々は発生、分化、そしてがん化と深くかかわっているWntシグナルにおけるレドックス依存的シグナル制御機構の一端を明らかにした。今後はそのさらなる詳細な分子メカニズムの解明とともに、実際の発生や分化にレドックスシグナルがどのような生理的な役割を果たしていくのか、その展開に期待したい。

- 1) Logan, C.Y. & Nusse, R. (2004) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20, 781–810.
- 2) Clevers, H. (2006) *Cell*, 127, 469–480.
- 3) Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V., & Kaykas, A. (2004) *Nat. Rev. Genet.*, 5, 691–701.
- 4) Funato, Y., Michiue, T., Asashima, M., & Miki, H. (2006) *Nat. Cell Biol.*, 8, 501–508.
- 5) Lillig, C.H. & Holmgren, A. (2007) *Antioxid. Redox Signal.*, 9, 25–47.
- 6) Kurooka, H., Kato, K., Minoguchi, S., Takahashi, Y., Ikeda, J., Habu, S., Osawa, N., Buchberg, A.M., Moriwaki, K., Shisa, H., & Honjo, T. (1997) *Genomics*, 39, 331–339.
- 7) Summerton, J. & Weller, D. (1997) *Antisense Nuc. Acid Drug Dev.*, 7, 187–195.
- 8) Fujino, G., Noguchi, T., Takeda, K., & Ichijo, H. (2006)

*Semin. Cancer Biol.*, 16, 427–435.

- 9) Stone, J.R. & Yang, S. (2006) *Antioxid. Redox Signal.*, 8, 243–270.
- 10) Finkel, T. (2003) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15, 247–254.

船戸 洋佑<sup>1,2,3)</sup>, 三木 裕明<sup>1)</sup>

(<sup>1</sup>大阪大学蛋白質研究所細胞内シグナル伝達研究室,

<sup>2</sup>神戸大学大学院医学系研究科,

<sup>3</sup>東京大学医科学研究所腫瘍分子医学分野)

Regulation of Wnt signal pathway via nucleoredoxin

Yosuke Funato<sup>1,2,3)</sup> and Hiroaki Miki<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Laboratory of Intracellular Signaling, Institute for Protein Research, Osaka University (3-2 Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan), <sup>2</sup>Kobe University Graduate School of Medicine, <sup>3</sup>Division of Biochemistry, Institute of Medical Science, University of Tokyo)

## 神経極性形成と shootin1 のフィードバックループ

### 1. はじめに

組織や細胞は、発生・分化に従って、単純な形態を次々に複雑で豊かなものへと変化させて固有の形態を形づくる。生体の対称性の破壊と非対称性 (極性) の獲得はこのような形態形成の基本ステップである<sup>1)</sup>。細胞の極性形成は、通常、化学物質の濃度勾配や細胞接着といった非対称な外部環境因子によってその方向が調節を受けている。しかし、神経細胞や、卵細胞、出芽酵母、白血球、上皮細胞など多くの細胞は、非対称な環境因子がなくても細胞自立的に極性を形成することができることがわかってきた<sup>2-6)</sup>。すなわちこれらの細胞は、条件さえ整えば対称なものから非対称なものへと勝手に変化する。このことから、これらの細胞の極性形成過程は、極性の自己組織化 (self-organization) のステップと非対称な環境因子による方向性調節のステップから構成されると考えられている<sup>1,5,7,8)</sup>。

細胞極性の自己組織化の意義として、細胞が環境因子の方向性に依存することなく極性を獲得できるシステムを獲得することにより、生理的な環境での強固 (robust) な極性形成および維持を行うことが可能となると考えられる。また、細胞が対称なものから非対称な形態をどのように組織化するかという問題は、生物学的のみならず数理科学的にも大いに興味深い謎である。本稿では、著者らが最近同