

# Wnt シグナル伝達経路の活性制御と発がんとの関連

山本英樹

動物の発生過程において、多種多様の細胞間シグナル分子が重要な機能を果たしている。分子量約4万の細胞外分泌糖タンパク質であるWntは種を超えて保存されており、初期発生における体軸の決定や原腸陥入、器官形成を制御する。Wntが受容体に結合するとβ-カテニン経路、平面内細胞極性(PCP)経路、Ca<sup>2+</sup>経路の3種類の細胞内シグナル伝達経路が活性化される。β-カテニン経路はβ-カテニンの細胞内レベルを調節することにより遺伝子発現を介して細胞増殖や分化を制御し、PCP経路とCa<sup>2+</sup>経路は細胞運動や極性決定に関与する。これまでに、種々のヒトがんでβ-カテニン経路の構成因子の遺伝子異常が見出されており、本経路の活性制御機構の研究はこれらが関連するがんの治療のためにも基礎生物学的、ならびに臨床医学的に注目を集めている。

## はじめに

Wntの研究はショウジョウバエを用いた遺伝学的解析によって始められ、1973年に翅や足肢の形態形成異常を示すショウジョウバエの変異としてwingless (Wg)が同定された<sup>1)</sup>。この表現型では幼虫の体節形成の異常も認められ、これらの異常を抑圧あるいは相乗的に亢進させる分節遺伝子の中で、*dishevelled*, *shaggy*, *armadillo*, *pangolin*がWgと遺伝学的に関連することが示された。その後、これらの分子が哺乳類に至るまで保存されており、*dishevelled* (dsh)はDvl, *Shaggy*はglycogen synthase kinase-3β (GSK-3β), *Armadillo*はβ-カテニン, *pangolin*はT-cell factor (Tcf)に相当することが明らかになった。1980年代に入ると哺乳類の腫瘍学の解析から、マウス乳がんを引き起こすmouse mammary tumor virusがプロモーター領域に挿入された際に発現する遺伝子が同定され、*int1*と名付けられた<sup>2)</sup>。*int1*はアミノ酸配列から分泌タンパク質と推

定され、Wgとの相同性が高いためにWnt1 (Wingless + int1)と呼ばれるようになった。90年代に入ると、Wntシグナル伝達経路において細胞膜の裏打ちタンパク質として機能するβ-カテニンが細胞質に蓄積することによって、Wntシグナルが活性化されることが明らかになった<sup>3)</sup>。その後、β-カテニンは転写因子であるTcfあるいはlymphoid enhancer factor (LEF)と複合体を形成することにより転写活性を促進し、遺伝子発現を介して体節や器官の形成を制御することが示された<sup>4,5)</sup>。さらに90年代後半になるとWntによって制御されるシグナル伝達経路はβ-カテニン経路に加えて平面内細胞極性(planar cell polarity; PCP)経路とCa<sup>2+</sup>経路の少なくとも3種類存在することが明らかになった<sup>6,7)</sup>。今日までにWntシグナル伝達因子が次々に同定され、これら3種類の経路がネットワークを構成して、初期発生や細胞運動、増殖等の細胞の機能制御を行っていることが明らかになりつつある(図1)。

本稿では、3種類の経路から構成されるWntシグナル伝達機構を紹介した後、翻訳後修飾とエンドサイトーシスによるβ-カテニン経路の活性制御機構やβ-カテニン経路の異常と発がんの関連について概説したい。

## I Wnt タンパク質

### 1. Wnt の発現

Wntは分子量約4万の細胞外分泌糖タンパク質で種を超えて保存されており、これまでに哺乳類において19種類

広島大学大学院医歯薬学総合研究科放射線ゲノム医科学講座分子細胞情報学 (〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3)  
Regulation of Wnt signaling pathway and its relationship with tumorigenesis  
Hideki Yamamoto (Department of Biochemistry, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan)  
本総説は2007年度奨励賞を受賞した。

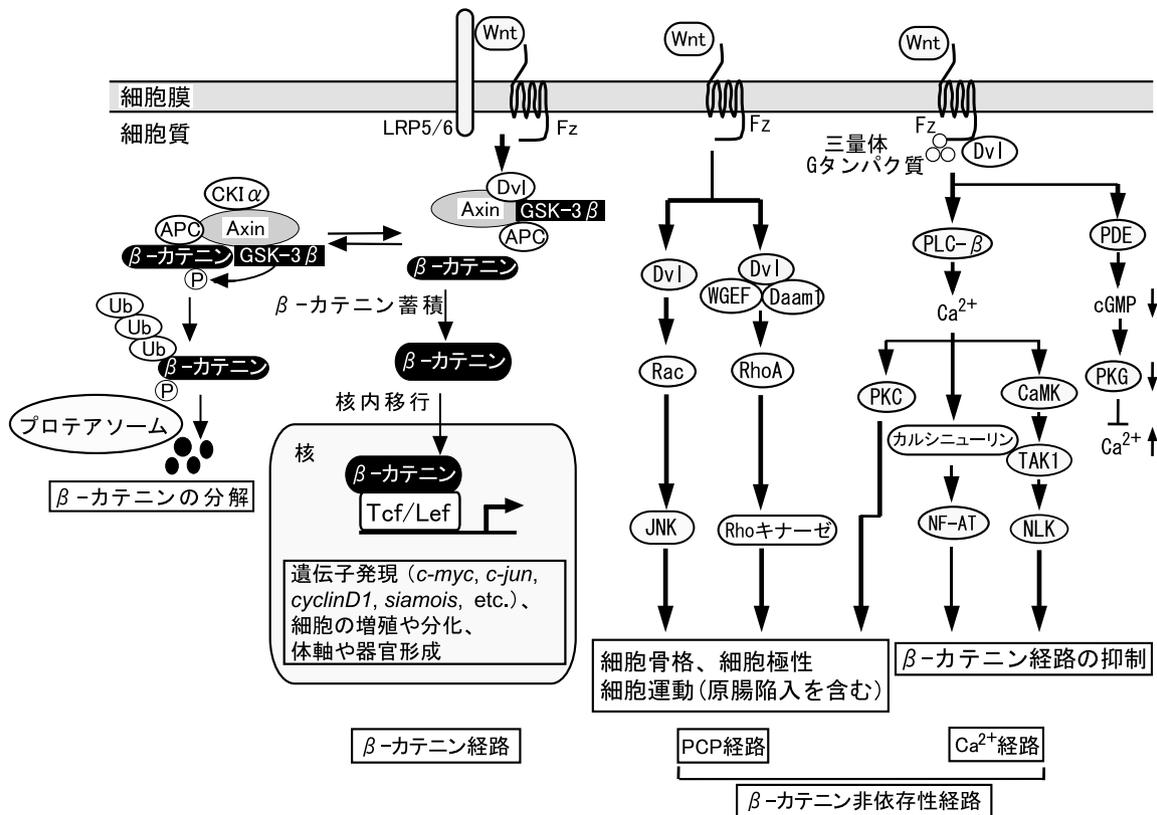


図1 Wnt シグナル伝達経路

Wnt シグナルは  $\beta$ -カテニン経路, PCP 経路,  $Ca^{2+}$  経路の三つの経路を活性化する。

の Wnt が同定されている。ノックアウトマウスの解析により, *Wnt1* は中脳や小脳の形成, *Wnt3a* は体節誘導や海馬の形成, *Wnt4* は腎臓形成, *Wnt11* は心臓の発生に機能することが明らかになっている。したがって, *Wnt* 遺伝子は発生段階において固有の時間的, 空間的な発現制御によってそれぞれの特異的な生理機能を発揮すると考えられる。また, ヒト *Wnt* 遺伝子ファミリーは独立した遺伝子座に存在するが, *Wnt3* と *Wnt9b* は 17q21, *Wnt3a* と *Wnt9a* は 1q42, *Wnt2* と *Wnt16* は 7q31 の同一染色体上に存在する。さらに, *Wnt1* と *Wnt10b* は 12q13, *Wnt6* と *Wnt10a* は 2q35 に隣接して存在し, これらの遺伝子発現が協調的に調節されている可能性がある。

## 2. Wnt の分泌

リボソームで合成された Wnt は小胞体内でアスパラギン結合型糖鎖修飾と膜結合型アシル基転移酵素の porcupine によるパルミチン酸の脂質修飾を受けた後, ゴルジ体から細胞外に分泌される<sup>8)</sup> (図 2A)。この時, 細胞膜や細胞内小胞, トランスゴルジ網に存在する Wntless は Wnt の細胞内輸送や分泌に関与する<sup>9)</sup>。ショウジョウバエの体節や翅, 複眼のパターン形成においては分泌された Wg は標的細胞まで濃度勾配を形成する。その結果, 様々な細胞に分

化して形態形成が進められていくと考えられている。Wnt/Wg タンパク質は細胞外基質に結合する傾向が強いため単純な拡散では標的細胞へ到達する可能性が低い。そのため, 細胞外に分泌された Wg タンパク質はリポタンパク質粒子 (lipoprotein particle) と複合体を形成することで細胞膜外基質に結合するのを防ぎ, 分泌細胞から離れた領域に運搬されると考えられている。細胞外基質に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycan: HSPG) は, 多様な細胞間シグナル分泌タンパク質と結合することにより, シグナル伝達や濃度勾配を制御し, 初期発生において重要な機能を果たしている。細胞膜表面上に存在する HSPG は膜貫通型の syndecan と glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー型の glypican の 2 種類に大別され, 哺乳類においてそれぞれ syndecan は 4 種類, glypican は 6 種類存在する。ショウジョウバエの初期胚において, Wg の濃度勾配は Dally-like protein (Dlp) と呼ばれる glypican ホモログが深く関与している<sup>10,11)</sup>。Dlp の変異体における Wg タンパク質の濃度勾配は, 野生型と比較して発現細胞付近では高くなり, 離れた領域では逆に低くなる。したがって, Dlp は Wg を目的の場所まで輸送して, 目的の場所まで到達すると受容体として機能して Wg を局在させると考えられる。脊椎動物においても

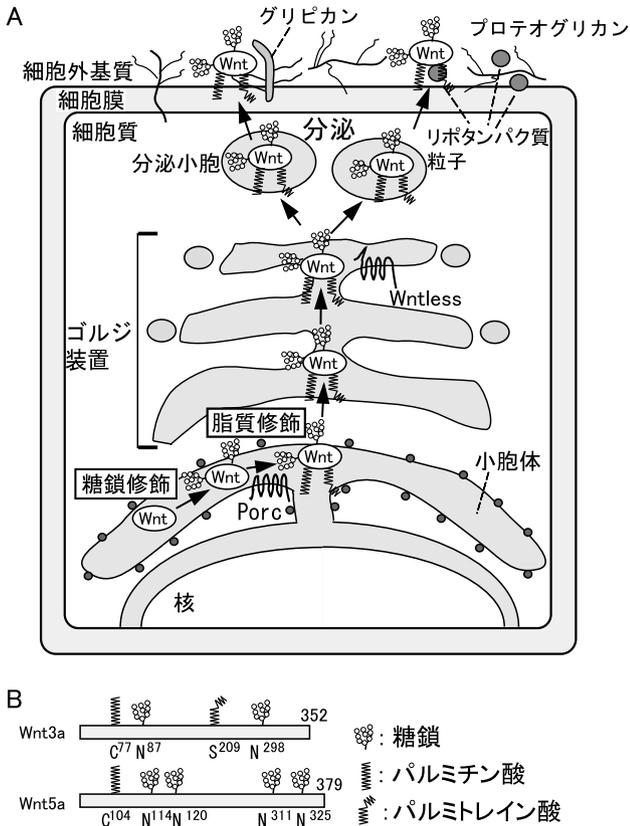


図2 Wntの翻訳後修飾と分泌の制御

(A) 翻訳後修飾によるWntの分泌制御機構を示す。まず、小胞体においてWntは糖鎖と脂質修飾を受け、ゴルジ体に移行する。ゴルジ体でさらに糖鎖修飾を受けた後、活性化型となったWntは分泌小胞から細胞外に分泌される。細胞外に分泌されたWntはリポタンパク質粒子やグリピカン等の細胞外基質の構成分子と結合し、標的細胞まで輸送される。Porc: porcupine。  
(B) Wnt3aとWnt5aにおける糖鎖と脂質修飾部位を示す。

HSPGがWntタンパク質と結合し、Wntシグナルの選択的活性化に関与することが示唆されている。

### 3. Wntの翻訳後修飾

先述のようにWntタンパク質は脂肪酸が付加されるため疎水性であり、細胞外基質と高い親和性を持つため、生理活性を有するWntとして単離、精製することが困難であった。そのため、Wntタンパク質の糖鎖と脂質修飾部位やそれらの生理的意義についての詳細は長年にわたり不明であったが、2003年にWnt3aとWnt5aの精製法が報告され、両者の生化学的性状が明らかになってきた<sup>12)</sup>。Wnt3aとWnt5aタンパク質は図2Bに示す部位で糖鎖とパルミチン酸の翻訳後修飾を受けていた<sup>13,14)</sup>。糖鎖が付加されないWnt変異体はパルミチン酸化されず、細胞外に分泌されない。一方、パルミチン酸化されないWnt変異体は分泌されるが、受容体との結合が抑制され、Wntによる細胞応答が抑制される。したがって、糖鎖修飾はWntの分泌に、パルミチン酸化はWntの機能発現に必須であると考えら

れる。さらに、Wnt3aはporcupineによって不飽和脂肪酸であるパルミトリン酸が付加される<sup>15)</sup>。この過程はWnt3aが小胞体からゴルジ体を経て細胞外に分泌される経路に必須であった。このように、Wntタンパク質は糖鎖と脂質修飾によって細胞外分泌や輸送、受容体の結合等の機能発現が制御されていると考えられる。今後、他のWntタンパク質の精製法も確立され、個々のWntタンパク質の性状や翻訳後修飾による分泌や機能発現の制御機構が明らかにされていくと考えられる。

## II Wnt受容体

WntはFrizzled (Fz) や low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) 5/6 の受容体を介して細胞内にシグナルを伝達し、多様な細胞機能を制御する。7回膜貫通型受容体のFzは、N末端側の細胞外領域に存在するシステインリッチドメイン (cysteine-rich domain; CRD) を介してWntと結合する。また、細胞質のアミノ酸配列のKTXXXW (K: リジン, T: トレオニン, X: 任意のアミノ酸, W: トリプトファン) を介してDvlと直接結合し、下流にシグナルを伝達すると考えられている<sup>16)</sup>。哺乳類においてFzは10種類存在し、Wntとの組み合わせによってシグナル伝達の特異性が決定されると考えられているが詳細は不明である。ショウジョウバエの遺伝学的解析から、1回膜貫通型受容体のArrowがWgシグナル伝達における分節形成に必須であることが判明した<sup>17)</sup>。哺乳類においてもArrowホモログのLRP5/6が存在し、LRP5は主に骨芽細胞にLRP6は組織全般に発現している<sup>18)</sup>。LRP5/6はFzの共役受容体として機能し、WntがFzとLRP5/6に結合することによってβ-カテニンの蓄積を誘導する。β-カテニン経路の活性化にはLRP5/6が必要であるが、PCP経路とCa<sup>2+</sup>経路の活性化はLRP5/6に依存しないとされている。

一方、1回膜貫通型受容体のKremenはWntとの結合能は無いが、Wnt阻害因子の分泌タンパク質Dickkopf1 (Dkk1) と結合する<sup>19)</sup>。その結果、LRP5/6と共にエンドサイトーシスが誘導され、β-カテニン経路が抑制される。FzとLRP5/6、Kremenによるβ-カテニン経路の活性制御については後述する。

## III Wntシグナル伝達経路

哺乳類において19種類存在するWntはその生物学的活性から大きく二つに分類される。Wnt1, Wnt3a, Wnt7aはマウス乳腺上皮細胞のC57MG細胞に対する形質転換能が強く、一方、Wnt4, Wnt5a, Wnt6, Wnt11等は形質転換能が弱い<sup>20)</sup>。一般に形質転換能の強いWntがβ-カテニン経路を活性化し、形質転換能の弱いWntはβ-カテニン非依存性経路を活性化すると考えられている。しかし、Wnt3a

がPCP経路のRhoキナーゼを活性化することや、受容体の組み合わせによってはWnt5aが $\beta$ -カテニン経路を活性化する可能性も示唆されているなど、Wntリガンドの種類によって細胞内シグナル伝達の特異性が決定されない可能性が高くなっている<sup>21,22)</sup>。

## 1. $\beta$ -カテニン経路

通常、Wntの非存在下では細胞質内の $\beta$ -カテニンのタンパク質量は低く保たれている。これはGSK-3 $\beta$ が $\beta$ -カテニンをリン酸化し、リン酸化された $\beta$ -カテニンはユビキチン化を受け、最終的にはプロテアソームで分解されるためである<sup>6)</sup>。一方、Wntが分泌されて細胞膜上のFzと共役受容体であるLRP5/6に結合すると、そのシグナルは細胞内へと伝達され、DvlはGSK-3 $\beta$ 依存性の $\beta$ -カテニンのリン酸化を抑制し、低リン酸化状態となった $\beta$ -カテニンはプロテアソームによる分解から免れ、細胞質内に蓄積する。その後、核内に移行した $\beta$ -カテニンは転写因子Tcf/Lefと複合体を形成して標的遺伝子の発現を促進することによって、種々の細胞機能を制御する。このように、 $\beta$ -カテニン経路では細胞質内の $\beta$ -カテニンのタンパク質量を調節することにより、Tcf/Lefを介する遺伝子発現を制御している。

## 2. $\beta$ -カテニン非依存性経路

### (a) PCP経路

上皮細胞には頂部-基底部の極性のみならず、それに直交する平面内細胞極性(PCP)が存在する。例えば、シロウジョウバエの翅毛や体表面を覆う感覚毛の形成、複眼光受容細胞などは一定の配行性を示す<sup>23)</sup>。脊椎動物においてもPCPは保存されており、マウスの尾がループ状に曲がる変異体*looptail*の原因遺伝子が、シロウジョウバエのPCPに関与する*Strabismus/Van Gogh*と相同であり、内耳コルチ器にある有毛細胞の繊毛のPCPを制御することが明らかになった<sup>24)</sup>。また、脊椎動物の原腸形成期の収束伸長運動(convergent extension)とシロウジョウバエのPCP経路を制御するシグナル伝達機構に相同性があることが示され、ゼブラフィッシュの原腸形成変異体の原因遺伝子として同定されたWntリガンドのWnt5aとWnt11、プロテオグリカンのglypican4/6、4回膜貫通型受容体の*Strabismus/Vangl*がPCP経路を制御すると考えられた<sup>25)</sup>。一方、Dshはアフリカツメガエルの原腸形成期の細胞極性に必須であり、背側中胚葉領域においてRhoやRacを活性化し、収束伸長運動を制御すると考えられていた<sup>26)</sup>。WntからDshを介してRhoやRacを活性化する機構は明らかにされていないが、Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1 (Daam1)はRhoAとDshの三者複合体を形成し、RhoAの活性化に関与する<sup>27)</sup>。さらに、原腸形成期に発現

が誘導されるRhoAグアニンヌクレオチド交換因子のweakly similarity GEF (WGEF)の発現を抑制すると収束伸長運動が抑制され、過剰発現させるとWGEFがDshやDaam1と複合体を形成することによりRhoAを活性化し、収束伸長運動を促進することが示された<sup>28)</sup>。このように、PCP経路はRhoAとRacの両者がそれぞれRhoキナーゼとJNKを活性化することにより、細胞の極性や運動を制御すると考えられる。

### (b) $Ca^{2+}$ 経路

ゼブラフィッシュの初期胚にWnt5aやWnt11のmRNAを導入すると $Ca^{2+}$ の動員が認められた<sup>29,30)</sup>。Wnt5aやWnt11による $Ca^{2+}$ 動員の分子機序は明らかになっていないが、ゼブラフィッシュ初期胚に三量体Gタンパク質の阻害剤である百日咳毒素を作用させると $Ca^{2+}$ 動員が抑制された<sup>29)</sup>。したがって、三量体Gタンパク質感受性のホスホリパーゼC- $\beta$ が関与する可能性がある。また、三量体Gタンパク質を介してcGMP phosphodiesterase (PDE)が活性化されると細胞内のcGMPの濃度が減少し、タンパク質リン酸化酵素G (PKG)の活性が抑制される<sup>31)</sup>。ゼブラフィッシュの初期胚においてPDE活性を抑制するとFz2によって誘導された $Ca^{2+}$ の細胞内流入や原腸陥入が抑制されることから、PDEはFz2の下流で機能し、 $Ca^{2+}$ 動員による収束伸長運動に関与すると考えられる。アフリカツメガエル初期胚では、Fz7とDshを共発現させると細胞内に $Ca^{2+}$ 動員が起こり、 $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase (CamK)とタンパク質リン酸化酵素C (PKC)が活性化された<sup>32)</sup>。また、Fz7の発現によってRacを介してJNKが活性化され、その結果、原腸形成期の細胞運動を促進した<sup>33)</sup>。一方、Wnt5aは脱リン酸化酵素のカルシニューリンを活性化し、nuclear factor of activated T cells (NF-AT)を脱リン酸化することにより細胞質から核内へ移行させて活性化し、その結果、 $\beta$ -カテニン経路を抑制する<sup>34)</sup>。カルシニューリン/NF-ATのシグナルはDshから $\beta$ -カテニンに至るシグナル伝達において作用していると考えられるが、詳細な抑制機序は判明していない。さらに、Wnt5aはCamKとTGF $\beta$ -activated kinase (TAK1)を介してNemo-like kinase (NLK)を活性化することにより、Tcfの転写活性を抑制する(後述)<sup>35,36)</sup>。

## IV $\beta$ -カテニンの分解制御

### 1. リン酸化による $\beta$ -カテニンの分解

Wntの非存在下では $\beta$ -カテニンはAxinを中心とした複合体内でGSK-3 $\beta$ によってリン酸化された後、ユビキチン-プロテアソーム系によって分解される。AxinはN末端側にregulators of G-protein signaling (RGS)と相同性の高い領域とC末端側にDvlにも保存されているDIX領域を

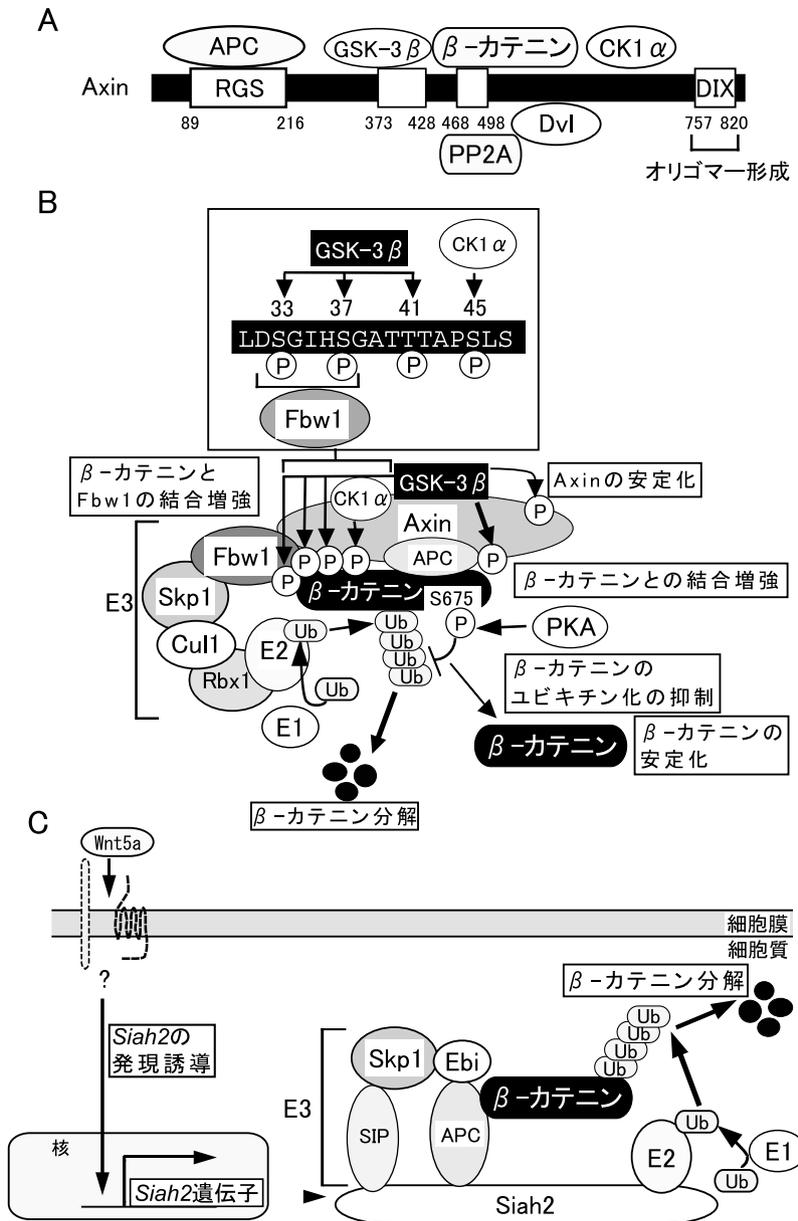


図3 β-カテニンの分解制御  
 (A) Axinの構造と結合タンパク質。  
 (B) β-カテニンはAxin複合体内でCK1αによって45番目のセリンがリン酸化されると、33/37/41番目のセリン/トレオニンがGSK-3βによって順次リン酸化される。Fbw1は33/37番のリン酸化セリンを含むDSGIIHSを介して直接β-カテニンと結合してユビキチン化を促進する。  
 P:リン酸化, Ub:ユビキチン, E1:ユビキチン活性化酵素, E2:ユビキチン結合酵素, E3:ユビキチンリガーゼ  
 (C) Wnt5aによって発現が誘導されたSiah2はAPCと複合体を形成し、リン酸化非依存的にβ-カテニンのユビキチン化を促進する。

持ち、Wntシグナル伝達経路を構成する種々のタンパク質と結合する<sup>6)</sup>(図3A)。adenomatous polyposis coli (APC)はRGSドメインと、GSK-3βやβ-カテニン、protein phosphatase 2A (PP2A)は中央部に、Dvlやcasein kinase1α (CK1α)はC末端側に結合する<sup>37-40)</sup>。さらに、DIX領域を含むC末端側でAxinはオリゴマーを形成する。一方、

APCにはβ-カテニンとAxinの結合部位が複数存在する。このAxin複合体中でCK1αがβ-カテニンをリン酸化すると、続いてGSK-3βがβ-カテニンを効率よくリン酸化する(図3B)<sup>40)</sup>。Axinに結合したGSK-3βはAxin上のβ-カテニンをリン酸化するばかりでなく、APCに結合した複数のβ-カテニンもリン酸化する<sup>41)</sup>。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 ( $\beta$ -TrCP/FWD1)の WD ドメインを介して結合し、Fbw1, Skp1, Cul1, Rbx1 からなるユビキチンリガーゼの複合体 (SCF 複合体)によりユビキチン化され、プロテアソームで分解される<sup>42)</sup>。したがって、Axin/APC 複合体中で複数の  $\beta$ -カテニンのリン酸化が順次行われ、リン酸化された  $\beta$ -カテニンはユビキチン化によって次々に分解されると考えられる。一方、Axin は GSK-3 $\beta$  によってリン酸化されると安定化し、APC はリン酸化されると  $\beta$ -カテニンとの結合が増加することから、いずれのリン酸化も結果として、 $\beta$ -カテニンのリン酸化と分解を促進すると考えられる<sup>43,44)</sup>。このように Axin は  $\beta$ -カテニン経路の足場タンパク質として機能し、特異的かつ効率よく GSK-3 $\beta$  による  $\beta$ -カテニンのリン酸化を促進する。

一方、細胞膜透過型の cAMP 類似体であるジブチリル cAMP (Bt2cAMP) でタンパク質リン酸化酵素 A (PKA) を活性化すると、 $\beta$ -カテニンが蓄積し、この作用が PKA の阻害剤で抑制される<sup>45)</sup>。PKA は  $\beta$ -カテニンの 675 番目のセリンをリン酸化することによって、 $\beta$ -カテニンのユビキチン化を阻害する。したがって、 $\beta$ -カテニンのリン酸化部位の違いにより、 $\beta$ -カテニンのユビキチン化とその安定性が制御されると考えられる。

## 2. リン酸化非依存性の $\beta$ -カテニンの分解

$\beta$ -カテニン経路において  $\beta$ -カテニンは GSK-3 $\beta$  によるリン酸化を介して分解されるが、それとは異なる機構によっても分解される。がん抑制遺伝子産物である p53 はユビキチンリガーゼの seven in absentia homolog1 (Siah1) の発現を誘導し、 $\beta$ -カテニン非依存性経路を活性化する Wnt5a は Siah2 の発現を誘導する<sup>46,47)</sup>。Siah1/2 はユビキチンの E2 酵素と結合する RING 構造を持ち、Siah-interacted protein (SIP) や Skp1, Ebi と複合体を形成する。この複合体内で、WD40 リピートを持つ F-box タンパク質である Ebi が  $\beta$ -カテニンの N 末端側と結合することで、 $\beta$ -カテニンをポリユビキチン化する (図 3C)。この場合、Fbw1 複合体とは異なり、GSK-3 $\beta$  による  $\beta$ -カテニンのリン酸化は必須ではない。前述のように APC は  $\beta$ -カテニンのリン酸化を促進することによりその分解を促進するが、SIP を介して Siah1/2 とも結合する。したがって、APC はユビキチンリガーゼおよび複数の  $\beta$ -カテニンと複合体を形成することにより、効率よく  $\beta$ -カテニンのユビキチン化と分解を亢進させると考えられる。

## V エンドサイトーシスによる $\beta$ -カテニンの安定化の制御

### 1. Wnt による $\beta$ -カテニンの安定化

Wnt が Fz と LRP5/6 受容体に結合した後、Axin 複合体

中の  $\beta$ -カテニンの分解が抑制され、 $\beta$ -カテニンが蓄積すると考えられていたが、その分子機構は長年にわたり不明であった。しかし、最近その一端が解明されてきた。 $\beta$ -カテニン蓄積能がある Wnt3a で刺激すると LRP6 の細胞質領域は CK1 と GSK-3 によってリン酸化され、Axin との親和性が増強し、Axin 複合体が細胞質から細胞膜に移動する<sup>48-50)</sup>。また、Fz は細胞質領域を介して Dvl と直接結合する<sup>16)</sup>。Wnt 刺激による LRP6 のリン酸化と Axin の細胞膜への移行には Dvl が必要であり、Fz/LRP6 受容体に Dvl/Axin が結合することにより、Wnt シグナルの引き金となると考えられる<sup>51,52)</sup>。さらに、Wnt3a 刺激により LRP6 がカベオリンと複合体を形成して細胞内に取り込まれ、その過程においてカベオリンは LRP6 を介して Axin と複合体を形成し、Axin と  $\beta$ -カテニンの結合を抑制した (図 4)<sup>53,54)</sup>。また、カベオリンは細胞膜の脂質ラフトに存在するが LRP6 も脂質ラフトに局在し、カベオリンをノックダウンすると、LRP6 の細胞質への移行と共に  $\beta$ -カテニンの安定化が抑制された。これらの結果から、Wnt3a 刺激により LRP6 受容体が細胞膜上で Axin 複合体と結合して、カベオリン依存性にエンドサイトーシスされることが  $\beta$ -カテニンの安定化に必須であると考えられる。また、哺乳類細胞やショウジョウバエの初期胚において Wnt3a 刺激により Axin の分解が誘導されることが報告されている<sup>43,55)</sup>。Axin が  $\beta$ -カテニンを分解する足場タンパク質として機能するために、Wnt3a 刺激により Axin の分解が誘導されると、 $\beta$ -カテニンのリン酸化とユビキチン化が抑制され、細胞質で  $\beta$ -カテニンが蓄積する可能性が考えられる。したがって、LRP6 は Axin の細胞膜への移行と Axin 複合体からの  $\beta$ -カテニンの解離という二つの機序で Wnt シグナル依存性の  $\beta$ -カテニンの安定化に関与する可能性が考えられる。

### 2. Dkk による $\beta$ -カテニン経路の抑制

これまでに、Wnt シグナルを細胞外で調節する多種多様な分泌タンパク質が報告されている。その中で Dkk1 はアフリカツメガエル原腸胚の背側中胚葉に発現し、頭部形成の誘導に関わる因子として同定された<sup>56)</sup>。哺乳類には 4 種類の Dkk ホモログが存在し、そのうち Dkk1 と Dkk4 が  $\beta$ -カテニン経路の抑制能を持つ<sup>57)</sup>。Dkk1 は Wnt には結合しないが LRP6 受容体に結合することにより、Wnt と LRP6 の結合を阻害する<sup>58,59)</sup>。さらに、Dkk1 は LRP6 と共に 1 回膜貫通型受容体の Kremen と三者複合体を形成することにより LRP6 と Kremen のクラスリン依存性のエンドサイトーシスを誘導する (図 4)<sup>54,60)</sup>。また、Dkk1 によって LRP6 の脂質ラフトへの局在を抑制し、クラスリンをノックダウンすると Wnt3a 依存性の  $\beta$ -カテニン蓄積には影響しないが、Dkk1 依存性の  $\beta$ -カテニン経路の抑制作用が消失す

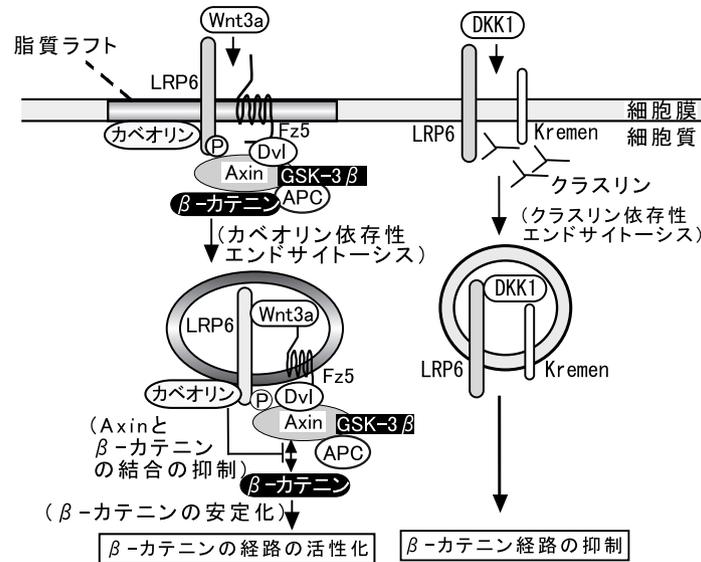


図4 エンドサイトーシスによるβ-カテニン経路の制御機構  
Wnt3aとDkk1はLRP6の異なるエンドサイトーシス経路によってβ-カテニン経路の活性化を制御する。P；リン酸化。

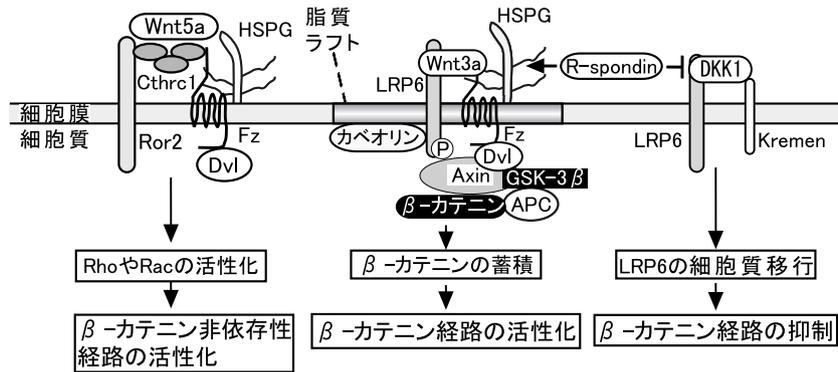


図5 細胞膜におけるWntシグナルの選択的活性化の制御機構  
受容体のFzやLRP6, Ror2, Kremenに加えて, glypican等のヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)と分泌タンパク質であるCthrc1やR-spondinとの組み合わせによって, β-カテニン経路とβ-カテニン非依存性経路の活性化が制御される。

る<sup>54)</sup>。したがって, Dkk1はLRP6の脂質ラフトへの局在を阻害し, Kremenと共にLRP6のクラスリン依存性エンドサイトーシスを誘導することにより, LRP6を細胞膜上から消失させ, その結果, β-カテニン経路を抑制すると考えられる。

### VI 細胞膜におけるWntシグナル伝達の選択的活性化の制御

WntとFz受容体やLRP5/6共役受容体の組み合わせによりWntシグナル伝達の選択性が決定されると考えられていたが, その分子機構については不明であった。最近になり, HSPGやWntとその受容体に結合する細胞外分泌タンパク質がWntシグナルの選択的活性化に関与することが明らかになってきた(図5)。アフリカツメガエルとゼ

ブラフィッシュでは, syndecan4やglypican3, glypican4がノックダウンされると, 原腸形成が阻害された<sup>61~63)</sup>。また, glypican4はWnt11と結合しDshの細胞膜への移行を促進することにより収束伸長運動を制御する<sup>63)</sup>。ゼブラフィッシュでは, glypican4/6のホモログであるKnypekがDkk1と結合し, β-カテニン経路を抑制すると共にPCP経路を活性化することが示唆されている<sup>64)</sup>。一方, glypican3がWnt3aやWnt7bと複合体を形成することにより, β-カテニン経路を活性化するという報告もある<sup>65)</sup>。Wntタンパク質とHSPGとの結合の特異性とWntシグナルの活性化との関連には検討を加える必要はあるが, HSPGはそれぞれ異なるWntタンパク質に結合することにより受容環境を設定し, Wntシグナルの選択的活性化を制御する可能性が考えられる。一方, R-spondinはLRP6あるいはKremen

と複合体を形成し、Dkk1による $\beta$ -カテニン経路の抑制効果を阻害することにより、Wnt3a依存性の $\beta$ -カテニン経路を活性化する<sup>66,67</sup> (図5)。さらに、細胞外分泌タンパク質 collagen triple helix repeat containing 1 (Cthrc1)はホモ三量体を形成し、Wnt5aとRor2に加えて、Fz3, Fz5, Fz6と複合体を形成しRhoやRacを活性化したが、LRP6とは結合しなかった<sup>68</sup>。Ror2はFzと同様に細胞外領域にCRDを有し、 $\beta$ -カテニン非依存性経路におけるFzの共役受容体として機能すると考えられており、Wnt5aと結合することにより、Cdc42とJNKを介して収束伸長運動を制御したり、filamin Aと結合することによりアクチンを再構成し、細胞運動を促進する<sup>69,70</sup>。したがって、Cthrc1は細胞膜上でWntと受容体の特異的な結合を安定化させ、 $\beta$ -カテニン非依存性経路を選択的に活性化する可能性がある。Wnt3aは $\beta$ -カテニン経路とPCP経路両者の活性化能を持

つが、Wnt3aに結合する分泌タンパク質と受容体の組み合わせにより、受容体の細胞膜上の局在と細胞質内のシグナル伝達の選択性が決定されるのであろう。

## VII 核内における Tcf/Lef の転写活性制御

### 1. $\beta$ -カテニンによる Tcf/Lef の転写活性化

哺乳類において $\beta$ -カテニン経路の転写因子はTcf1, Lef1, Tcf3, Tcf4の4種類が存在し、いずれもN末端に $\beta$ -カテニン結合領域、中央部分にDNA結合領域であるhigh mobility group (HMG)領域が存在する<sup>71</sup>。通常、TcfはGrouchoを介してhistone deacetylase (HDAC)と複合体を形成することにより転写抑制因子として機能する(図6A)<sup>72,73</sup>。一方、Wnt刺激により細胞質に蓄積した $\beta$ -カテニンは核内に移行し、GrouchoやHDACに代わってTcfと結合する。さらに、Creb-binding protein (CBP)/p300のhis-

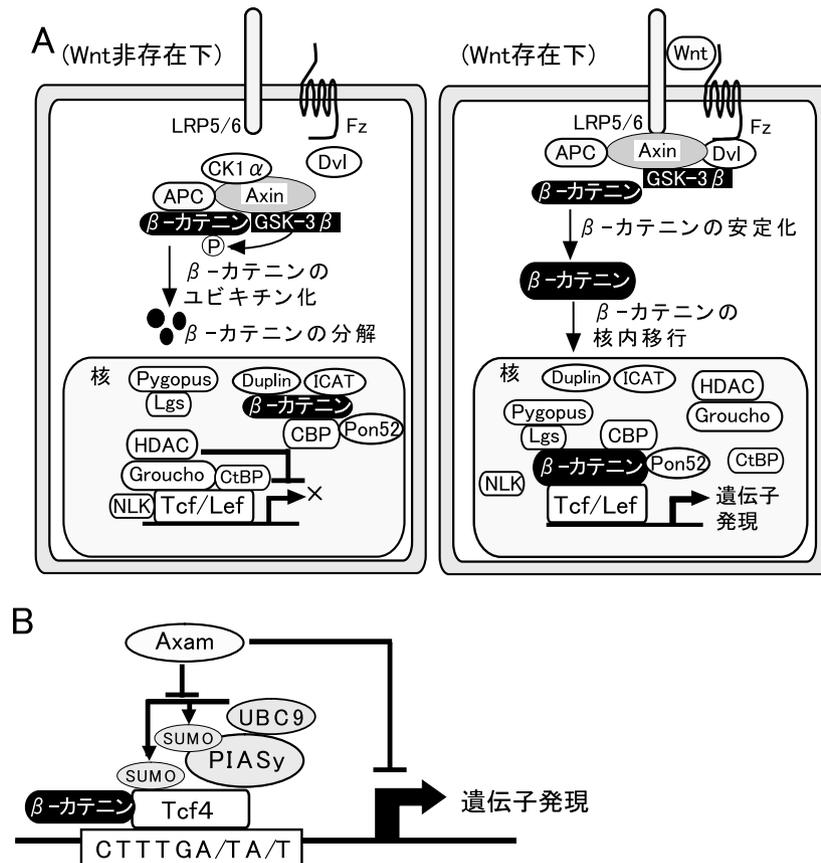


図6 Tcf/Lefの転写活性制御

(A) Wnt非存在下では細胞質内の $\beta$ -カテニンはAxinやGSK-3 $\beta$ , APCと複合体を形成してGSK-3 $\beta$ によるリン酸化を受け、分解される。核内の $\beta$ -カテニンとTcf/Lefは複数の分子と結合することにより、その転写促進作用が抑制されている。Wntが作用すると、 $\beta$ -カテニンは安定化し、 $\beta$ -カテニンがTcf/Lefと複合体を形成し転写活性を促進する。

(B) SUMO化によるTcf4の転写活性制御。PIASyはTcf4のSUMO化と転写活性を促進し、脱SUMO化酵素Axamは逆にTcf4のSUMO化と転写活性を抑制する。

tone acetyl transferase (HAT)などをリクルートすることにより、基本転写装置がプロモーター領域に結合することが可能となり、転写が開始されると考えられる<sup>74)</sup>。

## 2. 標的遺伝子

これまでに、Wnt/Wgシグナルの標的遺伝子は100種類以上報告されているが、3種類に大別することができる<sup>75)</sup>。一つ目は細胞増殖や細胞周期に関連する遺伝子である。代表的なものとして*c-myc*や*c-jun*、*fra-1*、サイクリン*D1*が挙げられる。二つ目は体軸形成や器官形成に関連する*siamois*、*Xnr3*、*Engrailed*等の遺伝子である。アフリカツメガエルにおいて、*siamois*はオーガナイザー領域に発現する転写因子で、オーガナイザーの形成や軸の分化に必要な背側化因子である。*Xnr3*はTGFβスーパーファミリーの一員であり中胚葉誘導に必要である。*Engrailed*はショウジョウバエにおいて分節極性を決定する遺伝子であり、前後軸の決定に機能する。三つ目はWntシグナル伝達の制御に関連する*Axin2*、*SFRP2*、*Dkk1*等の遺伝子である。*Axin2*(マウス*conductin*/ラット*Axil*)はAPCやGSK-3βと協調してβ-カテニンの分解を促進する<sup>76,77)</sup>。*secreted frizzled related protein2*(*SFRP2*)は、WntとFzの結合に競合し、*Dkk1*はLRP5/6に結合して、いずれもβ-カテニン経路のシグナル伝達を抑制する。また、ショウジョウバエではWgシグナルにより、Wgの発現自体が抑制される。これらはいずれもWntシグナル伝達経路においてネガティブフィードバックの機能を果たしていると考えられる。

## 3. Tcf/Lef結合タンパク質による転写活性制御

核内においてβ-カテニンとTcf/Lefが結合することがWntによる遺伝子発現に必須であるが、多種多様なTcf/Lef結合タンパク質が転写活性を調節している。*Groucho*はHDACと結合し、クロマチンリモデリング複合体を形成する。この複合体はヒストンを脱アセチル化することによりヌクレオソーム構造を密にし、さらに基本転写装置が標的遺伝子のプロモーター領域に結合することを阻害することにより、Tcf/Lefの転写を抑制すると考えられる<sup>71)</sup>。また、アフリカツメガエルのCtBP(*Xenopus* CtBP)はXTcf3と直接結合することにより、アフリカツメガエルにおける標的遺伝子の発現を抑制し、頭部や脊索の分化に関与している<sup>78)</sup>。哺乳類細胞においてもCtBPはTcf4と結合することにより、Tcf4による転写活性化を抑制する<sup>79)</sup>。したがって、*Groucho*とCtBPはβ-カテニン経路においてリプレッサーとして機能すると考えられる。

## 4. β-カテニン結合タンパク質による転写活性制御

β-カテニンが強力な転写促進因子として機能するため

に、β-カテニンの局在や転写活性化を制御するタンパク質が数多く存在する。*Pygopus*と*Legless*(*Lgs*)はいずれも、ショウジョウバエの分節極性を決定する遺伝子であり、*Lgs*はヒトの急性リンパ性白血病の染色体1q21の領域の染色体転座部位から単離された*Bcl9*のショウジョウバエにおけるホモログである。*Bcl9/Lgs*はβ-カテニンと*Pygopus*に結合し、核内で三者複合体を形成する<sup>80)</sup>。恒常的に核内に局在する*Pygopus*が*Bcl9/Lgs*を介してβ-カテニンと複合体を形成することにより、β-カテニンの核内への局在を促進させると考えられている。実際、哺乳類細胞において、*Pygopus*とβ-カテニンを発現させると相乗的にTcfの転写活性化を促進する。また、inhibitor of β-catenin and Tcf4 (ICAT)はβ-カテニンと直接結合し、β-カテニンとTcf4やCBP/p300の結合を阻害することにより、β-カテニン依存性の転写活性化を抑制する<sup>81)</sup>。ICATをノックアウトすると大脳、中脳の異常や上顎骨の形成不全や腎臓の欠損等、様々な形態形成異常が見られることから、ICATはβ-カテニン経路の抑制因子として機能し、形態形成の制御に関与していると考えられる<sup>82)</sup>。一方、Axis duplication inhibitor (Duplin)はβ-カテニンと直接結合し、Tcf4の結合を競合的に阻害することにより、β-カテニンによるTcf4の転写活性化を抑制する<sup>83)</sup>。Duplinのβ-カテニン結合領域を除去すると、β-カテニン依存性のTcf4転写活性抑制作用は消失するが、アフリカツメガエルにおいてはβ-カテニン依存性の二次体軸形成や*Siamois*の発現に対する抑制作用は消失しない<sup>84)</sup>。したがって、Duplinはβ-カテニン経路に対して複数の作用点を有し、Wntシグナルを抑制すると考えられる。Duplinをノックアウトすると、Wntシグナルがまだ機能していない胎生5.5日で致死となる<sup>85)</sup>。このことから、DuplinはTcfとβ-カテニンの結合を阻害する以外にも初期発生において重要な機能を果たしていると考えられる。その他にも、β-カテニンのC末端部分にはCBPをはじめとするHAT活性を持つクロマチンリモデリング複合体やDNA ATPase/ヘリカーゼを持つTIP49a/Pontin52等が結合し、Tcf/Lefの転写活性を促進させる<sup>86)</sup>。

## 5. 翻訳後修飾によるTcf/Lefの転写活性制御

### (a) リン酸化

細胞質内ではAxin、APC、β-カテニンなどがリン酸化され、β-カテニンのタンパク質量を制御する。核内においてTcfがNLKによってリン酸化されると、β-カテニン/Tcf複合体のDNAとの結合が阻害されて、その結果、Tcfによる遺伝子発現が抑制される<sup>35)</sup>。したがって、Wnt5aはCamKやTAK1、NLKを活性化して、Tcfをリン酸化することにより、β-カテニン経路を抑制する可能性が考えられる。

## (b) アセチル化

$\beta$ -カテニンのC末端に結合するCBPは転写の基本因子を含む多種多様の転写因子と複合体を形成し、共通のコアクティベーターとして機能する。また、CBPはアセチル化活性を持つ分子と複合体を形成し、さらに、CBP自身もアセチル化活性を有する。核内ではDNAはヒストンに巻き付いてヌクレオソーム構造を形成し、安定した構造をとっているが、ヒストンがアセチル化されるとヌクレオソーム構造が緩まり、転写因子がDNAに結合することにより転写が活性化される。したがって、CBPはヒストンのアセチル化を促進し、プロモーター領域に転写活性化因子をリクルートすることによって遺伝子発現を促進すると考えられる。事実、哺乳類細胞においてCBPを発現させると $\beta$ -カテニンによるTcfの転写活性が相乗的に促進される<sup>87</sup>。一方、ショウジョウバエではCBPがTcfの中央部のHMGドメインに結合し、TcfのN末端部分をアセチル化することにより、 $\beta$ -カテニンホモログであるアルマジロとTcfの結合が抑制され、Tcfの転写活性が抑制される<sup>88</sup>。しかし、最近、ショウジョウバエにおいてもCBPはアルマジロのC末端部分と結合すると、Wnt依存性に標的遺伝子のエンハンサー領域にリクルートされ、Tcfの転写活性を促進することが報告された<sup>89</sup>。また、ヒト大腸がん細胞SW480においてCBPをノックダウンするとTcfの転写活性が促進された。したがって、CBPにはアセチル化によってTcfと $\beta$ -カテニンの結合を抑制する機能と $\beta$ -カテニンと複合体を形成しTcfの転写活性を促進するという二つの機能があると考えられる。

## (c) SUMO化

small ubiquitin-like modifier (SUMO)はユビキチンと18%の同一性が認められ、N末端側の伸長した領域を除くと立体構造が類似している<sup>90</sup>。SUMO化はユビキチン化と同様に、SUMO活性化酵素(E1)とSUMO結合酵素(E2)、SUMOリガーゼ(E3)の3種類の酵素により行われる。SUMO化の標的タンパク質としてI $\kappa$ B $\alpha$ やp53, promyelocytic leukemia protein (PML)等多数報告されており、SUMO化によって標的タンパク質の安定性や転写活性、細胞内局在が制御される。

$\beta$ -カテニン経路においては転写因子のLef1がSUMO化され、PIASyがそのSUMO化を促進する<sup>91</sup>。Lef1のSUMO化と転写活性制御との直接の関連は明らかではないが、 $\beta$ -カテニンによるLef1の転写活性化はPIASyによって抑制される。一方、Tcf4もLef1と同様にSUMO化され、Tcf4のSUMO化と転写活性はSUMO化のE3リガーゼのPIASyによって促進された<sup>92</sup>。さらに、SUMO化E3リガーゼであるPIASyもSUMO化され、PIASyによるTcf4のSUMO化と転写活性の促進にはPIASy自身の

SUMO化が必要であった<sup>93</sup>。SUMO化による修飾は可逆的な反応で、E1, E2, E3によるSUMO化と脱SUMO化酵素による脱SUMO化によってSUMO化のバランスが制御されている。哺乳類の脱SUMO化酵素(sentrin specific protease: SENP)は7種類存在し、ファミリーを形成している。このうちSENP2はAxinに結合する分子として同定されたAxin associating molecule (Axam)と同一である<sup>94</sup>。哺乳類細胞ではAxamは脱SUMO化活性依存性に $\beta$ -カテニンの分解を促進し、アフリカツメガエルの初期胚では体軸形成を抑制した<sup>95</sup>。これらの結果に一致して、Axamは脱SUMO化活性依存性にTcf4の転写活性を抑制した。さらに、哺乳類細胞にAxamを発現させるとTcf4のSUMO化を抑制した<sup>92</sup>。PIASyがTcf4のSUMO化と転写活性を促進することをあわせて考えると、SUMO化が促進されるとTcf4の転写活性が促進され、逆に脱SUMO化されると転写活性が抑制されると考えられる(図6B)。したがって、 $\beta$ -カテニン経路はリン酸化とユビキチン化に加えて、SUMO化の翻訳後修飾によっても制御される可能性が示唆された。これまでにTGF $\beta$ シグナル経路においてI型受容体がユビキチン化によって分解されることは明らかにされていたが、最近、この受容体がTGF $\beta$ 刺激によりSUMO化され、さらにSUMO化によりSmad3を介するシグナル伝達が増強されることが報告された<sup>96</sup>。したがって、LRP6やFzをはじめとするWntシグナル伝達経路を制御する受容体がユビキチンやSUMOの基質になりうるのか、また、それらがAxamによって脱SUMO化されるのかを解析し、SUMO化と脱SUMO化によるWntシグナル伝達経路の制御機構を解明することが重要な課題である。

## (d) ユビキチン化

Wntの非存在下では細胞質において $\beta$ -カテニンがユビキチン化によって分解される。一方、核内においてもLef1がユビキチン-プロテアソーム系によって分解される<sup>97</sup>。また、Notchシグナルを抑制するNotch-regulated ankyrin repeat protein (Nrarp)がLef1の分解を阻害し、そのLef1分解抑制が神経堤細胞の発生に関わることを示唆されている。Lef1のユビキチンE3リガーゼは同定されていないが、新たなLef1の転写活性制御となる可能性があり興味深い。

VIII  $\beta$ -カテニン経路の異常とがん

APCや $\beta$ -カテニン、Axinの遺伝子変異が大腸がんや肝臓がんをはじめとする多くのヒトがんで見出され(図7)、これらの症例では $\beta$ -カテニンが細胞質や核に蓄積することが明らかになってきた<sup>98,99</sup>。 $\beta$ -カテニン経路は遺伝子発現を介して細胞周期や細胞増殖を制御しているために、構成因子の遺伝子変異や $\beta$ -カテニン経路の抑制機構に異常

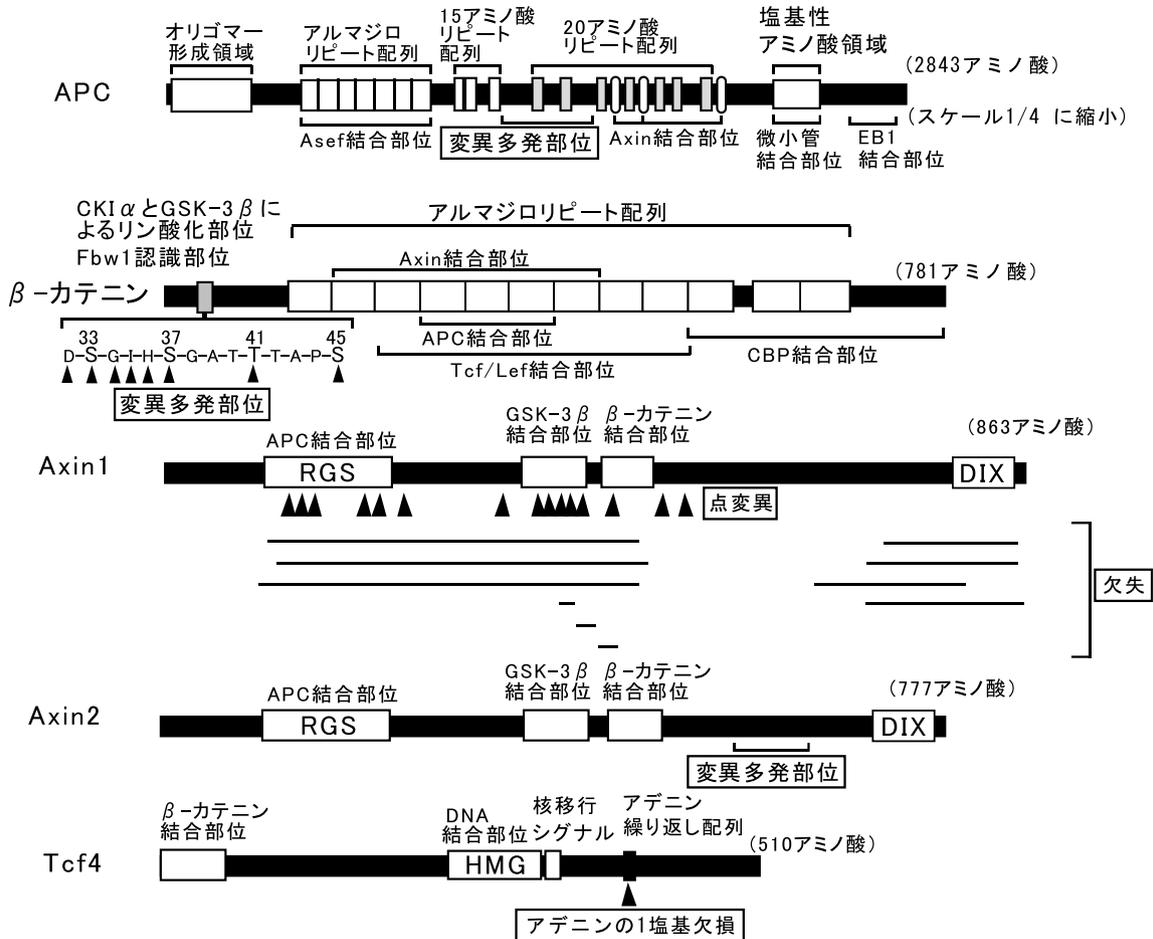


図7 β-カテニン経路の構成因子の遺伝子変異  
β-カテニン経路の構成因子の構造とヒトがんにおける変異部位を示す。

が生じると細胞増殖の制御機構が破綻し、細胞のがん化が進行すると考えられる。

1. APCの遺伝子異常

APCはFAP(家族性大腸腺腫症)の原因遺伝子として同定された<sup>98)</sup>。APCは約2800アミノ酸からなるタンパク質であり、中央部の3個の15アミノ酸リピートと7個の20アミノ酸リピートがβ-カテニンと直接結合してβ-カテニンの分解を促進する。APCはAxinと20アミノ酸リピートの3箇所(3番目と4番目の20アミノ酸リピートの間、4番目と5番目の20アミノ酸リピートの間、7番目の20アミノ酸リピートのC端側)で結合する。FAPは常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性大腸がんでは若年より大腸腺腫を多発し、いずれは大腸がんを発生する。また、APC遺伝子の異常は散在性大腸がんでも約80%の症例で見出されている。FAPや大腸がんでは認められるAPCの遺伝子異常はAPC中央の変異多発部位でストップコドンを生じるものがほとんどである。この変異APCはβ-カテニンとの結合能は保持しているが、Axin結合領域が存在しない。

すなわち、多くの大腸がんでは認められる変異APCはAxinと複合体を形成することができず、β-カテニンの分解能が低下し、そのためβ-カテニンが蓄積すると考えられる。また、APCはβ-カテニン経路の構成因子の他にも様々なタンパク質と結合することが知られている。C末端側の塩基性アミノ酸領域には微小管が、さらにそのC末端側には微小管結合タンパク質EB1が結合する。N末端側のアルマジロリピートには低分子量Gタンパク質Racの活性化因子であるAsefが結合する<sup>100)</sup>。したがって、C末端側を欠失した変異APCは、Asefを活性化して葉状突起の形成や細胞遊走を促進することが示唆され、がんの浸潤や転移と関係している可能性がある。

2. β-カテニンの遺伝子異常

β-カテニンの遺伝子異常はエクソン3に集中している<sup>98)</sup>。この領域はGSK-3βやCK1αでリン酸化されるコドン27・33・37・41・45のセリンまたはトレオニンを含んでいると共に、ユビキチンリガーゼFbw1の認識配列DSGXSS(D:アスパラギン酸, S:セリン, G:グリシン,

X:任意のアミノ酸)を含んでいる。これらのアミノ酸の変異により $\beta$ -カテニンがGSK-3 $\beta$ によりリン酸化されなくなるか、あるいはFbw1と結合能がないためにユビキチン化されなくなり、変異 $\beta$ -カテニンが細胞質に蓄積すると考えられる。肝臓がん、子宮がん、悪性リンパ腫などさまざまな悪性腫瘍でこれらのセリン・トレオニンや隣接するアミノ酸の変異およびエキソン3の完全あるいは部分欠損が報告され、これらの多くの症例において $\beta$ -カテニンが異常集積している。また、大腸がんでも $\beta$ -カテニンの変異が報告されているが、興味深いことにこれらの症例ではAPCの変異が存在しない。

### 3. Axinの遺伝子異常

先述したようにAxinはWntシグナル伝達経路の足場タンパク質として機能しており、Axin複合体内でGSK-3 $\beta$ による $\beta$ -カテニンのリン酸化状態が巧妙に制御されている<sup>6)</sup>。ヒトではAxinファミリーは*Axin1*と*Axin2*の二つの遺伝子が存在する。*Axin1*は肝臓がん、脳腫瘍において塩基の欠失や終止コドンが生じ、APCやGSK-3 $\beta$ の結合部位が欠失する<sup>101,102)</sup>。また、*Axin2*の遺伝子異常は主に大腸がんにも認められ、 $\beta$ -カテニン結合部位のC末端部分(エキソン7)に変異多発部位が存在する<sup>103)</sup>。これらの変異はミスマッチ修復の欠陥によって塩基の欠失や挿入が起こり、*Axin2*のC末端側が欠失する。いずれも、遺伝子変異によってAPCや $\beta$ -カテニン、GSK-3 $\beta$ との複合体形成ができないために、 $\beta$ -カテニンのリン酸化やユビキチン化が抑制され、その結果 $\beta$ -カテニンが蓄積すると考えられる。さらに、APCや $\beta$ -カテニンの遺伝子異常の頻度が低いと考えられていた遺伝子不安定性(microsatellite instability)を示す大腸がんにおいて、*Axin1*の遺伝子異常が存在する<sup>104)</sup>。それらの症例では細胞質や核に $\beta$ -カテニンが蓄積しているが、APCと $\beta$ -カテニンの遺伝子異常は存在しない。

### 4. Tcfの遺伝子異常

腸管で主に発現しているTcf4のC末端側にはアデニン9個の繰り返し配列が存在し、CtBPがTcf4のC末端側に結合し転写を抑制する。遺伝子不安定性を示す大腸がんにおいて、Tcf4のC末端側にフレームシフト変異が見出された<sup>105)</sup>。この変異によって、C末端のアデニン9個の繰り返し配列が8個になり、CtBP結合配列の前でストップコドンが生じてしまう。したがって、変異Tcf4はCtBPと結合できないために転写活性が亢進する可能性が考えられる。

### 5. Wnt阻害因子の遺伝子発現異常

$\beta$ -カテニン経路の構成因子の遺伝子異常が大腸がんの原因としてよく知られていたが、最近、Wnt阻害因子のSFRPやWnt inhibitory factor-1(WIF-1)、Dkk1の遺伝子発

現異常を伴う大腸がんの発生機序が明らかになってきた。SFRPはWntの受容体であるFzと同様にCRDを有し、Wntに直接結合することによりWntとFzの結合を阻害してWntシグナルを抑制すると考えられている<sup>105)</sup>。先述したように、大腸がんには高頻度(70%以上)にAPCの遺伝子異常が認められる。さらに、*SFRP1*、*SFRP2*、*SFRP5*遺伝子のプロモーターにおけるCpGアイランドは高頻度でメチル化され、それらの発現が抑制されている<sup>106)</sup>。また、分子機構は不明であるがSFRP1は大腸がんにおいて蓄積した $\beta$ -カテニンの分解を促進して、Tcfの転写活性を抑制する。一方、WIF-1はN末端部分のWIFドメインを介してWntと結合し、Wntと受容体の結合を阻害してWntシグナルを抑制すると考えられている<sup>107)</sup>。*WIF-1*や*Dkk1*もSFRPと同様に、CpGアイランドが高頻度でメチル化され、それぞれの遺伝子の発現が抑制されている<sup>108,109)</sup>。したがって、大腸がんにおいて $\beta$ -カテニンが異常に蓄積するには、APC、 $\beta$ -カテニン、Axinの変異だけではなく、Wnt阻害因子であるSFRPやWIF-1、Dkk1等の遺伝子発現の不活化も必要である可能性が考えられる。

## おわりに

私がWntシグナルの研究を始めた10年前、Wntシグナルは $\beta$ -カテニン経路を制御する数個の遺伝子の名前を縦に並べるだけの簡潔な模式図で説明可能であった。その後、次々に構成因子が同定されて、Wntシグナルは $\beta$ -カテニン経路に加えてPCP経路、Ca<sup>2+</sup>経路の三つの経路がクロストークすることにより、様々な生命活動を制御することが明らかになってきた。私はWntシグナル伝達経路において $\beta$ -カテニン経路の活性制御機構について解析してきたが、今日までに $\beta$ -カテニンの安定化の分子機構の詳細は明らかになっていない。哺乳類細胞ではWnt3a刺激によりLRP6が脂質ラフトにおいてカベオリンと複合体を形成することが $\beta$ -カテニンの安定化に必要であると考えられるが、ショウジョウバエや哺乳類の神経細胞等のカベオリンが存在しない細胞においても $\beta$ -カテニン経路は活性化される。今後、脂質ラフトに局在し、カベオリンの機能を相補するタンパク質を同定し、脂質ラフトにおける $\beta$ -カテニンの安定化機構の全貌を明らかにすることが重要である。一方、 $\beta$ -カテニン非依存性経路においてWntが受容体に結合した後、いかにして細胞内にシグナルを伝達するかは十分に理解されていない。Wnt5aの刺激によりFz4やFz5のクラスリン依存性のエンドサイトーシスが誘導されることが示唆されているが、Wntシグナル伝達の活性化との関連は不明である。 $\beta$ -カテニン非依存性経路の活性制御機構を、リガンドと受容体の相互作用やエンドサイトーシスとの関連も含めて明らかにしなければならない。 $\beta$ -カテニン経路において、細胞質では転写促進因子の $\beta$ -

カテニンの量的変化が厳密に制御されている。β-カテニン経路の構成因子の遺伝子変異によって Axin/APC/β-カテニン/GSK-3β の複合体形成,あるいはβ-カテニンのリン酸化やユビキチン化が行われずに,最終的にはβ-カテニンが核に蓄積し,細胞ががん化すると考えられる。一方,核内において Tcf/Lef の転写活性はリン酸化やアセチル化, SUMO 化等の翻訳後修飾と結合タンパク質によって制御されていることが明らかになってきた。したがって, Tcf/Lef の遺伝子変異によって転写活性の制御因子との結合や翻訳後修飾が抑制あるいは促進されるために転写活性が亢進する可能性も考えられる。β-カテニン経路の異常ががんをはじめとするヒト疾患の発症に関連するため,β-カテニン経路の活性制御機構の全貌を解明することがヒト疾患の診断法や治療薬開発などの臨床研究への端緒になると考えられる。

## 謝辞

本稿で紹介いたしました研究は,菊池章教授のご指導のもと,小山真也先生(現・就実大学教授),岸田昭世先生(現・鹿児島大学教授),安東知子先生(現・熊本大学助教),日野真一郎先生(現・宮崎大学助教)をはじめ,引用文献に記載されている大学院生や研究生と共に行ってきたものであります。また,アフリカツメガエルを用いた体軸形成の解析は東京大学大学院の浅島誠教授と道上達男博士に協力していただきました。これらの先生方に心より感謝いたします。

## 文 献

- Sharma, R.P. (1973) *Dros. Inf. Service*, **50**, 134.
- Nusse, R. & Varmus, H.E. (1982) *Cell*, **31**, 99-109.
- Yost, C., Torres, M., Miller, J.R., Huang, E., Kimelman, D., & Moon, R.T. (1996) *Genes Dev.*, **15**, 1443-1454.
- Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O., & Clevers, H. (1996) *Cell*, **86**, 391-399.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., & Birchmeier, W. (1996) *Nature*, **382**, 638-642.
- Kikuchi, A. (1999) *Cell. Signal.*, **11**, 777-788.
- Kikuchi, A. & Yamamoto, H. (2008) *Cancer Sci.*, **99**, 202-208.
- Tanaka, K., Kitagawa, Y., & Kadowaki, T. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 12816-12823.
- Bänziger, C., Soldini, D., Schütt, C., Zipperlen, P., Hausmann, G., & Basler, K. (2007) *Cell*, **125**, 509-522.
- Tsuda, M., Kamimura, K., Nakato, H., Archer, M., Staatz, W., Fox, B., Humphrey, M., Olson, S., Futch, T., Kaluza, V., Siegfried, E., Stam, L., & Selleck, S.B. (1999) *Nature*, **400**, 276-280.
- Lin, X. & Perrimon, N. (1999) *Nature*, **400**, 281-284.
- Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R. 3rd, & Nusse, R. (2003) *Nature*, **423**, 448-452.
- Kurayoshi, M., Yamamoto, H., Izumi, S., & Kikuchi, A. (2007) *Biochem. J.*, **402**, 515-523.
- Komekado, H., Yamamoto, H., Chiba, T., & Kikuchi, A. (2007) *Genes Cells*, **12**, 521-534.
- Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., & Takada, S. (2006) *Dev. Cell*, **11**, 791-801.
- Umbhauer, M., Djiane, A., Goisset, C., Penzo-Méndez, A., Riou, J.F., Boucaut, J.C., & Shi, D.L. (2000) *EMBO J.*, **19**, 4944-4954.
- Wehrli, M., Dougan, S.T., Caldwell, K., O'Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A., & DiNardo, S. (2000) *Nature*, **407**, 527-530.
- He, X., Semenov, M., Tamai, K., & Zeng, X. (2004) *Development*, **131**, 1663-1677.
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B.M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C., Glinka, A., & Niehrs, C. (2002) *Nature*, **417**, 664-667.
- Logan, C.Y. & Nusse, R. (2004) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **20**, 781-810.
- Kishida, S., Yamamoto, H., & Kikuchi, A. (2004) *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 4487-4501.
- Mikels, A.J. & Nusse, R. (2006) *PLoS Biol.*, **4**, 570-582.
- Eaton, S. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 860-866.
- Montcouquiol, M., Rachel, R.A., Lanford, P.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., & Kelley, M.W. (2003) *Nature*, **423**, 173-177.
- Veeman, M.T., Axelrod, J.D., & Moon, R.T. (2003) *Dev. Cell*, **5**, 367-377.
- Habas, R., Dawid, I.B., & He, X. (2003) *Genes Dev.*, **17**, 295-309.
- Habas, R., Kato, Y., & He, X. (2001) *Cell*, **107**, 843-854.
- Tanegashima, K., Zhao, H., & Dawid, I.B. (2008) *EMBO J.*, **27**, 606-617.
- Slusarski, D.C., Corces, V.G., & Moon, R.T. (1997) *Nature*, **390**, 410-413.
- Kohn, A.D. & Moon, R.T. (2005) *Cell Calcium*, **38**, 439-446.
- Ahumada, A., Slusarski, D.C., Liu, X., Moon, R.T., Malbon, C.C., & Wang, H.Y. (2002) *Science*, **298**, 2006-2010.
- Sheldahl, L.C., Slusarski, D.C., Pandur, P., Miller, J.R., Kühl, M., & Moon, R.T. (2003) *J. Cell Biol.*, **161**, 769-777.
- Kinoshita, N., Iioka, H., Miyakoshi, A., & Ueno, N. (2003) *Genes Dev.*, **17**, 1663-1676.
- Saneyoshi, T., Kume, S., Amasaki, Y., & Mikoshiba, K. (2002) *Nature*, **417**, 295-299.
- Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J., Nagai, S.-I., Nishita, M., Meneghini, M., Barker, N., Waterman, M., Bowerman, B., Clevers, H., Shibuya, H., & Matsumoto, K. (1999) *Nature*, **399**, 798-802.
- Ishitani, T., Kishida, S., Hyodo-Miura, J., Ueno, N., Yasuda, J., Waterman, M., Shibuya, H., Moon, R. T., Ninomiya-Tsuji, J., & Matsumoto, K. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 131-139.
- Kishida, S., Yamamoto, H., Ikeda, S., Kishida, M., Sakamoto, I., Koyama, S., & Kikuchi, A. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 10823-10826.
- Ikeda, S., Kishida, M., Matsuura, Y., Usui, H., & Kikuchi, A. (2000) *Oncogene*, **19**, 537-545.
- Kishida, S., Yamamoto, H., Hino, S.-I., Ikeda, S., Kishida, M., & Kikuchi, A. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 4414-4422.

- 40) Liu, C., Li, Y., Semënov, M., Han, C., Baeg, G.-H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., & He, X. (2002) *Cell*, **108**, 837–847.
- 41) Hinoi, T., Yamamoto, H., Kishida, M., Takada, S., Kishida, S., & Kikuchi, A. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 34399–34406.
- 42) Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., Ishida, N., Hattori, K., Nakamichi, I., Kikuchi, A., Nakayama, K.-I., & Nakayama, K. (1999) *EMBO J.*, **18**, 2401–2410.
- 43) Yamamoto, H., Kishida, S., Kishida, M., Ikeda, S., Takada, S., & Kikuchi, A. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 10681–10684.
- 44) Hart, M.J., de los Santos, R., Albert, I.N., Rubinfeld, B., & Polakis, P. (1998) *Curr. Biol.*, **8**, 573–581.
- 45) Hino, S., Tanji, C., Nakayama, K.I., & Kikuchi, A. (2005) *Mol. Cell Biol.*, **25**, 9063–9072.
- 46) Matsuzawa, S.I. & Reed, J.C. (2001) *Mol. Cell*, **7**, 915–926.
- 47) Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, P.J., & Yang, Y. (2003) *J. Cell Biol.*, **162**, 899–908.
- 48) Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z., & He, X. (2004) *Mol. Cell*, **13**, 149–156.
- 49) Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stannek, P., Glinka, A., & Niehrs, C. (2005) *Nature*, **438**, 867–872.
- 50) Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J., & He, X. (2004) *Nature*, **438**, 873–877.
- 51) Cliffe, A., Hamada, F., & Bienz, M. (2003) *Curr. Biol.*, **13**, 960–966.
- 52) Bilic, J., Huang, Y.L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C.M., Bienz, M., & Niehrs, C. (2007) *Science*, **316**, 1619–1622.
- 53) Yamamoto, H., Komekado, H., & Kikuchi, A. (2006) *Dev. Cell*, **11**, 213–223.
- 54) Yamamoto, H., Sakane, H., Yamamoto, H., & Kikuchi, A. (2008) *Dev. Cell*, **15**, 37–48.
- 55) Tolwinski, N.S., Wehrli, M., Rives, A., Erdeniz, N., DiNardo, S., & Wieschaus, E. (2003) *Dev. Cell*, **4**, 407–418.
- 56) Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A.P., Blumenstock, C., & Niehrs, C. (1998) *Nature*, **391**, 357–362.
- 57) Niehrs, C. (2006) *Oncogene*, **25**, 7469–7381.
- 58) Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A., & Niehrs, C. (2001) *Nature*, **411**, 321–325.
- 59) Semënov, M.V., Tamai, K., Brott, B.K., Kühl, M., Sokol, S., & He, X. (2001) *Curr. Biol.*, **11**, 951–961.
- 60) Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B.M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C., Glinka, A., & Niehrs, C. (2002) *Nature*, **417**, 664–667.
- 61) Muñoz, R., Moreno, M., Oliva, C., Orbenes, C., & Larraín, J. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 492–500.
- 62) De Cat, B., Muyldermans, S.Y., Coomans, C., Degeest, G., Vanderschueren, B., Creemers, J., Biemar, F., Peers, B., & David, G. (2003) *J. Cell Biol.*, **163**, 625–635.
- 63) Ohkawara, B., Yamamoto, T.S., Tada, M., & Ueno, N. (2003) *Development*, **130**, 2129–2138.
- 64) Caneparo, L., Huang, Y.L., Staudt, N., Tada, M., Ahrendt, R., Kazanskaya, O., Niehrs, C., & Houart, C. (2007) *Genes Dev.*, **21**, 465–480.
- 65) Capurro, M.L., Xiang, Y.Y., Lobe, C., & Filmus, J. (2005) *Cancer Res.*, **65**, 6245–6254.
- 66) Wei, Q., Yokota, C., Semënov, M.V., Doble, B., Woodgett, J., & He, X. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 15903–15911.
- 67) Binnerts, M.E., Kim, K.A., Bright, J.M., Patel, S.M., Tran, K., Zhou, M., Leung, J.M., Liu, Y., Lomas, W.E. 3rd, Dixon, M., Hazell, S.A., Wagle, M., Nie, W.S., Tomasevic, N., Williams, J., Zhan, X., Levy, M.D., Funk, W.D., & Abo, A. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 14700–14705.
- 68) Yamamoto, S., Nishimura, O., Misaki, K., Nishita, M., Minami, Y., Yonemura, S., Tarui, H., & Sasaki, H. (2008) *Dev. Cell*, **15**, 23–36.
- 69) Oishi, I., Suzuki, H., Onishi, N., Takada, R., Kani, S., Ohkawara, B., Koshida, I., Suzuki, K., Yamada, G., Schwabe, G.C., Mundlos, S., Shibuya, H., Takada, S., & Minami, Y. (2003) *Genes Cells*, **8**, 645–654.
- 70) Nishita, M., Yoo, S.-K., Nomachi, A., Kani, S., Sougawa, N., Ohta, Y., Takada, S., Kikuchi, A., & Minami, Y. (2006) *J. Cell Biol.*, **175**, 555–562.
- 71) Hurlstone, A. & Clevers, H. (2002) *EMBO J.*, **21**, 2303–2311.
- 72) Cavallo, R.A., Cox, R.T., Moline, M.M., Roose, J., Polevoy, G.A., Clevers, H., Peifer, M., & Bejsovec, A. (1998) *Nature*, **395**, 604–608.
- 73) Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de Wetering, M., Destrée, O., & Clevers, H. (1998) *Nature*, **395**, 608–612.
- 74) Willert, K. & Jones, K.A. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 1394–1404.
- 75) Giles, R.H., van Es, J.H., & Clevers, H. (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, **1653**, 1–24.
- 76) Behrens, J., Jerchow, B.A., Würtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kühl, M., Wedlich, D., & Birchmeier, W. (1998) *Science*, **280**, 596–599.
- 77) Yamamoto, H., Kishida, S., Uochi, T., Ikeda, S., Koyama, S., Asashima, M., & Kikuchi, A. (1998) *Mol. Cell Biol.*, **18**, 2867–2875.
- 78) Brannon, M., Brown, J.D., Bates, R., Kimelman, D., & Moon, R.T. (1999) *Development*, **126**, 3159–3170.
- 79) Valenta, T., Lukas, J., & Korinek, V. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 2369–2380.
- 80) Kramps, T., Peter, O., Brunner, E., Nellen, D., Froesch, B., Chatterjee, S., Murone, M., Züllig, S., & Basler, K. (2002) *Cell*, **109**, 47–60.
- 81) Tago, K., Nakamura, T., Nishita, M., Hyodo, J., Nagai, S., Murata, Y., Adachi, S., Ohwada, S., Morishita, Y., Shibuya, H., & Akiyama, T. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 1741–1749.
- 82) Satoh, K., Kasai, M., Ishidao, T., Tago, K., Ohwada, S., Hasegawa, Y., Senda, T., Takada, S., Nada, S., Nakamura, T., & Akiyama, T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8017–8021.
- 83) Sakamoto, I., Kishida, S., Fukui, A., Kishida, M., Yamamoto, H., Hino, S.-I., Michiue, T., Takada, S., Asashima, M., & Kikuchi, A. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 32871–32878.
- 84) Kobayashi, M., Kishida, S., Fukui, A., Michiue, T., Miyamoto, Y., Okamoto, T., Yoneda, Y., Asashima, M., & Kikuchi, A. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 5816–5822.
- 85) Nishiyama, M., Nakayama, K., Tsunematsu, R., Tsukiyama, T., Kikuchi, A., & Nakayama, K.I. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 8386–8394.
- 86) Bauer, A., Chauvet, S., Huber, O., Usseglio, F., Rothbacher, U., Aragnol, D., Kemler, R., & Pradel, J. (2000) *EMBO J.*, **19**, 6121–6130.
- 87) Takemaru, K.I. & Moon, R.T. (2000) *J. Cell Biol.*, **149**, 249–254.
- 88) Waltzer, L. & Bienz, M. (1998) *Nature*, **395**, 521–525.
- 89) Li, J., Sutter, C., Parker, D.S., Blauwkamp, T., Fang, M., & Cadigan, K.M. (2007) *EMBO J.*, **26**, 2284–2294.
- 90) Müller, S., Ledl, A., & Schmidt, D. (2004) *Oncogene*, **23**, 1998–2008.

- 91) Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., & Grosschedl, R. (2001) *Genes Dev.*, **15**, 3088–3103.
  - 92) Yamamoto, H., Ihara, M., Matsuura, Y., & Kikuchi, A. (2003) *EMBO J.*, **22**, 2047–2059.
  - 93) Ihara, M., Yamamoto, H., & Kikuchi, A. (2005) *Mol. Cell Biol.*, **25**, 3506–3518.
  - 94) Kadoya, T., Kishida, S., Fukui, A., Hinoi, T., Michiue, T., Asashima, M., & Kikuchi, A. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 37030–37037.
  - 95) Kadoya, T., Yamamoto, H., Suzuki, T., Yukita, A., Fukui, A., Michiue, T., Asahara, T., Tanaka, K., Asashima, M., & Kikuchi, A. (2002) *Mol. Cell Biol.*, **22**, 3803–3819.
  - 96) Kang, J.S., Saunier, E.F., Akhurst, R.J., & Derynck, R. (2008) *Nat. Cell Biol.*, **10**, 654–664.
  - 97) Ishitani, T., Matsumoto, K., Chitnis, A.B., & Itoh, M. (2005) *Nat. Cell Biol.*, **7**, 1106–1112.
  - 98) Polakis, P. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 1837–1851.
  - 99) Kikuchi, A. (2003) *Cancer Sci.*, **94**, 225–229.
  - 100) Kawasaki, Y., Senda, T., Ishidate, T., Koyama, R., Morishita, T., Iwayama, Y., Higuchi, O., & Akiyama, T. (2000) *Science*, **289**, 1194–1197.
  - 101) Satoh, S., Daigo, Y., Furukawa, Y., Kato, T., Miwa, N., Nishiwaki, T., Kawasoe, T., Ishiguro, H., Fujita, M., Tokino, T., Sasaki, Y., Imaoka, S., Murata, M., Shimano, T., Yamaoka, Y., & Nakamura, Y. (2000) *Nat. Genet.*, **24**, 245–250.
  - 102) Dahmen, R.P., Koch, A., Denkhau, D., Tonn, J.C., Sörensen, N., Berthold, F., Behrens, J., Birchmeier, W., Wiestler, O.D., & Pietsch, T. (2001) *Cancer Res.*, **61**, 7039–7043.
  - 103) Liu, W., Dong, X., Mai, M., Seelan, R.S., Taniguchi, K., Krishnadath, K.K., Halling, K.C., Cunningham, J.M., Qian, C., Christensen, E., Roche, P.C., Smith, D.I., & Thibodeau, S. N. (2000) *Nat. Genet.*, **26**, 146–147.
  - 104) Shimizu, Y., Ikeda, S., Fujimori, M., Kodama, S., Nakahara, M., Okajima, M., & Asahara, T. (2002) *Gene Chromo. Cancer*, **33**, 73–81.
  - 105) Wang, S., Krinks, M., Lin, K., Luyten, F.P., & Moos, M. Jr. (1997) *Cell*, **88**, 757–766.
  - 106) Suzuki, H., Watkins, D.N., Jair, K.W., Schuebel, K.E., Markowitz, S.D., Chen, W.D., Pretlow, T.P., Yang, B., Akiyama, Y., Van Engeland, M., Toyota, M., Tokino, T., Hinoda, Y., Imai, K., Herman, J.G., & Baylin, S.B. (2004) *Nat. Genet.*, **36**, 417–422.
  - 107) Hsieh, J.C., Kodjabachian, L., Rebbert, M.L., Rattner, A., Smallwood, P.M., Samos, C.H., Nusse, R., Dawid, I.B., & Nathans, J. (1999) *Nature*, **398**, 431–436.
  - 108) He, B., Reguart, N., You, L., Mazieres, J., Xu, Z., Lee, A.Y., Mikami, I., McCormick, F., & Jablons, D.M. (2005) *Oncogene*, **24**, 3054–3058.
  - 109) Aguilera, O., Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Herranz, M., Espada, J., García, J.M., Muñoz, A., Esteller, M., & González-Sancho, J.M. (2006) *Oncogene*, **25**, 4116–4121.
-