

Title	Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, interacts with $\beta$ -catenin, GSK-3 $\beta$ and APC and reduces the $\beta$ -catenin level
Author(s)	中村, 勉
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41627">https://hdl.handle.net/11094/41627</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	中村勉
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第14460号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, interacts with $\beta$ -catenin, GSK-3 $\beta$ and APC and reduces the $\beta$ -catenin level (Wntシグナル伝達経路のインヒビター Axin は $\beta$ -catenin, GSK-3 $\beta$ および APC と複合体を形成し $\beta$ -catenin レベルを制御する)
論文審査委員	(主査) 教授 秋山 徹  (副査) 教授 野島 博 教授 仲野 徹

## 論文内容の要旨

## 【目的】

Wntシグナル伝達経路はショウジョウバエからヒトまで種を越えてよく保存されており、動物の発生過程において体軸の形成や形態形成に必須である。また大腸癌などでは、大腸癌抑制遺伝子 APC もしくは  $\beta$ -catenin 遺伝子の変異によってこの経路が恒常的に活性化されていることが知られており、この経路が細胞の癌化においても重要な役割を果たしていることが明らかにされている。

この Wnt シグナル伝達経路の抑制機構をさらに詳細に明らかにするために、この経路の key molecule である  $\beta$ -catenin と相互作用するタンパク質を同定し、その機能解析を行った。

## 【方法ならびに成績】

1) 新規  $\beta$ -catenin 結合タンパク質の同定

$\beta$ -catenin の armadillo repeat を bait とし、酵母 two-hybrid 法を用いて、ヒト脳およびショウジョウバエ胚の cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、 $\beta$ -catenin 結合タンパク質をコードする新規遺伝子を 1 種類ずつ単離した。これはアミノ酸レベルで部分的に高い相同性を有し、互いにホモログの関係にあることが示唆された。

この遺伝子をアフリカツメガエル初期胚にインジェクションしたところ、背側が腹側化し頭部の形成が阻害された。このことから、この遺伝子が Wnt シグナル伝達経路のネガティブに制御するタンパク質をコードしており、体軸の形成に関与していることが示唆された。

—昨年 Costantini らによって体軸が重複するマウスミュータントの変異遺伝子 axin がクローニングされ、アミノ酸配列から我々が単離した遺伝子は axin のヒトおよびショウジョウバエホモログであることが判明した。

## 2) Axin の機能解析

*in vitro* において Axin は  $\beta$ -catenin のみならず Glycogen syntase kinase-3  $\beta$  (GSK-3  $\beta$ ) とも結合した。またその結合領域をいずれも Axin 分子のほぼ中央部に限定した。さらに酵母 two-hybrid 法を用いて Axin 結合タンパク質をスクリーニングし、RGS ドメイン大腸癌抑制遺伝子産物 APC が結合することを見出した。APC の Axin 結合領域が MCR (mutation cluster region) の直後に相当することから、Axin 結合領域を喪失することが大腸癌の発生

に寄与している可能性が考えられた。

Axin に対する抗体を作成し遺伝子産物の同定を行ったところ、マウス脳において分子量111kDa 前後にラダー状に Axin が検出された。この抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、Axin と APC・GSK-3  $\beta$  および  $\beta$ -catenin が共沈した。したがって *in vivo* においても Axin が APC・GSK-3  $\beta$  および  $\beta$ -catenin と複合体を形成することが示唆された。

さらにヒト大腸癌細胞株 SW480 に Axin を過剰発現させると、 $\beta$ -catenin のレベルが著しく減少した。Axin の欠失ミュータントを作成し同様の解析を行ったところ、GSK-3  $\beta$  結合領域あるいは  $\beta$ -catenin 結合領域を欠失させた場合にのみ、 $\beta$ -catenin を減少させる活性を失った。したがって Axin には  $\beta$ -catenin を down-regulation する活性があり、この活性には GSK-3  $\beta$  結合領域あるいは  $\beta$ -catenin 結合領域が必須であることが示唆された。

#### 【総括】

Axin は APC・GSK-3  $\beta$  および  $\beta$ -catenin と複合体を形成し、 $\beta$ -catenin の細胞内レベルを down-regulation することによって Wnt シグナル伝達経路をネガティブに制御していることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

Wnt シグナル伝達経路を構成するタンパク質として、これまで Dishevelled, Glycogen syntase kinase-3  $\beta$  (GSK-3  $\beta$ )、大腸癌抑制遺伝子産物 APC および  $\beta$ -catenin などが知られている。通常は細胞質の  $\beta$ -catenin は速やかに degradation されているが、Wnt のシグナルが入ると  $\beta$ -catenin は安定化されて核に移行し、転写調節因子と結合して標的遺伝子の転写を活性化することが明らかにされている。しかしこれらのタンパク質間の相互作用や  $\beta$ -catenin の分解および安定化の機構など、解明されるべき点は多い。

本研究は、 $\beta$ -catenin と相互作用するタンパク質に注目してその同定を行い、さらにその機能を解析したものである。その結果、新規の  $\beta$ -catenin 結合タンパク質をコードする遺伝子を単離し、アフリカツメガエル初期胚を用いた解析により、このタンパク質が Wnt シグナル伝達経路のネガティブレギュレーターであることを示した。このタンパク質が Axin のホモログであると判明した後、Axin が  $\beta$ -catenin のみならず GSK-3  $\beta$  および APC とも複合体を形成することを見出した。さらに Axin には  $\beta$ -catenin の degradation を促進する活性があり、この活性には GSK-3  $\beta$  および  $\beta$ -catenin との結合が必須であることを示した。

以上の結果は Axin が APC・GSK-3  $\beta$  および  $\beta$ -catenin と複合体を形成し、 $\beta$ -catenin の細胞内レベルを down-regulation することによって Wnt シグナル伝達経路をネガティブに制御していることを示唆するもので、Wnt シグナル伝達経路の ON/OFF を制御するメカニズムの解明に向けて重要な知見をもたらした。よって本研究は学位を授与するに値すると思われる。