



Title	Dynamic palmitoylation controls the microdomain localization of the DKK1 receptors CKAP4 and LRP6
Author(s)	佐田, 遼太
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76411
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	佐田 遼太
論文題名 Title	Dynamic palmitoylation controls the microdomain localization of the DKK1 receptors CKAP4 and LRP6 (ダイナミックなパルミチン酸化修飾を介したDKK1受容体CKAP4とLRP6の脂質ラフトへの局在制御機構の解析)
論文内容の要旨	
〔目 的〕 Cytoskeleton associated protein 4 (CKAP4) は小胞体の構造維持に関与する。一方、私共はCKAP4が2型膜タンパクとして細胞膜に局在し、分泌性タンパク質Dickkopf1 (DKK1) の受容体として機能すること、DKK1-CKAP4シグナルがPI3K-AKT経路の活性化を介してがん細胞の増殖を促進することを報告した。CKAP4はCys ¹⁰⁰ においてパルミチン酸化されることが知られているが、DKK1-CKAP4シグナルにおける意義は不明であった。DKK1受容体としては、元来LRP6が知られている。私共はLRP6が脂質ラフトに局在することを報告したが、その機構及びDKK1-CKAP4シグナルに対するLRP6の関与は不明であった。本研究では、DKK1受容体におけるパルミチン酸化の制御機構およびシグナル活性制御における役割、DKK1-CKAP4シグナルとLRP6との関連について明らかにすることを目的とした。	
〔方法ならびに成績〕 1) 脾がん細胞株S2-CP8の細胞表面タンパクをショ糖密度勾配超遠心法で分画し、CKAP4が細胞膜において脂質ラフトに相当するdetergent-resistant membrane (DRM) に局在することを明らかにした。2) 内在性DKK1をknockoutしたS2-CP8細胞 (S2-CP8/DKK1 KO) を精製DKK1タンパクで刺激した後、細胞表面タンパクを分画した。CKAP4はDKK1刺激によってDRMからnon-DRMへ局在変化したのちエンドサイトーシスされた。3) S2-CP8細胞において内在性CKAP4をノックアウト (S2-CP8/CKAP4 KO) した細胞に対して野生型CKAP4あるいはCys ¹⁰⁰ をSerに置換した変異体を安定発現させた細胞 (S2-CP8/CKAP4 ^{WT} およびS2-CP8/CKAP4 ^{C100S}) を作製した。APEGs アッセイによって、CKAP4 ^{C100S} はパルミチン酸化されないこと、CKAP4 ^{WT} は内在性CKAP4と同様に細胞膜において約80%がパルミチン酸化された。さらに、DKK1刺激によって細胞膜CKAP4が約50%に脱パルミチン酸化された。4) 脱パルミチン酸化酵素APT1をノックダウンすることでDKK1刺激によるCKAP4脱パルミチン酸化、局在変化が阻害された。またCKAP4 ^{C100S} は全てがnon-DRMへ局在した。これらの結果から、CKAP4の脂質ラフトへの局在はパルミチン酸化依存性であること、CKAP4の脱パルミチン酸化はAPT1を介していることが示された。5) AKTの阻害剤で細胞を処理するとDKK1刺激によるCKAP4の脱パルミチン酸化が阻害された。さらに、AKT阻害剤で処理したS2-CP8/DKK1 KO細胞から精製したAPT1は <i>in vitro</i> でCKAP4に対する脱パルミチン酸化活性を示さなかった。これらの結果から、活性化AKTがAPT1を活性化すると考えられた。6) CKAP4の脱パルミチン酸化を阻害すると、DKK1刺激によるCKAP4のnon-DRMへの局在変化、エンドサイトーシスが阻害され、AKT活性化が遅延した。したがって脱パルミチン酸化によるCKAP4の脂質ラフトからの排除がDKK1-CKAP4シグナルのシャットオフに重要であることが示唆された。7) S2-CP8細胞においてLRP6についても1)～6)を確認した。LRP6の細胞膜上局在はCKAP4と同様の分子機構で制御された。8) 免疫沈降実験においてCKAP4 ^{WT} はDRMにおいてPI3Kと結合したが、CKAP4 ^{C100S} は結合しなかった。細胞増殖アッセイおよび皮下腫瘍モデルにおいてS2-CP8/CKAP4 KO細胞は対照細胞と比較し細胞増殖が抑制され、S2-CP8/CKAP4 ^{WT} 細胞では対照細胞と同等にレスキューされたが、S2-CP8/CKAP4 ^{C100S} 細胞ではレスキューされなかった。これらの結果から、CKAP4の脂質ラフトへの局在が細胞増殖活性に必要であることが示された。9) 免疫沈降実験にて、DKK1-CKAP4-LRP6が細胞表面で三者複合体を形成し、DKK1-CKAP4シグナルを増強していることが示された。	
〔総 括〕 本研究により、DKK1受容体CKAP4とLRP6が共通して、DKK1結合に伴うパルミチン酸化制御を介して脂質ラフトへの局在制御を受けていること、CKAP4の脂質ラフトへの局在が細胞増殖活性に必要であること、およびLRP6がDKK1-CKAP4経路を増強することが明らかとなった。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)			
佐田 遼太			
論文審査担当者	(職)	氏	名
	主 査	大阪大学教授	南 池 章
	副 査	大阪大学教授	金 井 好 克
	副 査	大阪大学教授	竹 田 潔
論文審査の結果の要旨			
II型膜タンパク質であるCKAP4は、細胞膜において分泌性タンパク質DKK1の受容体として機能し、DKK1-CKAP4シグナの活性化は、がん細胞の増殖を促進する。CKAP4はパルミチン酸化修飾されることが知られていたが、DKK1-CKAP4シグナルにおける意義は不明であった。本論文において申請者は、CKAP4及びもう一つのDKK1受容体であるLRP6が、共にパルミチン酸化依存性に脂質ラフトに局在することが、DKK1依存性のシグナル伝達に必要であることを初めて明らかにした。さらに、DKK1の結合によって両受容体が脱パルミチン酸化され脂質ラフトから非脂質ラフトに移動することにより、シグナル活性が制御される分子機構を明らかにした。リガンド結合に伴う受容体の脱パルミチン酸化を介したシグナル制御機構を分子レベルで解明した学術的新規性の高い業績であり、学位に値するものと認める。			