

## 主論文の要旨

# **The Daple-CK1 $\epsilon$ complex regulates Dvl2 phosphorylation and canonical Wnt signaling**

〔 Daple-CK1 $\epsilon$ 複合体が Dvl2 のリン酸化と  
古典的 Wnt シグナル経路を調節する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
発生・再生医学講座 分子病理学分野

(指導：榎本 篤 教授)

江崎 寛季

## 【緒言】

$\beta$ -catenin 活性を主とする古典的 Wnt シグナル経路は、細胞内の機能、細胞間コミュニケーション、胚発生、組織の恒常性、腫瘍の発生と進行等に関与している (Nusse., et al, *Cell*, 1992)。古典的 Wnt シグナル経路は、19 種類存在する Wnt のうち Wnt3a が 7 回膜貫通タンパク質の Frizzled と結合することで始まる。Wnt-Frizzled 複合体は細胞内に存在する足場タンパク質の Dishvelled 2 (Dvl2) を細胞膜にリクルートし、Dvl2 は Casein Kinase (CK) 1 $\epsilon$  といったキナーゼによってリン酸化される (Peters., et al, *Nature*, 1999)。リン酸化 Dvl2 は、 $\beta$ -catenin のリン酸化とユビキチン化を促進する Destruction complex (Axin、Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) と adenomatous polyposis col (APC) 等で構成される) の機能を阻害し、 $\beta$ -catenin が活性型の状態を維持する。しかし、CK1 $\epsilon$  による Dvl2 のリン酸化機構は未だに十分に理解されていない (Sharma., et al, *Cellular Sig*, 2018)。本研究では、Dvl2 の結合タンパク質の一つである、足場タンパク質の Daple (Dishvelled-associating protein with a high frequency of leucine residues) に着目することで、本課題を解決した。

Daple は Dvl2 の結合タンパク質として同定され (Oshita., et al, *Genes to Cells*, 2003)、特に、Daple の C 末端アミノ酸の Glycine-Cytosine-Valine (以下 : GCV) と Dvl2 が結合することが知られている (Ishida-Takagishi., et al, *Nat Commun*, 2012)。加えて、Daple が Dvl2 のリン酸化を促進することも示唆されている (Oshita., et al, *Genes to Cells*, 2003)。一方で、Daple による Dvl2 のリン酸化と関連するキナーゼと、Daple による Dvl2 のリン酸化部位の同定、加えて当該リン酸化 Dvl2 の機能は全く解明されていないかった。本研究では、生化学的実験手法を軸に、上記の問題解決に取り組んだ。

## 【方法】

細胞株はヒト胎児腎細胞 (Human Embryonic Kidney cells : HEK) 293 株を用いた。またタンパク質発現量の評価にはウェスタンブロッティング、 $\beta$ -catenin 活性の評価にはルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた。

## 【結果】

現在、Dvl2 の 143 番目の Serine (Ser143) と 224 番目の Threonine (Thr224) のリン酸化を認識する抗リン酸化 Dvl2 抗体のみ研究試薬として普及している。また、Dvl2 の Ser143 のリン酸化は古典的 Wnt シグナル経路を促進することが報告されている (He., et al, *Sci Rep*, 2016)。従って、本研究では、Daple と Dvl2 の Thr224 の関係性について着目した。

野生型 Daple の過剰発現では、Dvl2 (Thr224) のリン酸化が亢進したが、Dvl2 との結合に必須である GCV ドメインが欠損した変異型 Daple では当該 Dvl2 リン酸化が確認されなかった (Fig. 1A)。Dvl2 における Thr224 のリン酸化には CK1 $\epsilon$  が関わるということが報告されている (Lee., et al, *EMBO J*, 2012)。従って、Daple による Dvl2 (Thr224) のリン酸化が CK1 $\epsilon$  阻害剤の IC261 で抑制されるかどうか確認したところ、IC261 に

よって当該リン酸化が抑制されたことを確認した (Fig. 1B)。また、Daple と CK1 $\epsilon$  が結合することに加えて、GCV ドメインは Daple と CK1 $\epsilon$  の結合に関与しないことを明らかにした (Fig. 1C, D)。さらに、Daple のノックダウン (KD) を行うことで、Dvl2 と CK1 $\epsilon$  の結合が減少することも確認した (Fig. 1E)。これらのことから、Daple が異なるアミノ酸部位を介して CK1 $\epsilon$  と Dvl2 にそれぞれ結合し、CK1 $\epsilon$  を介した Dvl2 (Thr224) のリン酸化を亢進していることが示唆された。

次に、Dvl2 の Thr224 の機能解析を行った。Dvl2 の Thr224 を Alanine に置換した変異型 Dvl2 発現ベクターを作成し (Fig. 2A)、次に当該発現ベクターを HEK293 細胞株に遺伝子導入し、 $\beta$ -catenin 活性を評価した。その結果、野生型 Dvl2 と比較して変異型 Dvl2 で  $\beta$ -catenin 活性が有意に減少したことから、Dvl2 における Thr224 のリン酸化が  $\beta$ -catenin 活性に関わることがわかった (Fig. 2B, C)。さらに、野生型 Daple が過剰発現した HEK293 細胞株においても  $\beta$ -catenin 活性が上昇することや (Fig. 2D)、CK1 $\epsilon$  阻害剤の IC261 で当該  $\beta$ -catenin 活性が抑制されることも明らかにした (Fig. 2E)。これらのことから、Daple が調節する Dvl2 (Thr224) のリン酸化は  $\beta$ -catenin 活性を促進することが示唆された。

最後に、Daple-CK1 $\epsilon$  複合体が調節する Dvl2 (Thr224) のリン酸化の上流因子を決めることにした。上述の通り、Wnt3a は  $\beta$ -catenin 活性を促進する古典的 Wnt シグナル経路の最上流因子であり、Dvl2 における Thr224 のリン酸化が  $\beta$ -catenin 活性を促進することから、Wnt3a に着目した。Daple KD HEK293 細胞株と比較して野生型 HEK293 細胞株では、Wnt3a 刺激による Dvl2 における Thr224 のリン酸化とそれに続く  $\beta$ -catenin 活性が亢進されていることが分かった (Fig. 3A, B)。また、Wnt3a 刺激によって Daple が細胞膜にリクルートされ Dvl2 との結合を増強することが確認された (Fig. 3C, D)。以上から、Wnt3a が細胞膜上での Daple と Dvl2 との結合と、CK1 $\epsilon$  による Dvl2 (Thr224) のリン酸化によって、 $\beta$ -catenin 活性が亢進することを明らかにした (Fig. 4)。

## 【考察】

古典的 Wnt シグナル経路において、足場タンパク質が、CK1 による Dvl のリン酸化反応を調節することは殆ど知られておらず、本研究が非常に興味深い知見を示した。今後の課題は、Wnt3a 刺激がどのように Daple を細胞膜へリクルートするのか、その分子機構を明らかにすることである。

## 【結語】

本研究では、古典的 Wnt シグナル経路における Daple の機能を明らかにし、当該シグナル経路における新しい知見を見出した。