

熊本大学学術リポジトリ

Kumamoto University Repository System

Title	内在性チロシンリン酸化酵素による カテニンのリン酸化
Author(s)	富永, 純司
Citation	
Issue date	2008-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	http://hdl.handle.net/2298/11109
Right	

学 位 論 文

Doctor's Thesis

内在性チロシンリン酸化酵素による β カテニンのリン酸化
(Phosphorylation of β -catenin by endogenous tyrosine kinases)

富永 純司

Junji Tominaga

熊本大学大学院医学教育部博士課程生体医科学専攻初期発生学

指導教員

永渕 昭良 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程生体医科学専攻初期発生学

2008年3月

目次

要旨	1
発表論文リスト	2
謝辞	3
略語一覧	4
第1章 研究の背景と目的	5
第2章 実験方法	10
2-1 細胞培養と位相差像	
2-2 抗体	
2-3 発現ベクターとトランスフェクション	
2-4 ウェスタンブロット	
2-5 免疫沈降法	
2-6 細胞の分画	
2-7 細胞のトリプシン処理と細胞解離実験	
2-8 細胞免疫染色	
2-9 Wnt3a を含む調整培養液の採取	
2-10 レポーターアッセイ	
第3章 実験結果	14
3-1 F9 細胞における β カテニンのリン酸化	
3-2 β カテニンのリン酸化における α カテニンの関与	
3-3 β カテニンがリン酸化される細胞内画分	
3-4 BPD- α D 細胞の単離	
3-5 β カテニン欠失変異体を用いたチロシンリン酸化の検討	
3-6 リン酸化を受けるチロシン残基の同定	
3-7 α カテニン存在下におけるリン酸化チロシン残基の同定	
3-8 カドヘリン依存性細胞間接着における β カテニンチロシンリン酸化の影響	
3-9 α カテニン非存在下における β カテニン変異体の細胞内局在	
3-10 Wnt シグナルにおける β カテニンのチロシンリン酸化の影響	
3-11 Wnt シグナルにおける β カテニン N 末端領域の関与	
第4章 考察	34
4-1 β カテニンのチロシンリン酸化機構	

4-2 チロシンリン酸化が β カテニンの機能に与える影響	
4-2-1 細胞間接着の観点から	
4-2-2 Wnt シグナルの観点から	

第5章 結語 42
--------	----------

参考文献 43
------	----------

要旨

β カテニンのチロシンのリン酸化は、細胞内の β カテニンの機能に影響を与える可能性が報告されている。しかし、それらのほとんどが外的にリン酸化酵素を加えた研究であり、内在性のリン酸化酵素による β カテニンのリン酸化の関与はほとんど報告されていない。

今回、マウス奇形癌腫細胞であるF9細胞、およびF9細胞から α カテニン遺伝子を破壊した α D細胞、 β カテニン/プラログロビン遺伝子を破壊したBPD細胞、BPD細胞からさらに α カテニン遺伝子を破壊したBPD- α D細胞を用いて実験を行なった。まず、F9細胞を脱リン酸化酵素の阻害剤であるバナデイトで処理し、内在性のリン酸化酵素による β カテニンのチロシンリン酸化について検討を行った。その結果、F9細胞の β カテニンはリン酸化されていた。また、BPD細胞に β カテニンを発現させた細胞においても、 β カテニンのリン酸化が確認された。一方、 α カテニンが結合できない β カテニンを発現させたBPD細胞では、野生型 β カテニンと比べて強いリン酸化が確認された。このことは、 α D細胞やBPD- α D細胞に β カテニンを発現させた場合でも確認され、このことから、 β カテニンのリン酸化に α カテニンが関与している可能性が示唆された。続いて、リン酸化されるチロシン残基を同定するために、 β カテニン変異体を用いて研究を行った。その結果、F9派生細胞において、64番目および86番目のチロシンがリン酸化されることが示された。そこでこれらチロシン残基のリン酸化が、細胞間接着における β カテニンの機能に影響するののかについて検討した。その結果、今回同定されたチロシン残基のリン酸化は、 β カテニンの細胞間接着における基本的機能には影響を与えないことが示された。最後に、Wntシグナルにおける β カテニンの機能に、リン酸化が関与しているのかについて検討を行ったところ、リン酸化型変異体ではあまり変化が見られなかったが、そのチロシンを含む領域を欠失した β カテニンでは、転写活性が野生型 β カテニンと比べて減少することが示された。

発表論文リスト

①関連論文

Tominaga, J., Fukunaga, Y., Abelardo, E., and Nagafuchi, A.

Defining the function of β -catenin tyrosine phosphorylation in cadherin-mediated cell-cell adhesion

Genes to Cells 13: in press

謝辞

今回の研究を行うにあたって、熊本大学発生医学研究センター初期発生分野の皆様には大変お世話になりました。清水正幸博士には、実験手技や実験結果の捉え方など、研究の多くの場面で丁寧に教えていただきました。劉慧傑博士には、実験方法などでお世話になりました。福永剛隆博士、小宮智博士には実験手技以外にも、私生活における考え方など、研究室の先輩としていろいろと指導していただきました。アベラルド・エドガルド医師には、論文執筆や国際学会での発表の際に、語学的な面で大変お世話になりました。大園一隆医師には、研究や私生活の話をする中で和やかな雰囲気を作っていただき、楽しく研究活動を行うことができました。森川恵理香技師には、研究の多くの場面で技術支援をしていただきました。曲梶智子さんには、事務的な面で非常にお世話になりました。

この研究の一部は 21 世紀 COE プログラム「細胞系譜制御研究教育ユニットの構築」の支援を受けました。このプログラムの活動を通じて、発生医学研究センターを中心に多くの方々との出会い、研究において活発な議論を行えたことを感謝します。

博士課程進学にあたって、また 4 年間の在籍期間中において、両親や兄弟には精神面、経済面などで多くの応援をいただきました。心から感謝します。

これまで在籍した研究室の皆様には、学会等でお会いした際に、今回の研究についてさまざまなご意見をいただきました。また高校、大学時代の友達には、身に余るほどの期待をしていただき、落ち込んだときはいつも私に笑いを届けてくれ、今回の研究を行っていく上で、非常にお世話になりました。

最後になりましたが、永渕昭良教授には、研究の楽しさ、厳しさ、実験結果をどのように捉え、それをどのようにして人に伝えていくかなど、研究者として必要なことの多くを教えていただきました。また研究を離れた場所では、私生活におけるさまざまな悩みなどの相談を、快く聞いてくださいました。本当に感謝の気持ちでいっぱいです。ありがとうございました。

略語一覧

AJ: アドヘレンスジャンクション

α D: α カテニン欠損 F9 細胞

BPD: β カテニン/プラコグロビン欠損 F9 細胞

BPD- α D: α カテニン欠損 BPD 細胞

- ・アミノ酸の位置を示すために、アミノ酸の一文字表記と数字を用いた。例えば、30 番目のチロシンを示す場合、Y30 と表記した。
- ・点変異体を示す場合も同様の方法を用いた。例えば、30 番目のチロシンをグルタミン酸に置換した場合、Y30E と表記した。

第1章 研究の背景と目的

β カテニンは、カドヘリン・カテニン接着複合体を構成する分子の一つで、カドヘリン依存性細胞間接着において重要な機能を果たす。図1で示すように、 β カテニンが分子中央部に存在するアルマジロリピート領域を介してカドヘリンの細胞内領域と結合し、さらに、N末端領域で α カテニンとも結合することで、カドヘリン・カテニン接着複合体が形成される (Nagafuchi, 2001)。カドヘリンがこれらのカテニンを介してアクチン系細胞骨格に結合することが、カドヘリンに特徴的な強い接着には必要である。

β カテニンはカドヘリン・カテニン複合体において、カドヘリンと α カテニンを繋ぐリンカーとしての役割が、主要な役割として報告されている。実際に、 β カテニンが結合できないように細胞内領域を欠失させた変異型カドヘリンは、強い接着能を示すことができない。一方、この変異型カドヘリンに α カテニンを融合させた融合タンパク質は、 β カテニン非依存的な細胞間接着分子として機能することが知られている。しかし、この融合タンパク質が示す細胞間接着は、正常に形成されたカドヘリン・カテニン接着複合体による細胞間接着と違いが見られることも報告されている (Nagafuchi et al., 1994)。このことから β カテニンは、リンカーとしての役割以外に、この複合体の機能を調節する機能があることが考えられる。しかし、その分子機構についてはまだ良く分かっていない。

これまで内在性のチロシンリン酸化酵素が、接着関連因子のリン酸化に関与していることが報告されている。例えば、チロシンがリン酸化されたタンパク質は、さまざまな組織でアドヘレンスジャンクション (AJ、カドヘリン・カテニン複合体が存在する接着装置) に集積することが報告されている (Takata and Singer, 1988)。また、原ガン遺伝子でチロシンリン酸化酵素である *c-src* や *c-yes* は AJ に豊富に局在することも知られている (Tsukita et al., 1991)。さらに、脱リン酸化酵素の阻害剤であるバナデイトで処理した細胞では、接着関連因子のリン酸化が誘導され、AJ の分解が起こることが報告されている (Volberg et al., 1992)。

チロシンリン酸化酵素によるカドヘリン・カテニン接着複合体への影響についてもこれまでに報告がある。*v-src* チロシンリン酸化酵素を導入した細胞や RSV に感染させたニワトリのレンズの培養細胞では、外来性のチロシンリン酸化酵素によりカドヘリン依存的な細胞間接着の減少が見られ、AJ の分解や構造変換が起こることが知られている (Kellie, 1988; Volberg et al., 1991; Warren and Nelson, 1987)。 β カテニンのチロシンのリン酸化

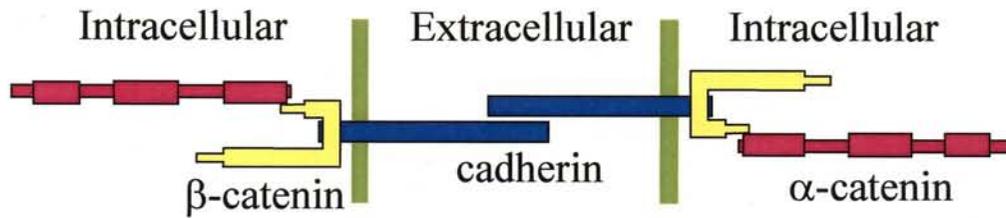
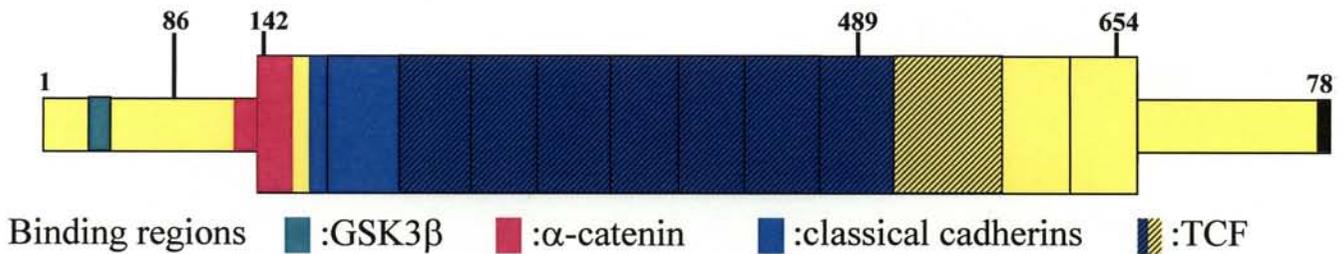


図1 カドヘリン・カテニン複合体

(A)



(B)

Phosphate site	Effects of phosphorylation	kinases
86	unknown	Src
142	Reduce binding to α-catenin	Fer, Fyn
489	Reduce binding to E-cadherin	Abl
654	Reduce binding to E-cadherin	EGFR

図2 βカテニン模式図

A. βカテニン結合タンパク質が結合するβカテニンの領域、およびリン酸化されると報告されているチロシン残基

B. それぞれのチロシン残基をリン酸化するチロシンリン酸化酵素と、リン酸化によるβカテニンの機能への影響

についても多くの研究がなされており、*v-src*を導入した細胞では、カドヘリン・カテニン接着複合体において β カテニンのチロシンが優先的にリン酸化され、リン酸化 β カテニンの増加はカドヘリンの接着機能を阻害することが報告されている (Behrens et al., 1993; Hamaguchi et al., 1993; Matsuyoshi et al., 1992)。さらに、バナデイトによる脱リン酸化酵素の機能阻害より β カテニンがリン酸化されることも知られており、 β カテニンのチロシンのリン酸化はカドヘリン・カテニン接着複合体、さらに AJ の形成に影響を与える可能性があると考えられている (Ozawa and Kemler, 1998)。

近年、リン酸化されることによってカドヘリン・カテニン接着複合体の形成に影響を与えると考えられる β カテニンのチロシン残基が同定されてきた。例えば、 β カテニンの α カテニン結合領域に存在する 142 番目のチロシン(Y142)は、Fer や Fyn といったチロシンリン酸化酵素によりリン酸化され、 α カテニンとの結合に影響を与えることが報告されている (Piedra et al., 2003)。489 番目のチロシン(Y489)はアルマジロリピートの 9 番目に存在し、Abl によってリン酸化される。このチロシン残基のリン酸化はカドヘリンとの結合に影響を与えると考えられている (Rhee et al., 2007; Rhee et al., 2002)。また、12 番目のアルマジロリピートに存在する 654 番目のチロシン(Y654)は、EGFR、Src によってリン酸化され、カドヘリンと β カテニンの結合を弱めることが報告されている (Roura et al., 1999)。他にもリン酸化による影響は分かっていないが、86 番目のチロシンは Src によってリン酸化されることが言われている (Roura et al., 1999)。このように β カテニンは、さまざまなチロシンリン酸化酵素によりチロシン残基がリン酸化されていると考えられている (図 2A,B 参照)。加えて、Y142 や Y654 をグルタミン酸にアミノ酸置換した、いわゆるリン酸化型変異 β カテニンは、それぞれ α カテニン、E-カドヘリンとの結合が弱くなることが報告されている。一方、フェニルアラニンに置換した非リン酸化型 β カテニンは、 β カテニンの機能に影響を与えないことが報告されている (Piedra et al., 2003; Roura et al., 1999)。これらのことから、さまざまなリン酸化酵素が β カテニンのチロシンのリン酸化を介して、カドヘリン依存性細胞間接着に影響を与えていることが強く示唆されている。

β カテニンは細胞間接着因子としての機能以外に、Wnt シグナル経路における転写調節因子としての機能も有する。通常、カドヘリンと結合できずに細胞質に存在する β カテニンは、APC、Axin、GSK3 β 、CKI とともに、複合体を形成する。複合体を形成した β カテニンは CKI、GSK3 β によって N 末端領域に存在するセリン/スレオニンがリン酸化され、このリン酸化を引き金としてポリユビキチン化が起こり、最終的にはプロテアソーム分解

系により分解されてしまう (Aberle et al., 1997; Behrens et al., 1998; Ikeda et al., 1998; Kishida et al., 1998; Liu et al., 2002)。しかし細胞が Wnt の刺激を受けると、 β カテニンのリン酸化とそれに引き続く分解が抑制され、細胞内に β カテニンが集積、最終的には核内において LEF/TCF とともに転写調節因子として機能する (Behrens et al., 1996; Huber et al., 1996; Molenaar et al., 1996)。

これまで細胞質内の β カテニンの調節には、上述したセリン/スレオニンのリン酸化が重要であると考えられてきたが、近年チロシンのリン酸化もその機能に関与している可能性が考えられてきた。例えば Y489 がリン酸化した β カテニンは、核内への集積が見られ、LEF/TCF 依存的な転写活性が上昇することが報告されている (Rhee et al., 2007)。Y489 のリン酸化はカドヘリンと β カテニンの結合を弱めることが報告されている。そのため、このチロシン残基のリン酸化は、接着調節因子としての β カテニンから転写調節因子としての β カテニンへの機能の変換の可能性が考えられている。

このように β カテニンのチロシンのリン酸化は、 β カテニンの細胞内における機能にさまざまな影響を与えていると考えられている。しかし、これらの研究にはいくつかの問題点もある。最大の問題点は、これまでの研究で行われてきたバナデイトによる細胞の処理や、外来性リン酸化酵素の発現では、 β カテニン以外の多くの分子も同様にリン酸化され、それらが細胞内の機能に影響を与えている可能性があることである。実際に外来性のリン酸化酵素による接着因子のリン酸化は、 β カテニン非依存的なカドヘリン依存性細胞間接着の機能低下を引き起こすことが報告されている (Takeda et al., 1995)。また、これまで述べてきたチロシン残基をリン酸化する内在性のリン酸化酵素については、Y489 をリン酸化する Abl 以外まだ確かめられていない。さらに、実験で用いる細胞のほとんどは内在性に野生型 β カテニンを発現している。そのため β カテニンのリン酸化変異体のみの機能を調べることは非常に困難であり、リン酸化の影響を完全に把握することができない。

近年 Fukunaga らは、遺伝子ターゲティング技術を用いて、マウス奇形癌腫細胞である F9 細胞から、 β カテニン/プラコグロビン両遺伝子を欠失させた細胞である BPD 細胞の単離に成功した (Fukunaga et al., 2005)。F9 細胞はカドヘリン・カテニン接着複合体を構成する全てのタンパク質を発現し、強い細胞間接着活性を示す。実際に、マウス E-カドヘリンの cDNA 全長はこの細胞の cDNA ライブラリーから単離されている (Nagafuchi et al., 1987)。一方 BPD 細胞では、そのカドヘリン依存性細胞間接着に特徴的な強い接着が起こらない。さらに Fukunaga らは、この BPD 細胞に野生型 β カテニンを再び導入することで、

F9細胞と同様の接着活性を回復することを証明した。そのため、BPD細胞にさまざまなβカテニン変異体を導入することにより、変異体が細胞に与える影響を明確に調べることができる。実際に Y142 をグルタミン酸に置換したβカテニン(Y142E)を導入した細胞では、αカテニンがβカテニンに結合できないことにより、細胞間接着が弱くなる現象が確認されている(福永, 学位論文)。すなわち BPD細胞は、生きた細胞でβカテニンの機能を見るために非常に有用な細胞であると考えられる。

今回、BPD細胞にさまざまなβカテニンの変異体を導入することによって、内在性のリン酸化酵素によるβカテニンのリン酸化について検討を行った。またαカテニンを発現しないF9細胞(αD細胞)、およびαカテニンを発現しないBPD細胞(BPD-αD細胞)を用いることにより、βカテニンのリン酸化とαカテニンとの関与について検討した。その結果、F9細胞で発現するβカテニンは、内在性のリン酸化酵素によりリン酸化されていることが示された。またF9派生細胞でリン酸化されるβカテニンのチロシン残基は、これまで報告があったY142、Y654ではなく、Y64およびY86であることが示された。さらに、これらのチロシンのリン酸化はカドヘリン依存性細胞間接着の基本的機能に影響を与えなかったが、Wntシグナルの制御に関与する可能性が示唆された。

第2章 実験方法

2-1 細胞培養と位相差像

マウス繊維芽 L 細胞 (Earle, 1943)、マウス奇形癌腫 F9 細胞 (Sherman and Miller, 1978)、及びその派生細胞は、Dulbecco's 変法 Eagle's 培地 (D-MEM, GIBCO BRL) に非動化ウシ血清 (FBS, BIOSOURCE) を 10% 加えた培養液を用いて培養を行った。F9 細胞、及びその派生細胞の培養に用いた培養皿とカバーガラスはあらかじめ 0.2%ゼラチンで 15 分間コーティングをしたものを用いた。細胞の位相差顕微鏡画像は、デジタルカメラ (Coolpix 990, Nikon) 付き顕微鏡 (ECLIPSE TS100, Nikon) を用いて撮影した。

2-2 抗体

免疫沈降、及び細胞免疫染色とウエスタンブロットの一次抗体として、ラット抗マウス E-カドヘリン抗体 (ECCD-2 (Shirayoshi et al., 1986))、ラット抗マウス α カテニン抗体 (α -18 (Nagafuchi and Tsukita, 1994))、マウス抗 β カテニン抗体 (BD Bioscience)、マウス抗リン酸化チロシン抗体 (PY20, BD Bioscience)、ウサギ抗 eEF2 抗体 (Cell Signaling) を用いた。また細胞免疫染色の二次抗体として FITC 結合ロバ抗ラット IgG、Cy3 結合ロバ抗マウス IgG (共に Jackson Immunoresearch, West Grove, PA)、ウエスタンブロットの二次抗体として、HRP 結合ヤギ抗マウス IgG (R&D Systems)、HRP 結合ロバ抗ウサギ IgG (GE Healthcare) を用いた。

2-3 発現ベクターとトランスフェクション

β カテニン全長を発現する発現ベクターとして pCAG- β ABCD を用いた (Shimizu et al., 2007)。また GFP 発現ベクターとして pCAG-NGFP (Matsuda et al., 2004)、 β カテニンの α カテニン結合領域を含む N 末端領域を GFP に置換した Δ N を発現するベクターとして、pCAG- β -G-BCD (福永, 学位論文) を用いた。さらに β カテニン点変異分子 Y30F、Y64E、Y64F、Y86E、Y86F、Y64/86E、Y64/86F を発現させるために、QuickChange 部位特異的突然変異生成キット (Stratagene) を用いて、発現ベクター pCAG-Y30F、pCAG-Y64E、pCAG-Y64F、pCAG-Y86E、pCAG-Y86F、pCAG-Y64/86E、pCAG-Y64/86F を設計した。全ての変異体は pCAG- β ABCD を鋳型にし、それぞれの点変異を含んだプライマーを用いて Pfu ポリメラーゼによる PCR を行った。Y30F の生成にはプライマー 5'-GCAGCAGCAG

TCTTTCTTGGATTCTGGAA-3'を、Y64E、Y64F の生成にはそれぞれプライマー5'-CTCCC AAGTCCTTGAGGAATGGGAGCAAG-3'、5'-CTCCCAAGTCCTTTTTGAATGGGAGCAA G-3'を、Y86E、Y86F の生成にはそれぞれプライマー5'-TATTGACGGGCAGGAGGCAATG ACTAGGG-3'、5'-TATTGACGGGCAGTTTGCAATGACTAGGG-3'を用いた。太字は置換部を示す。増幅後、生成産物を DpnI で処理し、鋳型 DNA を除去した。変異部位を含む KpnI-XbaI 領域の配列を確認した後、各々の KpnI-XbaI 断片を元の pCAG-βABCD の KpnI-XbaI 部位に挿入して作成した。pCAG-Y64/86E、pCAG-Y64/86F は pCAG-Y64E、pCAG-Y64F を鋳型に、Y86E、Y86F の生成で用いたプライマーを用いて、同様に作成した。pCAG-CSK は pCSK-N1 (大阪大学微生物病研究所発癌制御 名田茂之博士より供与 (Matsuoka et al., 2004))から CSK 遺伝子を含む KpnI-SaII 断片を pCAG ベクターに組み込んで作製した。

発現ベクターは Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)を用いて細胞に導入した。安定に発現する細胞株を得るために、細胞は 400μg/ml の G418 存在下で 2 週間培養した。その後、少なくとも 3 つのクローンを単離し、その中から共通の性質を示すクローンを一つ選んで、接着における影響を解析した。

2-4 ウェスタンブロット

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)とウェスタンブロットは以前記載された方法で行った (Imamura et al., 1999)。サンプルは SDS サンプルバッファーで溶解し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離した。ウェスタンブロットを行うために、分離したタンパク質はゲルからニトロセルロース膜に電気泳動を用いて移し、一次抗体と反応させた。その後、GE healthcare biotin-streptavidin キットをメーカーの説明書通りに用いて、抗体を検出した。レポーターアッセイで用いたサンプルは同様にして一次抗体と反応させたあと、HRP が結合した二次抗体を一次抗体と結合させ、ECL Advance によって発光検出器 (LumiVision PRO, AISIN)を装備した LumiViewer 130 を用いて検出した。明るさとコントラストは Adobe Photoshop CS を用いて調整した。

2-5 免疫沈降法

βカテニンのリン酸化チロシンが脱リン酸化されることを防ぐために、初めに 9cm の培養皿で培養した細胞を、脱リン酸化酵素の阻害剤であるパナデイト(pervanadate;1mM

sodium orthovanadate, 0.01% H₂O₂)で20分間処理した。その後1mlの抽出液(1% NP-40, 1mM CaCl₂, 1mM NaF, 10mM Na₄P₂O₇, 2mM Pefabloc SC Plus (Roche), 10 µg/ml leupeptin 10µg/ml aprotinin をマグネシウム不含 HEPES 緩衝生理食塩水に溶解)で細胞を溶解し、15,000rpm、20分間遠心後、上清を細胞抽出液として用いた。得られた細胞抽出液は、50µlのビーズを3回加え、非特異的にビーズと結合するタンパク質を除き、抗体を加えて30分間反応させた。その後20µlのビーズを加え、抗体とビーズを結合させた。E-カドヘリンの免疫沈降では抗ラット IgG ビーズ (American Qualex)を、βカテニンの免疫沈降では Protein G セファロースビーズ (GE Healthcare)を用いた。抗体を吸着させたビーズは大量の抽出液で洗浄し、SDS サンプルバッファーに懸濁し、SDS-PAGE のサンプルを作成した。

2-6 細胞の分画

細胞を細胞質分画と膜骨格分画に分画するために、9cm の培養皿で培養した細胞をチューブに回収し、80µlのタンパク質分解酵素阻害剤(2mM Pefabloc SC Plus (Roche), 10 µg/ml leupeptin 10µg/ml aprotinin)に懸濁した。チューブごと液体窒素で凍結、融解することで、細胞膜を破壊した。1500g、10分間遠心し、上清を細胞質分画、沈殿物を膜骨格分画とした。それぞれの分画に1mlの抽出液を加え懸濁したあと、膜骨格分画は1500rpm、20分間遠心し、上清を膜骨格分画抽出液として用いた(図5-A参照)。

2-7 細胞のトリプシン処理と細胞解離実験

細胞は Takeichi (1977)に記載されたように、2種類の異なった方法でトリプシン処理を行った。簡潔に述べると、細胞を1mM CaCl₂の存在下(TC処理)、または1mM EDTAの存在下(TE処理)で0.01%のトリプシンで処理した。一般的に、カドヘリンはTC処理を行っても変化がないのに対し、TE処理を行うと分解される。細胞解離実験は細胞を密に培養し、TC処理、TE処理を行った後、10回ピペッティングして細胞を解離させた (Nagafuchi et al., 1994)。細胞解離実験は細胞解離指数 N_{TC}/N_{TE} で定量化した(N_{TC} はTC処理後の総粒子の数、 N_{TE} はTE処理後の総粒子数の数を示す)。

2-8 細胞免疫染色

細胞免疫染色に用いた細胞は、15mm 径のカバーガラスに培養し、3.7%ホルマリンによって固定した。その後報告されているように一次抗体、二次抗体と反応させ、プレパラートを作製した。包埋するにあたって、蛍光色素の退色を防ぐために Slowfade Gold antifade reagent (Invitrogen)を用いた。画像は CCD カメラつき顕微鏡 (Axioskop 2; Carl Zeiss, Inc.)を装備した Axio Vision 4.4 を用いて撮影した。明るさ、コントラスト、カラーバランスは Adobe Photoshop CS を用いて調整した。

2-9 Wnt-3a を含む調整培養液の採取

Wnt-3a を含む調整培養液を得るために、Wnt-3a を発現する L 細胞を 9cm の培養皿一枚につき 10^6 個まき、3 日間培養した。その後、培養液を新しい培養液に交換し 24 時間培養、培養液を調整培養液として用いた。なお、同様にして Wnt-3a を発現しない L 細胞からも調整培養液を得、ネガティブコントロールとして用いた。

2-10 レポーターアッセイ

β カテニン変異体の転写因子としての機能検討するために、BPD 細胞に、 $0.5\mu\text{g}$ の β カテニン変異体発現ベクター、 $0.5\mu\text{g}$ の pTOPflash、2ng の pCMV-renilla レポーターベクターを Lipofectamine™ 2000 を用いて導入した。5 時間後培養液を交換し、その後 15 時間培養を行った。ルシフェラーゼの活性は Dual Luciferase Assay System (Promega)をメーカーの説明書通りに用いて、lumiphotometer によって測定した。GFP 発現ベクター及び野生型 β カテニン発現ベクターは、それぞれネガティブコントロール、ポジティブコントロールとして用いた。

β カテニン変異体の Wnt-3a に対する反応性を調べるために、変異体を安定に発現する BPD 細胞に $0.5\mu\text{g}$ pTOPflash、2ng pCMV-renilla 発現ベクターを導入し 5 時間培養後、培養液を Wnt-3a を含む調整培養液に交換し、15 時間培養を行った。その後同様にしてルシフェラーゼの活性を測定した。 β カテニンを発現しない BPD 細胞および野生型 β カテニンを発現する BPD 細胞を、それぞれネガティブコントロール、ポジティブコントロールとして用いた。さらに、シグナル非存在下における β カテニンの転写活性を確認するために、全変異体発現細胞において、Wnt-3a を含まない調整培養液を用いて同様の実験を行ない、シグナル存在下での活性と比較した。

第3章 実験結果

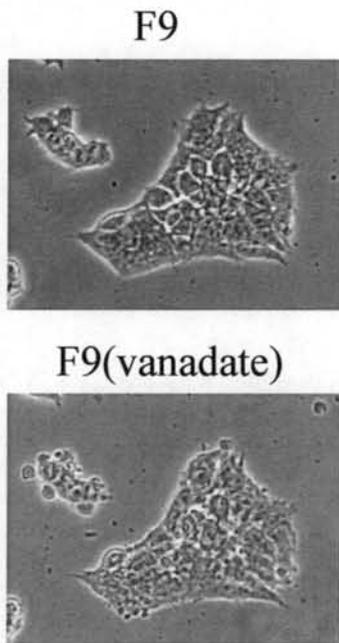
3-1 F9 細胞における β カテニンのリン酸化

細胞内における β カテニンのリン酸化を検討するにあたって、まず F9 細胞において β カテニンがリン酸化されているのかについて検討を行った。F9 細胞から得られた細胞抽出液を用いて、リン酸化チロシンに対する抗体(PY20)でウエスタンブロットを行ったところ、リン酸化チロシンを持つタンパク質は検出されなかった (図 3-B)。そこで、脱リン酸化酵素の阻害剤であるバナデイトで細胞を処理した。バナデイト処理することによって細胞の形態に変化が起きるのかについて確認したところ、F9 細胞は処理する前と同様の形態を示した (図 3-A)。そこでこの F9 細胞から細胞抽出液を採取し、ウエスタンブロットを行ったところ、バナデイト処理した細胞からは多くのリン酸化タンパク質が検出された (図 3-B)。さらにこの細胞抽出液を β カテニンに対する抗体で免疫沈降を行い、リン酸化チロシンに対する抗体でウエスタンブロットを行ったところ、リン酸化した β カテニンが検出された。バナデイトで処理されない細胞ではリン酸化 β カテニンが検出されなかったことから、 β カテニンは通常、チロシンリン酸化酵素によってリン酸化されているが、脱リン酸化酵素により速やかに脱リン酸化されている可能性が示唆された。ただ β カテニンをリン酸化する酵素が、通常脱リン酸化されることにより不活性化している可能性も考えられる。以後、リン酸化 β カテニンを検出する実験は、バナデイト処理後に行った。

3-2 β カテニンのリン酸化における α カテニンの関与

これまでの報告として、Y142 がリン酸化された β カテニンは、 α カテニンとの結合が阻害されることが示されている (Piedra et al., 2003)。また Y142 をリン酸化と同様にマイナスの電荷を持つグルタミン酸に置換すると、この変異を持つ β カテニンは α カテニンとの結合が弱まり、細胞間接着活性が弱くなることが、福永により報告されている (福永, 学位論文)。一方、Y654 がリン酸化された β カテニンは、カドヘリンとの結合が阻害されることが報告されている (Roura et al., 1999)。しかし Y654 をグルタミン酸に置換した β カテニンを発現する BPD 細胞は、正常な細胞間接着活性を回復することが福永により示されている (図 4-A)。F9 細胞においてリン酸化されている β カテニンのチロシンの候補として、Y142、Y654 が考えられたので、この 2 つのチロシンのリン酸化について検討を行った。野生型 β カテニン、Y142F、Y142E、Y654E を発現する BPD 細胞をバナデイトで処理し、

(A)



(B)

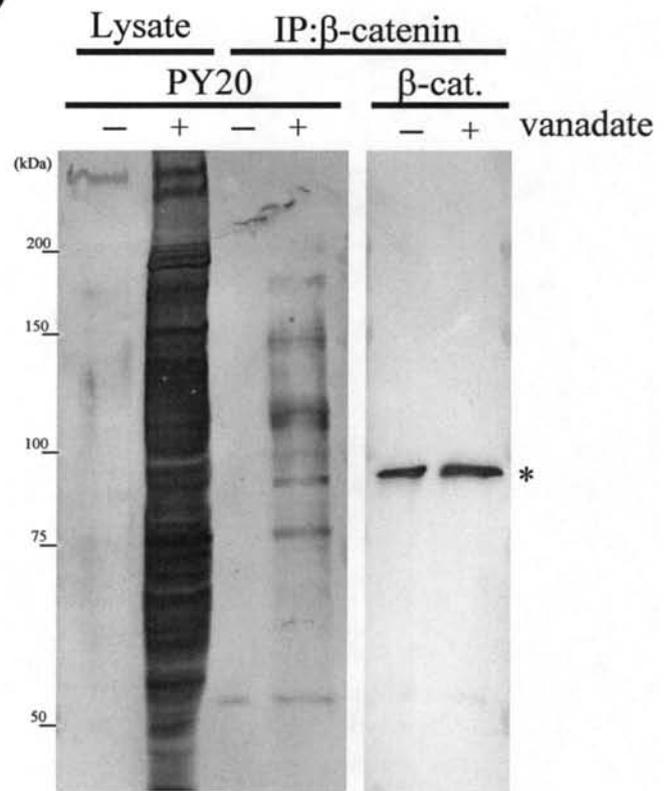


図3 F9細胞におけるβカテニンのリン酸化

- A. F9細胞、および20分間バナデイトで処理したF9細胞の形態
20分間バナデイトで処理してもF9細胞の形態に大きな変化は見られなかった。
- B. リン酸化βカテニンの確認
F9細胞をバナデイトで処理することにより、多くのリン酸化タンパク質が検出された。
βカテニンの抗体で免疫沈降を行うと、リン酸化βカテニンが確認された。
アスタリスク(*)はβカテニンの位置を示す。

β カテニンに対する抗体で免疫沈降を行った (図 4-B)。E-カドヘリン、 β カテニン、 α カテニン、リン酸化チロシンに対する抗体でウエスタンブロットを行ったところ、報告通り Y142E において β カテニンと α カテニンの結合が減少していることが示された。また、Y654E において β カテニンと E-カドヘリンとの結合の減少も確認された。このとき β カテニンのリン酸化は全ての β カテニン変異体において確認され、このことから、 β カテニンは 142,654 番目以外に別のチロシンがリン酸化されることが示唆された。さらに、Y142E は他の β カテニンと比べて効率よくリン酸化されており、このことから、 β カテニンのリン酸化を α カテニンが阻害している可能性が考えられた。

β カテニンのチロシンのリン酸化を α カテニンが阻害することについてより詳細に解析するために、 α カテニンを発現しない F9 細胞である α D 細胞 (Maeno et al., 1999) を用いて、 β カテニンのリン酸化を検討した (図 4-C)。F9、 α D 細胞をそれぞれバナデイトで処理し、得られた細胞抽出液を β カテニンに対する抗体で免疫沈降を行った。E-カドヘリン、 β カテニン、 α カテニン、リン酸化チロシンに対する抗体でウエスタンブロットを行ったところ、 β カテニンと共沈してきた E-カドヘリンの量には違いが見られなかった。また α D 細胞では、以前の報告どおり α カテニンは検出されなかった。このとき β カテニンのチロシンのリン酸化を確認したところ、予想通り F9 細胞に比べて、 α D 細胞で発現する β カテニンは効率よくリン酸化されていることが示された。図 3-B に比べて図 4-C では、F9 細胞における β カテニンのリン酸化を示すバンドが薄く見えるが、これは検出時間を短縮した結果であり、検出時間を延ばした場合でも同様に、 α D 細胞の方が効率よく β カテニンがリン酸化されていた。また α カテニン非存在下においては、その生理機能は不明であるが、E-カドヘリンもリン酸化されていた。以上のことから、 α カテニンを発現していない細胞、もしくは α カテニンが結合できない β カテニンを発現する細胞では、 β カテニンおよび E-カドヘリンが効率よくリン酸化されることが示された。また F9 細胞においては、 β カテニンと E-カドヘリンのリン酸化は、お互いの結合には影響を与えないことが示された。

3-3 β カテニンがリン酸化される細胞内画分

β カテニンが細胞内のどの画分においてリン酸化されるのかを調べるために、 α D 細胞を細胞質画分(核画分を含む)と細胞膜画分に分けた (図 5-A)。分画した細胞抽出液を β カテニンに対する抗体で免疫沈降を行い、E-カドヘリン、 β カテニン、リン酸化チロシンに対する抗体でウエスタンブロットを行った。その結果、 β カテニン蛋白の量が画分間で差が見

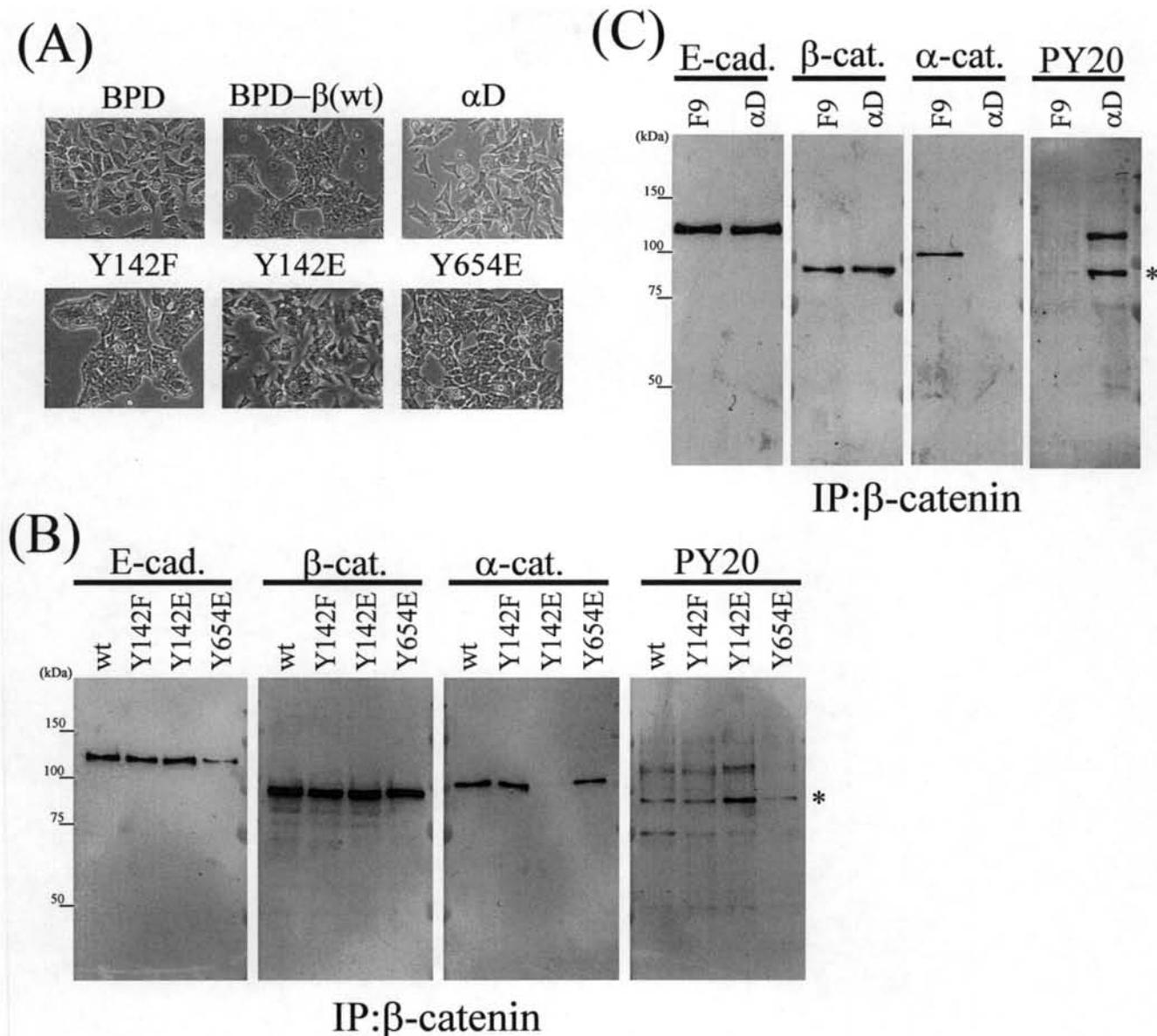


図4 β カテニンのリン酸化における α カテニンの関与

A. β カテニン変異体を導入したBPD細胞の形態

BPD: β カテニン/プラログロビン欠損F9細胞、BPD- β (wt): β カテニンを導入したBPD細胞

α D: α カテニン欠損F9細胞、Y142F、Y142E、Y654E: β カテニン点変異体を導入したBPD細胞

数字はチロシン残基が存在するアミノ酸の番号、F、Eは置換したアミノ酸を示す(F;フェニルアラニン、E;グルタミン酸)。

Fukunagaの報告どおり、Y142Eは細胞間接着が回復できなかった。

B. α カテニンの結合の有無における β カテニンのリン酸化

それぞれの細胞の抽出液を β カテニンに対する抗体で免疫沈降を行った。

Y142Eはwtと比べて、効率よくリン酸化された。

アスタリスク(*)は β カテニンの位置を示す。

C. α カテニンの有無における β カテニンのリン酸化

F9細胞、 α D細胞の抽出液を β カテニンに対する抗体で免疫沈降を行った。

α D細胞ではF9細胞と比べて、 β カテニンの強いリン酸化が確認された。

アスタリスク(*)は β カテニンの位置を示す。

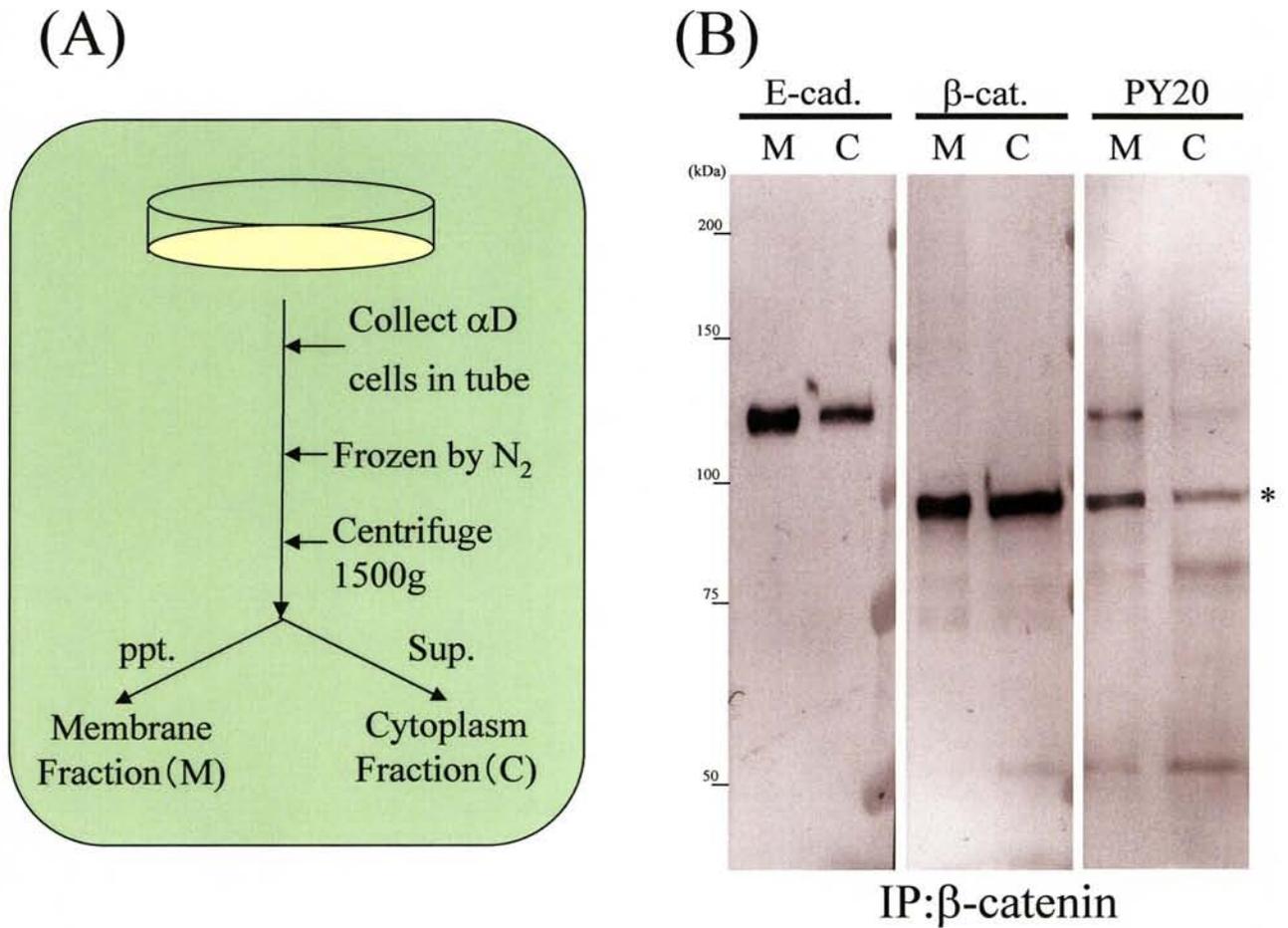


図5 β カテニンがリン酸化される細胞内画分

A. 細胞抽出液分画方法

B. それぞれの画分における β カテニンのリン酸化
 それぞれの画分を β カテニンに対する抗体で免疫沈降を行った。
 細胞膜画分(M)に存在する β カテニンがリン酸化されていた。
 アスタリスク(*)は β カテニンの位置を示す。

られたので、蛋白量を揃えてウエスタンブロットを行った (図 5-B)。その結果、 β カテニン蛋白の量が揃っている状態でも、明らかに細胞膜画分に多くのリン酸化 β カテニンが存在していた。また、細胞膜画分と細胞質画分のリン酸化 β カテニン蛋白の量の比は、カドヘリン蛋白の量の比と似ていたことから、カドヘリンと結合した β カテニンがリン酸化されている可能性が考えられた。

3-4 BPD- α D 細胞の単離

β カテニンのチロシンのリン酸化に α カテニンがどのように影響してくるのかについてより詳細に調べるために、 α カテニン欠損 BPD 細胞(BPD- α D 細胞)を、ジーンターゲティング法を用いて作製した。 α カテニンの欠損に用いたターゲティングベクターおよびジーンターゲティング法に関しては以前報告がある通りに行なった (Maeno et al., 1999)。まず 1 つ目のアリルを破壊するために、エレクトロポレーションによりベクターを導入し、G418 で選別を行った。その結果 72 クロンのうち 1 つのクロンで、 α カテニン遺伝子のアリル 1 つが破壊されていた。その後高濃度の G418 で選別を行い、2 つ目のアリルの破壊を試みた。その結果、36 クロン中 4 つのクロンで両方のアリルが破壊されていた。またこれらの細胞では、正常な α カテニン蛋白質が消失していた。続いて Cre-pac の系 (Taniguchi et al., 1998)を用いて G418 薬剤耐性カセットを除去し、その中から 1 つのクロン(クロン 5)を単離し、通常用いる BPD- α D 細胞として以後の実験に用いた (図 6-A)。

まず BPD 細胞に β カテニンを導入した BPD- β 、BPD- α D 細胞、および BPD- α D 細胞に β カテニンを導入した BPD- α D- β におけるカドヘリンとカテニンの発現を検討した (図 6-B)。それぞれの細胞から得られた細胞抽出液を E-カドヘリン、 β カテニン、 α カテニンに対する抗体でウエスタンブロットを行った。その結果、BPD- α D 細胞では β カテニン、 α カテニンの両方の発現がなく、BPD- α D- β では α カテニンの発現はなくなっていたが、 β カテニンは発現していた。続いて、BPD- α D- β で発現している α カテニンが、 α D 細胞で発現している β カテニンと同様に効率よくリン酸化されるのかについて検討を行った。BPD- β 、BPD- α D- β から得られた細胞抽出液を β カテニンに対する抗体で免疫沈降し、E-カドヘリン、 β カテニン、 α カテニン、リン酸化チロシンに対する抗体でウエスタンブロットを行った (図 6-C)。その結果、両細胞ともほぼ同量の E-カドヘリン、 β カテニンが検出された。 α カテニンは BPD- β から回収されたサンプルにおいてのみ検出された。リン酸化 β カテニンは、BPD- α D- β のほうがより多く検出された。このことから BPD- α D 細胞は、

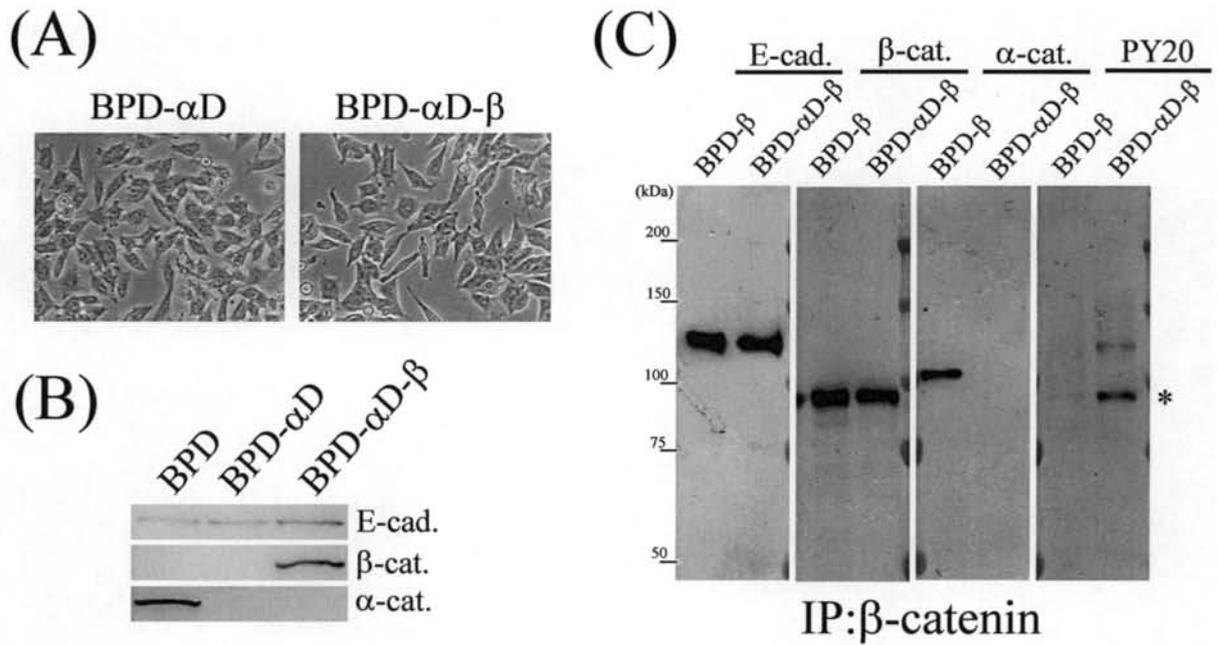


図6 BPD-αD細胞の単離

A. 単離したBPD-αD細胞、およびβカテニンを導入したBPD-αD細胞の形態
BPD-αD細胞は野生型βカテニンを導入しても、接着活性が回復しない。

B. それぞれの細胞で発現するタンパク質
BPD-αD細胞ではβカテニン、αカテニンの両方のタンパク質が発現しない。

C. BPD-β細胞、BPD-αD-β細胞におけるβカテニンのリン酸化の比較
それぞれの細胞抽出液をβカテニンに対する抗体で免疫沈降を行った。
αカテニンを発現していないBPD-αD-β細胞は、予想通りαカテニンを発現しているBPD-β細胞と比べてβカテニンが効率よくリン酸化される。
アスタリスク(*)はβカテニンの位置を示す。

この細胞にさまざまな変異型 β カテニンを発現させることによって、この分子のチロシンリン酸化の機構を明らかにするために利用できることが示された。

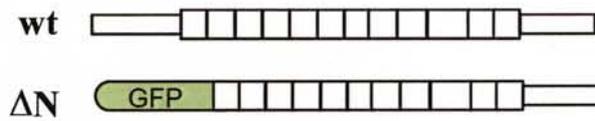
3-5 β カテニン欠失変異体を用いたチロシンリン酸化の検討

α カテニンが β カテニンのリン酸化に関係していることから、 α カテニン結合領域の近傍に存在するチロシンがリン酸化されている可能性が考えられた。そこでまず、 α カテニン結合領域を含む N 末端領域を欠失した β カテニン(Δ N)を用いて、リン酸化を検討した (図 7-A)。野生型 β カテニン、 Δ N を安定に発現する BPD- α D 細胞から得られた細胞抽出液を、 β カテニンに対する抗体で免疫沈降し、E-カドヘリン、 β カテニン、リン酸化チロシンに対する抗体でウェスタンブロットを行った (図 7-B)。その結果、E-カドヘリン、 β カテニンともにほぼ同量のタンパク質が検出された。ちなみに、 Δ N は欠失させた N 末端領域の代わりに GFP が β カテニンの N 末端領域に組み込まれているため、野生型 β カテニンとほぼ同じ分子量(約 92kDa)になる。 β カテニンのリン酸化を比較したところ、野生型 β カテニンはこれまで述べてきたようにリン酸化チロシンに対する抗体によって強く認識されたが、一方で Δ N は全く認識されなかった。このことから、リン酸化されるチロシンは β カテニンの N 末端領域に存在する、もしくは N 末端領域にリン酸化酵素が相互作用することで、 β カテニンのリン酸化が行われていることが分かった。

3-6 リン酸化を受けるチロシン残基の同定

N 末端領域に存在するチロシンを別のアミノ酸に置換し、これらのチロシン残基がリン酸化されるかについて検討を行った。 Δ N で欠失した領域には 142 番目のチロシンを含む 4 つのチロシンが存在する (図 8-A)。そこで、30 番、64 番、86 番目のチロシンをそれぞれリン酸化されないフェニルアラニンに置換した β カテニン(Y30F、Y64F、Y86F)を発現させるためのプラスミドを作製した。これらの発現ベクターを BPD- α D 細胞に導入して、変異型 β カテニンを安定に発現する細胞を単離した。野生型 β カテニンと 142 番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した β カテニン(Y142F)を発現する BPD- α D 細胞、および単離した細胞から得られた細胞抽出液を E-カドヘリンに対する抗体で免疫沈降を行い、E-カドヘリン、 β カテニン、リン酸化チロシンに対する抗体でウェスタンブロットを行った (図 8-B)。その結果、 β カテニン変異体を発現する細胞から得られたサンプルの全てにおいて、ほぼ同量の E-カドヘリン、 β カテニンが検出された。またリン酸化 β カテニンを確認した

(A)



(B)

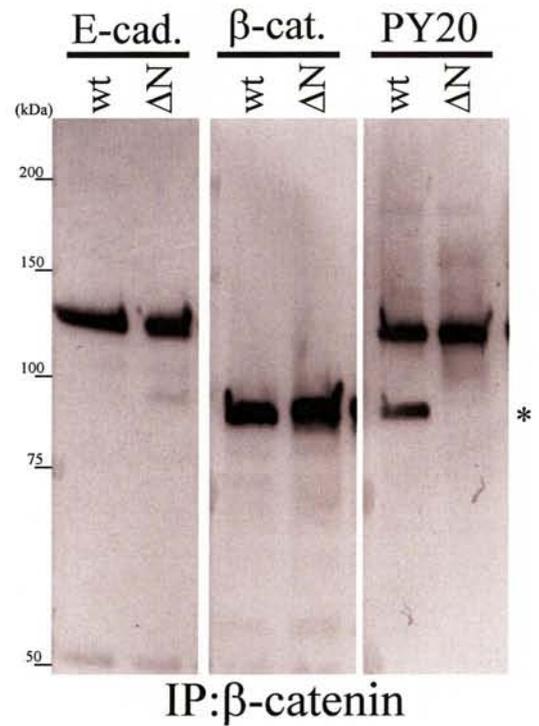


図7 βカテニン欠失変異体を用いたチロシンリン酸化の検討

A. 欠失変異体の模式図

ΔNはβカテニンのN末端領域を欠失している。

B. βカテニン欠失変異体のリン酸化

wtもしくは、ΔNを導入した細胞の抽出液を、βカテニンに対する抗体で免疫沈降を行った。

ΔNは発現しているにもかかわらず、リン酸化されなかった。

アスタリスク(*)はβカテニンの位置を示す。

ところ、Y30F および Y142F は野生型 β カテニンと同様のリン酸化 β カテニンが検出されたが、Y64F および Y86F では明らかなリン酸化の減少が見られた。このことから、 α カテニンを発現しない F9 派生細胞において Y64 および Y86 がリン酸化されることが示唆された。さらにそのことを確かめるため、Y64、Y86 の両チロシンをフェニルアラニンに置換した β カテニン(Y64/86F) を発現させるためのプラスミドを作製した。これまでと同様に BPD- α D 細胞に導入し、リン酸化を確認したところ、この β カテニン変異体は全くリン酸化されなかった。このことから、 α カテニン非存在下における F9 派生細胞において、Y64 および Y86 が主にリン酸化されるチロシン残基であることが示された。

86 番目のチロシンは以前の報告により、Src によるリン酸化が言われている。そこで Y64、Y86 のリン酸化に Src が関係しているかについて検討を行った。まず Src-family kinase の機能を阻害する C-terminal Src kinase(CSK)を発現させるためのプラスミドを作製し、それを α D 細胞に導入して安定に発現するクローンを単離した。 α D 細胞および CSK を発現する α D 細胞から細胞抽出液を取り、 β カテニンに対する抗体で免疫沈降を行った。その後、E-カドヘリン、 β カテニン、CSK、リン酸化チロシンに対する抗体でウエスタンを行ったところ、両方の細胞においてほぼ同量の E-カドヘリン、 β カテニンが検出された (図 9)。また CSK は、導入した細胞のほうが明らかに多く発現していたが、 β カテニンとの共沈は見られなかった。このときのチロシンのリン酸化を見たところ、CSK の導入による影響は見られなかった。このことから、今回同定された Y64、Y86 のリン酸化には、Src-family kinase は関与していない可能性が示唆された。

3-7 α カテニン存在下におけるリン酸化チロシン残基の同定

β カテニンは F9 細胞、BPD- β において、若干ではあるがチロシンがリン酸化される。そこで、 α カテニン存在下においてリン酸化される β カテニンのチロシンを同定することにした。まずこれまでと同様に、BPD 細胞に Y30F、Y64F、Y86F、Y64/86F を発現させるためのプラスミドを導入し、安定に発現する細胞を単離した。それぞれの細胞から得られた細胞抽出液を E-カドヘリンに対する抗体で免疫沈降し、E-カドヘリン、 β カテニン、リン酸化チロシンに対する抗体でウエスタンブロットを行った (図 10)。その結果、全ての β カテニン変異体において、ほぼ同量の E-カドヘリン、 β カテニンが検出された。またリン酸化 β カテニンを確認したところ、Y30F、Y142F とともに Y86F においても野生型 β カテニンと同様にリン酸化が行われていた。Y64F は α カテニン非存在下のときと同様にリン酸

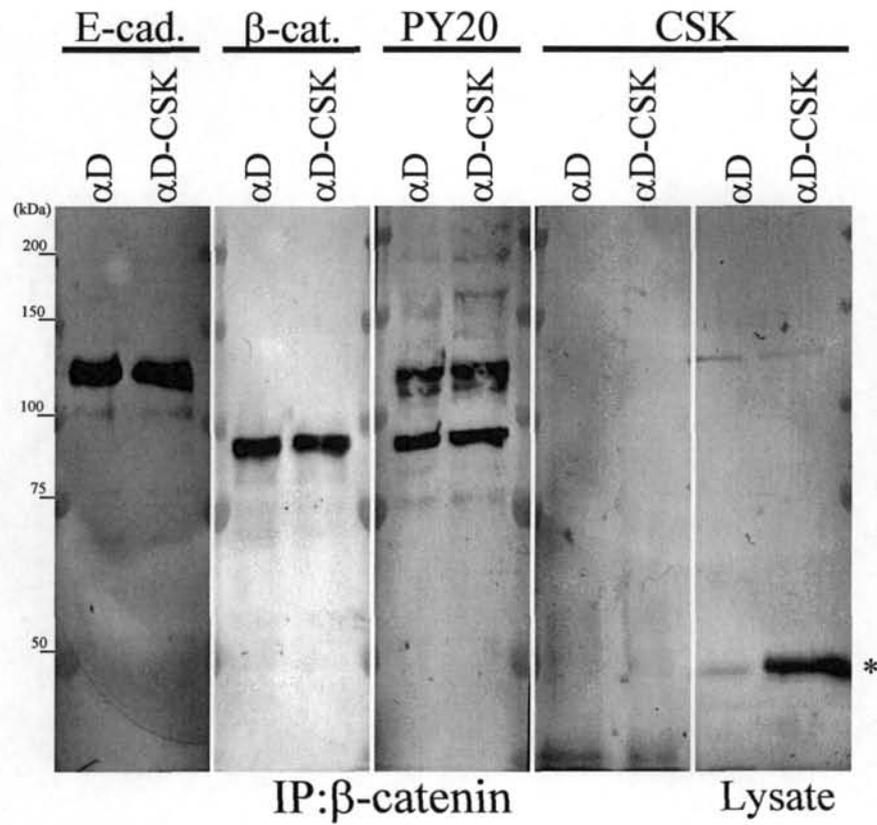


図9 CSKを用いたリン酸化酵素の同定

αD細胞にCSKを発現させ、βカテニンのリン酸化を検討した。
 CSKの発現にかかわらず、αD細胞でβカテニンのリン酸化が確認された。
 アスタリスク(*)はCSKの位置を示す。

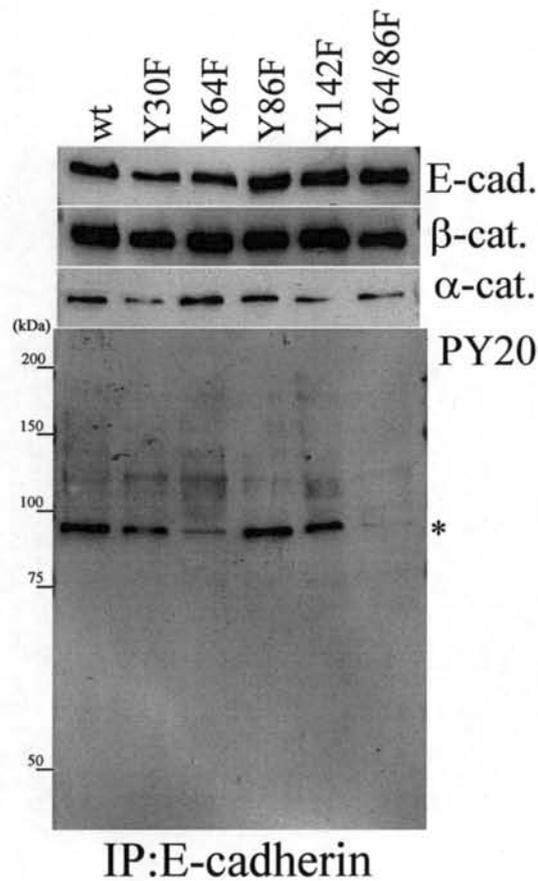


図10 α カテニン存在下におけるリン酸化チロシン残基の同定

BPD細胞に β カテニン点変異体を導入し、 β カテニンのリン酸化を検討した。
 Y64Fはwtと比べてあまりリン酸化されなかった。一方、Y86Fはwtと同じくらいリン酸化された。
 Y64/86Fでは、ほとんどリン酸化されなかった。
 アスタリスク(*)は β カテニンの位置を示す。

化の減少が見られ、さらに Y64/86F では全くリン酸化されなかった。このことから、 α カテニン存在下における F9 派生細胞においては、Y86 のリン酸化はあまり顕著ではなく、Y64 が主にリン酸化されていることが示された。

3-8 カドヘリン依存性細胞間接着における β カテニンチロシンリン酸化の影響

F9 細胞およびその派生細胞では、Y64 と Y86 がリン酸化されることが分かったので、次にこのリン酸化がカドヘリン依存性細胞間接着の調節に関与しているのかについて検討を行った。まず、Y64、Y86 およびその両方のチロシンをグルタミン酸に置換した β カテニンを発現させるためのプラスミドを作製した。チロシンがグルタミン酸に置換されることによって、チロシン残基の位置にマイナスの電荷を持たせることができるので、一般的にこの変異体はリン酸化型 β カテニン、フェニルアラニンに置換した β カテニン変異体は非リン酸化型 β カテニンとして用いられている。

初めに、BPD 細胞にリン酸化型 β カテニンを発現させるためのプラスミドを導入し、安定に β カテニン変異体を発現する細胞を単離した。その結果、変異体を導入した細胞の全てで、F9 細胞に特徴的な強い細胞間接着を表す細胞形態を示した (図 11-A)。そこでカドヘリン・カテニン複合体形成能を有するかどうかについて、野生型 β カテニン、非リン酸化型 β カテニン、リン酸化型 β カテニンを発現する BPD 細胞からそれぞれ細胞抽出液を取り、E-カドヘリンに対する抗体で免疫沈降を行った。E-カドヘリン、 β カテニン、 α カテニンに対する抗体でウェスタンブロットを行ったところ、 β カテニン変異体を発現する全ての細胞のサンプルにおいて、野生型 β カテニンとほぼ同量の E-カドヘリン、 β カテニン、 α カテニンが検出された (図 11-B)。次に、これらの細胞に対して細胞解離実験を行い、接着活性に影響があるかどうかを確かめたところ、 β カテニン変異体を発現する全ての細胞が、野生型 β カテニンを発現する細胞とほぼ同等の接着活性を示すことがわかった (図 11-C)。さらに、これらの細胞を E-カドヘリン、 β カテニンに対する抗体を用いて細胞免疫染色を行ったところ、全ての細胞で細胞接着面に E-カドヘリン、 β カテニンの局在が見られた (図 11-D)。以上のことから、Y64 および Y86 のリン酸化は、E-カドヘリンに依存した細胞間接着の基本活性には影響を与えないことが示された。

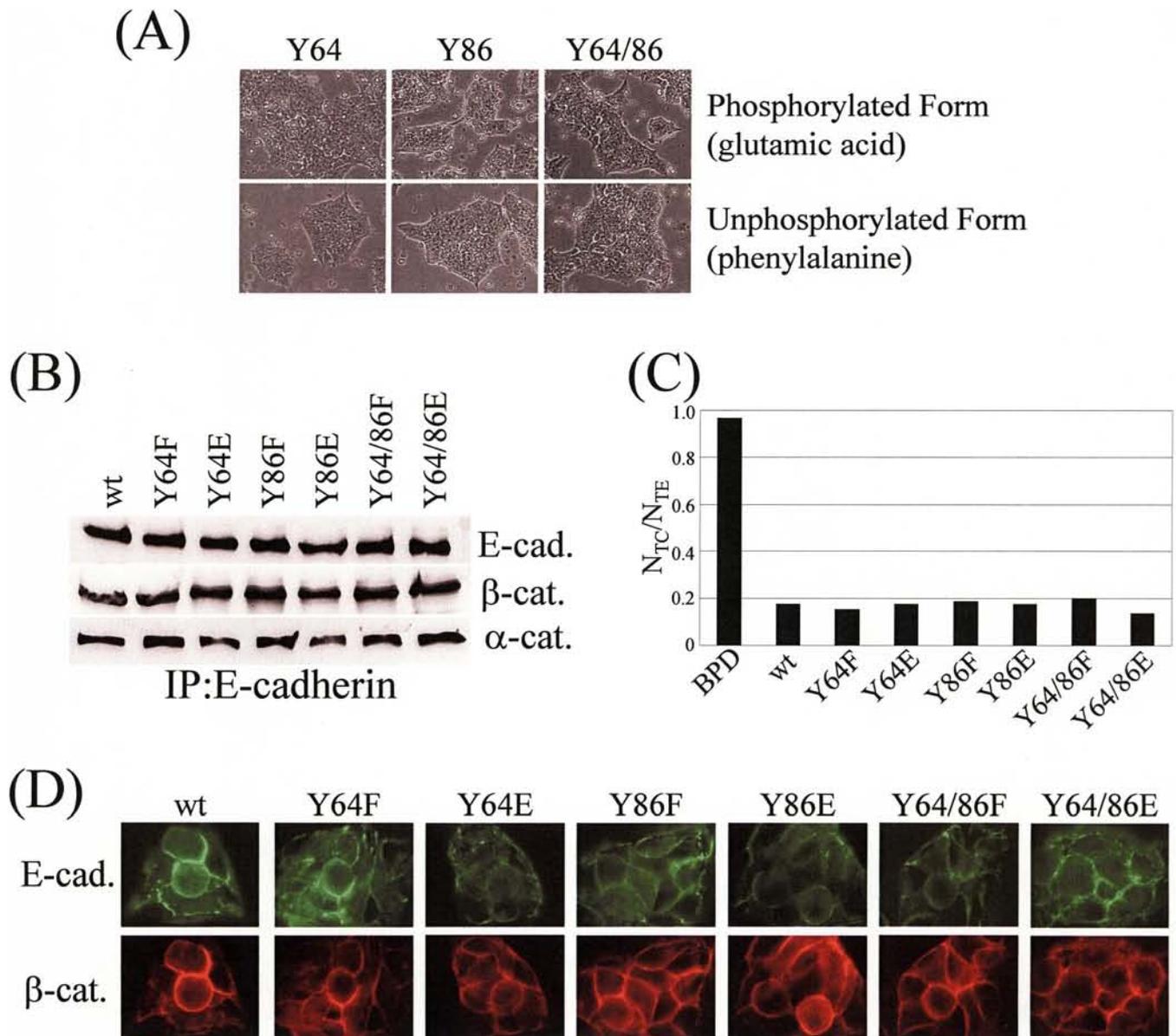


図11 カドヘリン依存性細胞間接着における
βカテニンチロシンリン酸化の影響

- A. βカテニン点変異体を導入したBPD細胞の形態
全ての変異体において、F9細胞に特徴的な強い細胞間接着の形態を示した。
- B. カドヘリン・カテニン複合体の形成
それぞれの変異体導入細胞から得られた細胞抽出液をE-カドヘリンに対する抗体で免疫沈降を行った。
全てのβカテニン変異体がE-カドヘリン、αカテニンとともにカドヘリン・カテニン複合体を形成する。
- C. 細胞間接着活性の変化
細胞間接着活性に変化がないか調べるために、細胞解離実験を行なった。
全てのβカテニン変異体導入細胞で、野生型βカテニンを導入した細胞と同様の細胞間接着活性を示した。
- D. 細胞内局在の変化
細胞免疫染色法を用いて、βカテニンの局在を確認した。
全てのβカテニン変異体が、細胞境界面に強い局在を見せ、E-カドヘリンと共局在した。

3-9 α カテニン非存在下における β カテニン変異体の細胞内局在

Y86 のリン酸化は α カテニン非存在下で効率よく起こることから、 α カテニン非存在下においてリン酸化の影響が見られるのではないかと考え、 α カテニン非存在下における β カテニンの細胞内局在について検討を行った。まず BPD- α D- β 細胞をバナデイトで処理し、 β カテニンの局在を調べた (図 12)。その結果、バナデイトで処理しなかった細胞と比べ、処理した細胞は細胞質内の β カテニンの量が減少し、細胞接着面と細胞内の一部の領域に鮮明な局在を示すことが確認された。またこれらの β カテニンは、E-カドヘリンと局在を共にしていた。そこで、Y64/86F を同様にバナデイトで処理することで局在に変化が起こるのかについて検討を行った。その結果、 β カテニンのリン酸化が起こらない Y64/86F においても同様の局在変化が確認された。このことから、バナデイト処理により β カテニンの局在は変化するが、この変化は β カテニンのチロシンのリン酸化とは異なった原因によるものと考えられた。

3-10 Wnt シグナルにおける β カテニンのチロシンリン酸化の影響

今回同定されたチロシンのリン酸化は、細胞間接着の基本活性には影響を与えなかったため、次に LEF/TCF に依存した転写活性に β カテニンのリン酸化が影響を与えるのかについて検討を行った。まず初めに、BPD 細胞に β カテニンおよびその変異体を一過性に発現させ、転写活性への影響を調べた。発現量を確認したところ、変異体間で差は見られなかった (図 13-A)。F9 細胞およびその派生細胞では、 β カテニンのほとんどは E-カドヘリンと結合する。そのためシグナルに用いられる β カテニンは、E-カドヘリンと結合できなかった β カテニンである。しかし強発現の系では、シグナルにおいて用いられる β カテニンの量は、細胞全体の β カテニンの量と比例すると考えられる。GFP および野生型 β カテニンをそれぞれネガティブおよびポジティブコントロールとして用いて、変異体の転写活性を検討した (図 13-A)。その結果、全ての変異体が野生型 β カテニンと同様、もしくはそれ以上の転写活性を示した。特に Y64/86F は野生型の β カテニンと比べて約 3.5 倍の活性の上昇がみられた。このことから、変異体は転写因子として機能することが示された。

Wnt 刺激に対する β カテニンの反応性は、 β カテニンを一過性に細胞内で発現させた場合と必ずしも一致しないことが Shimizu らの報告により示されている (Shimizu et al., 2007)。そこで、 β カテニンのチロシンがリン酸化されることによって、Wnt に対する反応性に影響が出るのかについて確認するために、変異体を安定に発現する BPD 細胞を用いて検

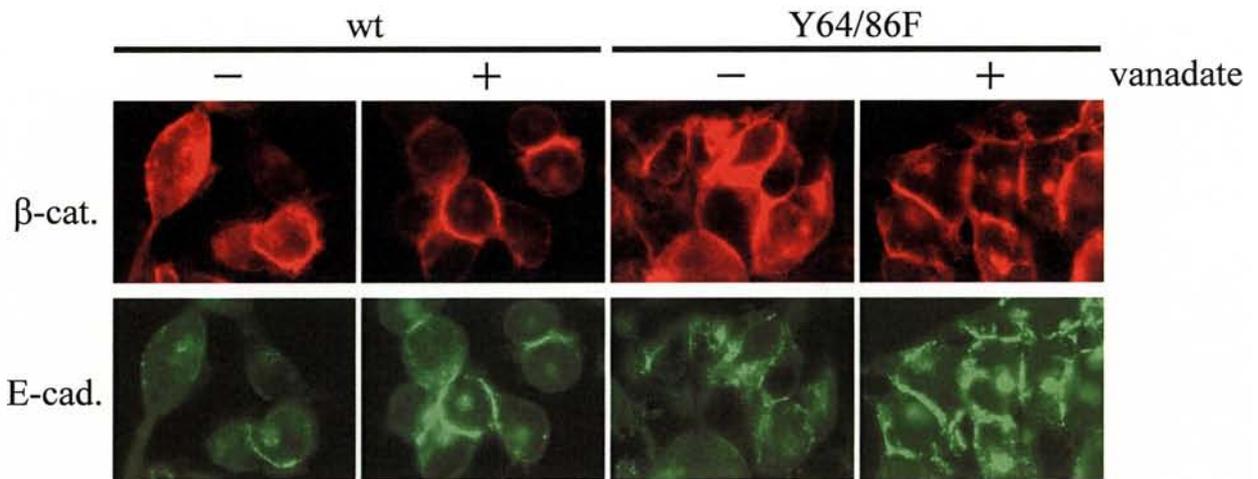


図12 α カテニン非存在下における β カテニン変異体の細胞内局在

β カテニンのチロシンがリン酸化することで、BPD- α D細胞で発現させた β カテニンの局在が変化することについて検討した。

BPD- α D- β 細胞(wt)をバナデイトで処理することによって、細胞境界面に β カテニンが多く局在してきた。BPD- α D-Y64/86F細胞 (β カテニンはリン酸化されない)をバナデイトで処理したときも同様に、細胞境界面で多くの β カテニンが局在する像が確認された。

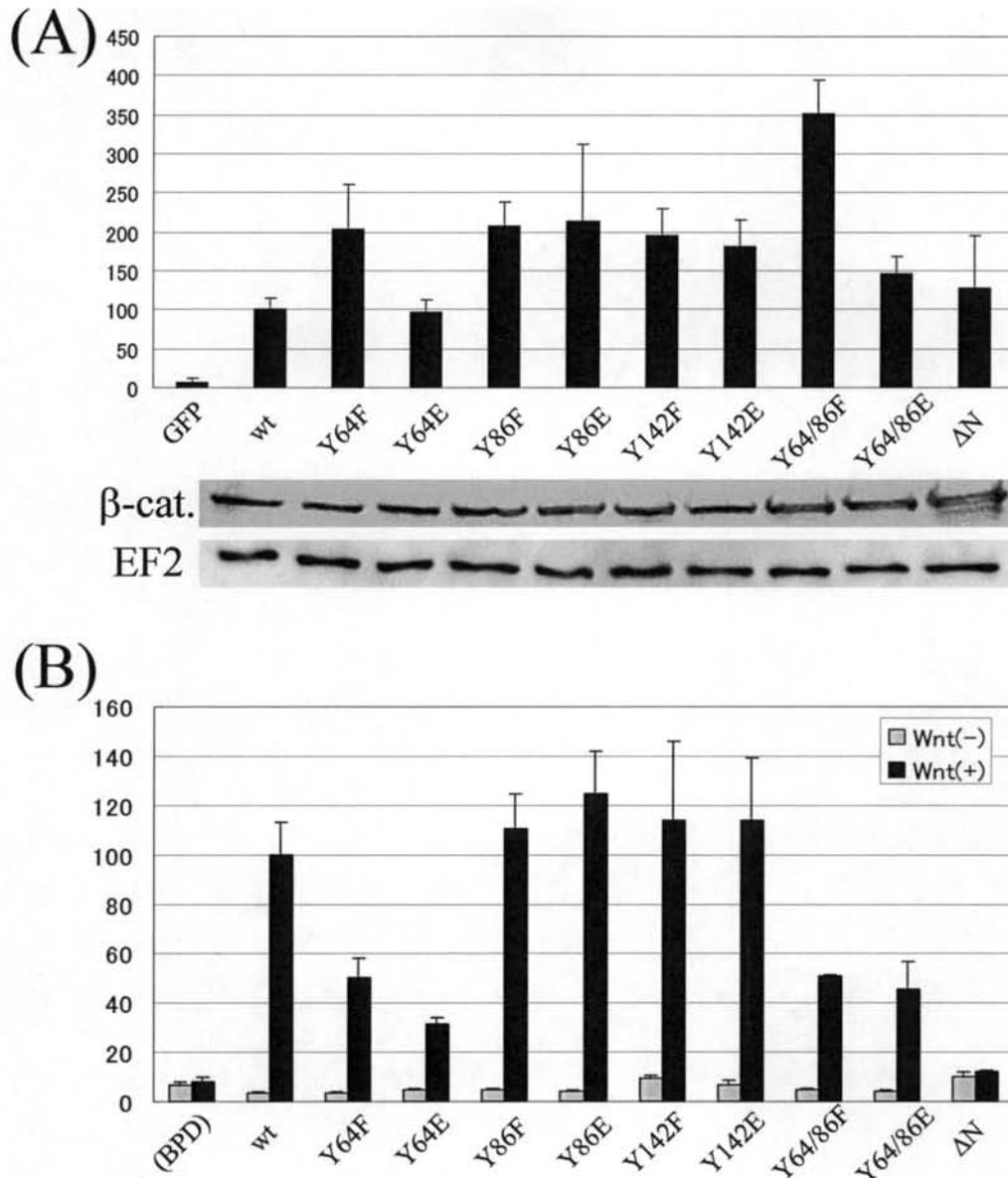


図13 Wntシグナルにおけるβカテニンのチロシンリン酸化の影響

- A. BPD細胞にβカテニンを一過性に発現させたときの転写活性
 TOP-Lucを用いたレポーターアッセイにより、βカテニン点変異体を一過性に発現させたときの転写活性について検討した。
 全ての変異体において、野生型と同様、もしくはそれ以上の転写活性を示した。ΔNも野生型と同様の転写活性を示した。
 発現しているβカテニンは、どの変異体でもほぼ同量であった。
- B. βカテニンを安定に発現するBPD細胞の転写活性
 βカテニンを安定に発現するBPD細胞を用いて、Wnt存在下、非存在下における転写活性を、レポーターアッセイにより検討した。
 Y64に変異を加えたβカテニンを発現する細胞では、野生型βカテニンを発現する細胞と比べて、転写活性の減少が見られた。
 ΔNはWntを添加しても、転写活性の増加が見られなかった。

討を行った。BPD 細胞、および野生型 β カテニンを発現する BPD 細胞をそれぞれネガティブおよびポジティブコントロールとして用いて、変異体の転写活性について検討した (図 13-B)。Wnt 非添加状態において、全ての変異体導入細胞で野生型 β カテニンと比較して転写活性の上昇は見られなかった。一方 Wnt 添加状態においては、Y86 のみに変異を加えた β カテニンを発現する細胞で、野生型 β カテニンと同様の転写活性が見られたものの、Y64 に変異を加えた β カテニンを発現する細胞では、野生型 β カテニンと比較して転写活性の減少が見られた。このことから、Y64 が Wnt シグナル系においてなんらかの影響を与える可能性が考えられた。ただ Y64 をフェニルアラニン、グルタミン酸に置換した β カテニンを発現する両方の細胞で活性が下がることから、リン酸化の影響ではない可能性が考えられた。しかし今回の研究では、同じ変異体発現細胞であってもクローンによって転写活性に差が見られ、Y86、Y142 の変異体でも、野生型 β カテニンと比較して転写活性の減少が確認された。このことから、 β カテニンの N 末端領域が Wnt シグナルにおける転写活性の上昇に影響を与える可能性が考えられた。

3-11 Wnt シグナルにおける β カテニン N 末端領域の関与

N 末端領域に存在するチロシンに変異を加えた β カテニンが、Wnt シグナルにおける転写活性の上昇に影響を与える可能性が考えられたので、N 末端領域欠損 β カテニン(Δ N)を用いて Wnt シグナルにおける β カテニン N 末端領域の関与について検討を行った。まず BPD 細胞に Δ N を一過性に発現させ、転写活性への影響を調べた。発現量を確認したところ、野生型 β カテニンと同等の発現量を示した (図 13-A)。GFP および野生型 β カテニンをそれぞれネガティブおよびポジティブコントロールとして用い、変異体の転写活性を調べた。その結果、 Δ N を発現させたときの転写活性は、野生型 β カテニンと比較してほぼ同等の活性を示した。このことから、転写因子としての機能に β カテニンの N 末端領域は必要でないということが示された。つづいて、 Δ N を安定に発現する BPD 細胞を用いて、Wnt シグナルに対する反応性について検討した。BPD 細胞および野生型 β カテニンを安定に発現する BPD 細胞をそれぞれネガティブおよびポジティブコントロールとして用い、変異体の転写活性について検討した (図 13-B)。その結果、 Δ N を導入した細胞は Wnt 刺激に反応せず、刺激を行っていない細胞と比べて転写活性の上昇が見られなかった。クローニングによる影響が考えられたので、5つのクローンについて確認したが、全てのクローンで同様の結果が得られた。このことから、 β カテニンの N 末端領域が Wnt 刺激による β カテニンの

活性化に必要である可能性が考えられた。

第4章 考察

この論文において、 β カテニン/プラコグロビン両遺伝子欠損 F9 細胞(BPD 細胞)にさまざまな β カテニン変異体を発現させることにより、内在性のチロシンリン酸化酵素による β カテニンのリン酸化を検討した。さらに、 α カテニン遺伝子欠損 F9 細胞、 α カテニン遺伝子欠損 BPD 細胞を用いることで、 β カテニンのリン酸化に対する α カテニンの関与について調べた。最後に、 β カテニンのチロシン残基が内在性リン酸化酵素によりリン酸化されることで、 β カテニンの機能がどのような影響を受けるのかについて、細胞間接着および Wnt シグナルの両方の観点から検討を行った。以下、 β カテニンのチロシンリン酸化機構、およびチロシンリン酸化が β カテニンの機能に与える影響について議論を進める。

4-1 β カテニンのチロシンリン酸化機構

今回、外来性ではなく、内在性の酵素による β カテニンのチロシンのリン酸化について検討した。脱リン酸化酵素の阻害剤であるバナデイトを用いることによって、用いない場合では確認されなかった β カテニンのチロシンリン酸化が確認された。この機構としては、大きく分けて2つの可能性が考えられる。1つは、 β カテニンが常に内在性のリン酸化酵素によりリン酸化され、同時に脱リン酸化されている可能性である。この場合、細胞をバナデイトで処理することで、 β カテニンの脱リン酸化が防がれるので、リン酸化された β カテニンが確認される。もうひとつの可能性は、 β カテニンをリン酸化する酵素が脱リン酸化により不活性化されており、通常の細胞では β カテニンがリン酸化されていない場合である。このときは、バナデイトによりまず β カテニンのリン酸化酵素の脱リン酸化が防がれ、その結果活性化した酵素が β カテニンをリン酸化することが可能になる。今回の実験結果から、どちらの方法で β カテニンのチロシンがリン酸化されるのかについては分からない。ただ少なくとも通常の F9 細胞において、 β カテニンのリン酸化は、リン酸化酵素だけでなく、脱リン酸化酵素によっても調節されていることが示された。これまでも β カテニンの機能にチロシンリン酸化酵素や脱リン酸化酵素が関与していることが報告されてきた (Behrens et al., 1993; Hamaguchi et al., 1993; Matsuyoshi et al., 1992; van Buul et al., 2005; Wadham et al., 2003; Yan et al., 2006)。しかしほとんどの報告において、リン酸化酵素や脱リン酸化酵素は β カテニン以外の分子にも働いていることが考えられる。 β カテニンのチロシンのリン酸化が β カテニンの機能に与える影響を詳細に調べるためには、

BPD 細胞のような β カテニンが発現しない細胞と β カテニンの変異体を用いることが必要である。

β カテニンのチロシンのリン酸化の研究において、これまでに報告があったリン酸化チロシンは、Y86、Y142、Y489、Y654 であった (Piedra et al., 2003; Rhee et al., 2007; Roura et al., 1999)。しかし、今回の F9 細胞を用いた研究において同定されたチロシン残基は、Y64、Y86 であった。これまで Y86 と Y654 は Src によって、Y142 は Fer や Fyn といったチロシンリン酸化酵素によってリン酸化されることが報告されていた (Piedra et al., 2003; Roura et al., 1999)。一方、Y64 をリン酸化する酵素に関してはまだ同定されていない。また興味深いことに、今回同定された Y64 と Y86 は、ショウジョウバエにおける β カテニンのホモログである Armadillo において保存されていない (図 8-A 参照)。すなわちこれらのチロシンのリン酸化は、哺乳類に特異的なリン酸化機構により行われている可能性が考えられる。一方、外来性の E-カドヘリンを発現させた白血病細胞をバナデイトで処理すると、 β カテニンのチロシンのリン酸化、および β カテニンと α カテニンの結合が減少することが報告されている (Ozawa and Kemler, 1998)。これまでの報告から考えると、この現象には Y142 のリン酸化が関与している可能性が十分に考えられる。このように、バナデイト処理によってリン酸化される β カテニンのチロシン残基は、細胞やリン酸化の刺激を受ける細胞周辺の環境によって異なるのではないかと予想される。

今回、 α カテニンを発現しない細胞で β カテニンが効率よくリン酸化されることが分かった。さらに、 α カテニンとの結合が阻害される Y142E を用いた研究により、細胞質に α カテニンが存在する場合であっても、 α カテニンが結合できない β カテニンは強くリン酸化されることが確認された。このことは、細胞質の α カテニンではなく、 β カテニンに結合している α カテニンが、 β カテニンのチロシンのリン酸化を阻害するというを示唆している。今回、 α カテニン存在下では主に Y64 が、 α カテニン非存在下ではさらに Y86 が選択的にリン酸化されることが示された。 β カテニンの α カテニン結合領域は 118-146 のアミノ酸であることが知られており (Aberle et al., 1996)、Y64、Y86 とも近接している。このことから、 α カテニンは Y86 をリン酸化する酵素が β カテニンと相互作用することを阻害している可能性が考えられる。リン酸化を阻害するメカニズムについては、今回の研究内容では分からないが、2つの可能性が考えられる。1つは、Y86 をリン酸化する酵素が α カテニン結合領域と相互作用しているため、 α カテニンが β カテニンに結合していると、リン酸化酵素が β カテニンと相互作用できない可能性である。もう 1 つは、Y86 が α カテ

ニンによって物理的に保護されており、リン酸化酵素が β カテニンに結合できても作用できない可能性である。 β カテニンと α カテニンの結合が他の分子との相互作用に影響を与えることは、細胞質内の β カテニンのセリン/スレオニンリン酸化に必要な分子であるCKIで報告されている (Bustos et al., 2006)。この報告においてCKIは、 β カテニンの131-181のアミノ酸を欠失した変異体において、 β カテニンとの親和性が減少することが示された。さらに α カテニンが結合できない β カテニンY142E変異体では、CKIによる45番目のセリンのリン酸化が促進されることが示されている。また逆に、細胞内の α カテニンの量が増えることにより、CKIによる β カテニンの45番目のセリンのリン酸化が阻害されることも同時に報告されている。このことから、CKIは α カテニン結合領域を含む領域を介して β カテニンと相互作用し、 β カテニンのリン酸化を行っていること、またこの相互作用は α カテニンによって阻害されていることが示唆される。同様にして、チロシンリン酸化酵素が α カテニン結合領域を介してY86をリン酸化している可能性は十分に考えられる。一方、Y64のリン酸化は α カテニンにより阻害されなかった。このことからY64のリン酸化メカニズムについては2つの可能性が考えられる。1つはY64をリン酸化する酵素が、Y86をリン酸化する酵素と異なる可能性である。もう1つは、リン酸化酵素は同じであるが、Y86は α カテニンにより保護されており、結果的に保護されなかったY64のみがリン酸化されている可能性である。Y86はSrcによってリン酸化されることが*in vitro*の研究によって示されている (Roura et al., 1999)。しかし今回CSKを用いた研究により、Y64、Y86をリン酸化するリン酸化酵素がSrcファミリーではない可能性が考えられた。今後リン酸化酵素を同定していくことは、 β カテニンのリン酸化機構、およびそのリン酸化が β カテニンの機能に及ぼす影響を詳細に解析する上で重要である。

4-2 チロシンリン酸化が β カテニンの機能に与える影響

4-2-1 細胞間接着の観点から

これまで β カテニンのチロシンリン酸化が細胞間接着に影響を与える可能性は多くの論文で報告されてきた。さらに、 β カテニンのY142、Y489、Y654のリン酸化が、それぞれ α カテニンやカドヘリンとの結合に影響を与えることが報告されている (Piedra et al., 2003; Rhee et al., 2007; Rhee et al., 2002; Roura et al., 1999)。実際に β カテニンのリン酸化型変異体をBPD細胞に発現させる研究により、Y142のリン酸化が α カテニンとの結合に影響を与えると考えられる現象が、福永によって確認されている (福永, 学位論文)。しか

し、Y654 をグルタミン酸に置換した β カテニンのリン酸化型変異体(Y654E)を導入した BPD 細胞は、正常な接着活性を示すことも同時に確認されており、これまで報告されてきたチロシン残基のリン酸化による細胞間接着への影響が、必ずしも細胞内で再現できない可能性が示されていた。今回、Y654E を安定に発現する BPD 細胞を用いて、 β カテニンと E-カドヘリンの結合についてより詳細な検討を行った。その結果 Y654E を発現する BPD 細胞は、 β カテニンに結合する E-カドヘリンの蛋白量が減少しているにもかかわらず、細胞間接着を維持していることが示された。以前の報告でも、Y654E は β カテニンのカドヘリンに対する親和性を減少させるが、完全にその相互作用を失うわけではなかった (Piedra et al., 2001; Roura et al., 1999; Xu et al., 2004)。今回の研究により、内在性の β カテニンおよびプラログロビンが発現しない細胞において、Y654E は機能的なカドヘリン・カテニン複合体を形成することが可能であることが示された。このことは、Y654 をリン酸化すると考えられている Src が、カドヘリン・カテニン複合体の形成に影響を与えないという報告とも矛盾しない (Papkoff, 1997)。しかし、グルタミン酸への置換が必ずしもチロシンのリン酸化を再現できるとは限らない。また β カテニンと E-カドヘリンの親和性が減少することは事実であり、細胞が存在する環境が変わることによって、Y654 のリン酸化が細胞間接着の細かな調節を行なっている可能性は考えられる。今後 Y654 のリン酸化の影響を詳細に調べるためには、実際に Y654 を細胞内でリン酸化したり、細胞に刺激を与えて環境を変化させたりする必要があると考えられる。

β カテニンのチロシンのリン酸化が細胞間接着に関与する可能性は、多くの論文で示唆されてきたが、一方で Takeda らは、 β カテニン以外の分子のリン酸化でも細胞間接着に影響を与えることを報告している (Takeda et al., 1995)。そのため、実際の細胞において β カテニンのチロシンのリン酸化が細胞間接着の調節に関与しているのかについてはまだ不明なままである。この問題を解決するためには、実際に内在性のリン酸化酵素によってリン酸化された β カテニンが、細胞内で正常なカドヘリン・カテニン複合体を形成できるのかについて検討を行う必要があると考えられる。今回 F9 派生細胞において、Y64 と Y86 が内在性リン酸化酵素によりリン酸化されることが示された。しかし、これらのチロシンをグルタミン酸(リン酸化型)、フェニルアラニン(非リン酸化型)に置換した β カテニン点変異体は、野生型 β カテニンと同様に、E-カドヘリン、 α カテニンとともに、カドヘリン・カテニン接着複合体を正常に形成できることが示された。このことから、 β カテニンの細胞間接着における基本的な機能に、Y64 や Y86 のリン酸化は重要ではない可能性が考えられた。

ただグルタミン酸への置換が、必ずしもチロシンリン酸化を完全に再現できるわけではない。そのため、実際に Y64 や Y86 がリン酸化された場合、接着活性に影響を与える可能性は否定できない。

これまで β カテニンの Y142 や Y489、Y654 のリン酸化が、それぞれ α カテニン、カドヘリンとの結合に影響を与えることが報告されている。しかし今回の研究では、これらのチロシンのリン酸化は確認できなかった。このことから、少なくとも F9 およびその派生細胞において、定常的に行われている β カテニンのチロシンリン酸化は、細胞間接着の基本的な機能に影響を与えないと考えられる。ただ α カテニン欠損細胞においては、バナダイト処理後カドヘリン、 β カテニンの局在が大きく変化する。この変化に β カテニンのチロシンリン酸化は関与していない。そのため、内在性のリン酸化酵素による β カテニン以外の分子のリン酸化が、細胞間接着に関与している可能性が考えられる。また細胞の種類や細胞周辺的环境によっては、 β カテニンのチロシンのリン酸化が細胞間接着の状態を細かく調節している可能性は否定できない。この問題の解決には、Y654 のリン酸化と同様に、用いる細胞や環境を変えた研究が必要となるのではないかとと思われる。

4-2-2 Wnt シグナルの観点から

近年、 β カテニンのチロシンのリン酸化が、Wnt シグナルに対して影響を与える可能性が報告されてきている (Rhee et al., 2007)。今回の研究において、内在性のリン酸化酵素により、Y64 と Y86 がリン酸化されることが示されたので、これらのチロシンリン酸化が Wnt シグナルに対して影響を与えるのかについて検討した。またこれまでにリン酸化が報告されている Y142 についても同時に検討した。まず、細胞内で β カテニン変異体を一過性に発現させた場合の転写活性について検討を行なった。Y64、Y86、Y64/86、Y142 のリン酸化型および非リン酸化型 β カテニン点変異体を、BPD 細胞内で一過性に発現させた場合、Y64E は野生型 β カテニンと同等の転写活性を示した。一方その他の変異体では、野生型 β カテニンより高い転写活性を示した。ただ、リン酸化型、非リン酸化型の両方の β カテニン変異体で野生型 β カテニンより高い転写活性が確認されていることから、チロシンリン酸化がこの転写活性の上昇に関与しているのかについては不明である。

Wnt 刺激に対する β カテニンの反応性は、 β カテニンを一過性に細胞内で発現させた場合と必ずしも一致しないことが Shimizu らの報告により示されている (Shimizu et al., 2007)。そこで次に、Y64、Y86、Y64/86、Y142 のリン酸化型および非リン酸化型 β カテ

ニン変異体を安定に発現する BPD 細胞を用いて、 β カテニンのチロシンリン酸化が Wnt 刺激に対する β カテニンの反応性に与える影響について検討した。まずそれぞれの変異体に対し 3 つのクローンを用いて活性を検討したところ、同じ変異体を発現する細胞クローン間で、明らかに活性の違いが確認された。クローン間で著しい反応性の差が見られたことは、これらのチロシン残基が Wnt 刺激に対する β カテニンの反応性の細かな調節を行なっている可能性を示している。次に各変異体を発現している細胞の中で最も活性が高かったクローンを用いて、野生型 β カテニンの転写活性と比較した。その結果、Y64 に変異を加えた β カテニンで、野生型 β カテニンと比較して転写活性の減少が見られた。しかし、リン酸化型、非リン酸化型の両方で活性の減少が見られたことから、リン酸化による影響ではない可能性が考えられた。それぞれの変異体の Wnt 添加時の転写活性を Wnt 非添加時と比較すると、全ての変異体で活性の上昇が確認された。このことから、 β カテニンのチロシンリン酸化は、少なくとも Wnt 刺激に対する反応性には必須ではないことが示された。

β カテニン点変異体を用いたこれまでの研究から、今回改変を加えたチロシン残基を含む β カテニンの N 末端領域が Wnt シグナルに対して影響を与える可能性が考えられた。そこで、N 末端領域を欠いた欠損変異型 β カテニン(Δ N)を用いて、N 末端領域と Wnt シグナルの関与について検討を行った。まず Δ N を BPD 細胞内で一過性に発現させた場合では、 Δ N は野生型 β カテニンと同等の転写活性を示し、転写因子として機能することが示された。このことから、 β カテニンが転写因子として機能するにあたって、N 末端領域は必要でないことが示された。一方、 Δ N を安定に発現している細胞では、確認した 5 つのクローンの全てが Wnt 刺激に対して反応性を示さず、Wnt 非添加時と比較して転写活性の上昇が確認されなかった。つまり、N 末端領域は一過性に発現させた場合の転写活性には必要ではないが、Wnt に反応するために必要であると考えられる。以下、 Δ N が Wnt 刺激に対して反応性を示さなかった原因について考察を行う。

前述の通り、 Δ N は細胞内で一過性に発現させた場合、転写因子として働くことが示されている。そのため、 Δ N が核内へ輸送されると転写活性の上昇が確認されると考えられる。このことから、今回 Δ N において転写活性の上昇が見られなかったのは、 Δ N が核内へ輸送されなかったことが原因であると考えられる。ここで、 Δ N の核内輸送が起きなかった原因として、大きく 2 つの可能性が考えられる。1 つは細胞質内の β カテニンが少なかったことである。しかし、N 末端領域を欠損した Δ N は CKI、GSK3 β による β カテニンのセリン/スレオニンリン酸化を受けないので、それに続くプロテアソーム分解機構の影響を受けない。

そのため、通常 ΔN は安定型 β カテニンとして用いられ、Wntの刺激に関係なく一定量の ΔN 蛋白質が細胞質に存在すると考えられる。 ΔN がCKI、GSK3 β によるリン酸化を引き金とした分解機構とは違った分解機構によって分解された可能性も考えられるが、これまでそのような報告はなく、可能性は非常に低いものと思われる。

もうひとつの可能性は、 β カテニンのN末端領域に核内輸送に必要な領域が存在する可能性である。 β カテニンは核内輸送シグナルを分子内に有しておらず、 β カテニン自身のアルマジロリピートを介して、または別の蛋白質によって核内へ輸送される可能性が報告されている (Fagotto et al., 1998)。現在、その候補として考えられているものに、LEF/TCFやB-cell lymphoma 9(BCL9)が挙げられる (Behrens et al., 1996; Huber et al., 1996; Kramps et al., 2002; Townsley et al., 2004)。BCL9は β カテニンの1番目のアルマジロリピートを介して、 β カテニンと結合することが報告されており (Sampietro et al., 2006)、 ΔN ではこの領域を欠失している。今回の研究において、F9細胞におけるBCL9の発現や β カテニンとBCL9の相互作用は確認されていないが、 ΔN がWnt刺激に対して反応性を示せなかった原因として、 ΔN がBCL9と結合できず、核内への輸送が起こらなかった可能性が考えられる。Sampietroらが行った結晶解析を用いた研究では、 β カテニンのアルマジロリピート領域とBCL9のHD2領域を用いてその領域の結合のみを確認しており、 β カテニン全長とBCL9との結合機構の詳細については不明な点が残っている。(Sampietro et al., 2006)。今回同定したリン酸化チロシン残基はN末端領域に存在し、BCL9との結合領域である1番目のアルマジロリピート領域とも近い位置に存在する。そのためこれらのチロシン残基が、 β カテニンとBCL9の相互作用に関与している可能性は否定できない。今後、 β カテニンのチロシンのリン酸化が、 β カテニンのWnt刺激に対する反応性に及ぼす影響について、 β カテニンとBCL9との相互作用という観点も含めながら、詳細に調べていく必要があると思われる。

今回、細胞をバナデイトで処理することによって、内在性チロシンリン酸化酵素による β カテニンの定常状態におけるリン酸化を検討した。しかしリン酸化とは、細胞が何らかの刺激を受けることによって起こることが多い。 β カテニンのチロシンリン酸化においても、細胞が受ける刺激によってリン酸化されるチロシン残基やリン酸化酵素が変化するものと思われる。そのため、細胞に刺激を与えることによって起こる β カテニンのリン酸化を検討することが、今後の研究の課題となると考えられる。今回の研究で用いたBPD細胞

や BPD- α D 細胞は、内在性の β カテニンを発現しておらず、導入した β カテニンのリン酸化を正確に把握することが可能であり、今後の研究においても有用な実験系として用いることができると考えられる。

第5章 結語

今回の研究では、マウス奇形癌腫細胞である F9 細胞、およびその派生細胞を用いて、内在性チロシンリン酸化酵素による β カテニンのリン酸化について5つのことが証明された。

- 1) F9 細胞内の β カテニンは、内在性チロシンリン酸化酵素によりリン酸化される。
- 2) α カテニンが結合していない β カテニンは、Y64 と Y86 の2つのチロシンがリン酸化される。
- 3) Y64 と Y86 のリン酸化は、カドヘリン依存性細胞間接着における β カテニンの基本的機能には影響しない。
- 4) Y64 と Y86 のリン酸化は、 β カテニンの転写因子としての機能には影響を与えないが、Wnt シグナルに対する反応性を調節している可能性が考えられる。
- 5) N 末端領域を欠損した β カテニンを発現する細胞では、Wnt による転写活性の上昇が起きない。

今回の研究において、実際に内在性のリン酸化酵素による β カテニンのチロシンリン酸化は、細胞間接着や転写因子としての機能に大きな影響は与えなかった。しかし、細胞間接着や Wnt シグナルの細かな調節に関与している可能性は否定できない。そのため、今回の研究では示すことができなかったリン酸化酵素の同定、リン酸化機構の解明、細胞の種類や周辺環境の変化における β カテニンのリン酸化について、より詳細に解析する必要があるものと思われる。今回の研究はその第一歩となったのではないかと考えている。

参考文献

- Aberle, H., A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert, and R. Kemler. 1997. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J.* 16:3797-804.
- Aberle, H., S. Butz, J. Stappert, H. Weissig, R. Kemler, and H. Hoschuetzky. 1994. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci.* 107 (Pt 12):3655-63.
- Aberle, H., H. Schwartz, H. Hoschuetzky, and R. Kemler. 1996. Single amino acid substitutions in proteins of the armadillo gene family abolish their binding to alpha-catenin. *J Biol Chem.* 271:1520-6.
- Behrens, J., B.A. Jerchow, M. Wurtele, J. Grimm, C. Asbrand, R. Wirtz, M. Kuhl, D. Wedlich, and W. Birchmeier. 1998. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science.* 280:596-9.
- Behrens, J., L. Vakaet, R. Friis, E. Winterhager, F. Van Roy, M.M. Mareel, and W. Birchmeier. 1993. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol.* 120:757-66.
- Behrens, J., J.P. von Kries, M. Kuhl, L. Bruhn, D. Wedlich, R. Grosschedl, and W. Birchmeier. 1996. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature.* 382:638-42.

- Bustos, V.H., A. Ferrarese, A. Venerando, O. Marin, J.E. Allende, and L.A. Pinna. 2006. The first armadillo repeat is involved in the recognition and regulation of beta-catenin phosphorylation by protein kinase CK1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:19725-30.
- Earle, W.R. 1943. Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Natl. Cancer. Inst.* 4:165-212.
- Fagotto, F., U. Gluck, and B.M. Gumbiner. 1998. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr Biol*. 8:181-90.
- Fukunaga, Y., H. Liu, M. Shimizu, S. Komiya, M. Kawasuji, and A. Nagafuchi. 2005. Defining the roles of beta-catenin and plakoglobin in cell-cell adhesion: isolation of beta-catenin/plakoglobin-deficient F9 cells. *Cell Struct Funct*. 30:25-34.
- Hamaguchi, M., N. Matsuyoshi, Y. Ohnishi, B. Gotoh, M. Takeichi, and Y. Nagai. 1993. p60v-src causes tyrosine phosphorylation and inactivation of the N-cadherin-catenin cell adhesion system. *Embo J*. 12:307-14.
- Huber, O., R. Korn, J. McLaughlin, M. Ohsugi, B.G. Herrmann, and R. Kemler. 1996. Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev*. 59:3-10.
- Ikeda, S., S. Kishida, H. Yamamoto, H. Murai, S. Koyama, and A. Kikuchi. 1998. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *Embo J*. 17:1371-84.

- Imamura, Y., M. Itoh, Y. Maeno, S. Tsukita, and A. Nagafuchi. 1999. Functional domains of alpha-catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. *J Cell Biol.* 144:1311-22.
- Kellie, S. 1988. Cellular transformation, tyrosine kinase oncogenes, and the cellular adhesion plaque. *Bioessays.* 8:25-30.
- Kishida, S., H. Yamamoto, S. Ikeda, M. Kishida, I. Sakamoto, S. Koyama, and A. Kikuchi. 1998. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *J Biol Chem.* 273:10823-6.
- Kramps, T., O. Peter, E. Brunner, D. Nellen, B. Froesch, S. Chatterjee, M. Murone, S. Zullig, and K. Basler. 2002. Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell.* 109:47-60.
- Liu, C., Y. Li, M. Semenov, C. Han, G.H. Baeg, Y. Tan, Z. Zhang, X. Lin, and X. He. 2002. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell.* 108:837-47.
- Maeno, Y., S. Moroi, H. Nagashima, T. Noda, H. Shiozaki, M. Monden, S. Tsukita, and A. Nagafuchi. 1999. alpha-catenin-deficient F9 cells differentiate into signet ring cells. *Am J Pathol.* 154:1323-8.
- Matsuda, M., A. Kubo, M. Furuse, and S. Tsukita. 2004. A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells. *J Cell Sci.* 117:1247-57.

- Matsuoka, H., S. Nada, and M. Okada. 2004. Mechanism of Csk-mediated down-regulation of Src family tyrosine kinases in epidermal growth factor signaling. *J Biol Chem.* 279:5975-83.
- Matsuyoshi, N., M. Hamaguchi, S. Taniguchi, A. Nagafuchi, S. Tsukita, and M. Takeichi. 1992. Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J Cell Biol.* 118:703-14.
- Molenaar, M., M. van de Wetering, M. Oosterwegel, J. Peterson-Maduro, S. Godsave, V. Korinek, J. Roose, O. Destree, and H. Clevers. 1996. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell.* 86:391-9.
- Nagafuchi, A. 2001. Molecular architecture of adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol.* 13:600-3.
- Nagafuchi, A., S. Ishihara, and S. Tsukita. 1994. The roles of catenins in the cadherin-mediated cell adhesion: functional analysis of E-cadherin-alpha catenin fusion molecules. *J Cell Biol.* 127:235-45.
- Nagafuchi, A., Y. Shirayoshi, K. Okazaki, K. Yasuda, and M. Takeichi. 1987. Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature.* 329:341-3.
- Nagafuchi, A., and S. Tsukita. 1994. The loss of the expression of alpha catenin, the 102kD cadherin associated protein, in central nervous tissues during development. *Dev. Growth Differ.* 36:59-71.

- Ozawa, M., and R. Kemler. 1998. Altered cell adhesion activity by pervanadate due to the dissociation of alpha-catenin from the E-cadherin.catenin complex. *J Biol Chem.* 273:6166-70.
- Papkoff, J. 1997. Regulation of complexed and free catenin pools by distinct mechanisms. Differential effects of Wnt-1 and v-Src. *J Biol Chem.* 272:4536-43.
- Piedra, J., D. Martinez, J. Castano, S. Miravet, M. Dunach, and A.G. de Herreros. 2001. Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 276:20436-43.
- Piedra, J., S. Miravet, J. Castano, H.G. Palmer, N. Heisterkamp, A. Garcia de Herreros, and M. Dunach. 2003. p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol Cell Biol.* 23:2287-97.
- Rhee, J., T. Buchan, L. Zukerberg, J. Lilien, and J. Balsamo. 2007. Cables links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription. *Nat Cell Biol.* 9:883-92.
- Rhee, J., N.S. Mahfooz, C. Arregui, J. Lilien, J. Balsamo, and M.F. VanBerkum. 2002. Activation of the repulsive receptor Roundabout inhibits N-cadherin-mediated cell adhesion. *Nat Cell Biol.* 4:798-805.
- Roura, S., S. Miravet, J. Piedra, A. Garcia de Herreros, and M. Dunach. 1999. Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 274:36734-40.
- Sampietro, J., C.L. Dahlberg, U.S. Cho, T.R. Hinds, D. Kimelman, and W. Xu. 2006. Crystal structure of a beta-catenin/BCL9/Tcf4 complex. *Mol Cell.* 24:293-300.

- Sherman, M.I., and R.A. Miller. 1978. F9 embryonal carcinoma cells can differentiate into endoderm-like cells. *Dev Biol.* 63:27-34.
- Shimizu, M., Y. Fukunaga, J. Ikenouchi, and A. Nagafuchi. 2007. Defining the roles of β -catenin and plakoglobin in LEF/TCF-dependent transcription using β -catenin/plakoglobin-null F9 cells. *Mol Cell Biol.*
- Shirayoshi, Y., K. Hatta, M. Hosoda, S. Tsunasawa, F. Sakiyama, and M. Takeichi. 1986. Cadherin cell adhesion molecules with distinct binding specificities share a common structure. *Embo J.* 5:2485-8.
- Takata, K., and S.J. Singer. 1988. Phosphotyrosine-modified proteins are concentrated at the membranes of epithelial and endothelial cells during tissue development in chick embryos. *J Cell Biol.* 106:1757-64.
- Takeda, H., A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, J. Behrens, W. Birchmeier, and S. Tsukita. 1995. V-src kinase shifts the cadherin-based cell adhesion from the strong to the weak state and beta catenin is not required for the shift. *J Cell Biol.* 131:1839-47.
- Takeichi, M. 1977. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol.* 75:464-74.
- Taniguchi, M., M. Sanbo, S. Watanabe, I. Naruse, M. Mishina, and T. Yagi. 1998. Efficient production of Cre-mediated site-directed recombinants through the utilization of the puromycin resistance gene, *pac*: a transient gene-integration marker for ES cells. *Nucleic Acids Res.* 26:679-80.

- Townsley, F.M., A. Cliffe, and M. Bienz. 2004. Pygopus and Legless target Armadillo/beta-catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function. *Nat Cell Biol.* 6:626-33.
- Tsukita, S., K. Oishi, T. Akiyama, Y. Yamanashi, T. Yamamoto, and S. Tsukita. 1991. Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. *J Cell Biol.* 113:867-79.
- van Buul, J.D., E.C. Anthony, M. Fernandez-Borja, K. Burridge, and P.L. Hordijk. 2005. Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) mediates vascular endothelial-cadherin-based cell-cell adhesion by regulating beta-catenin tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 280:21129-36.
- Volberg, T., B. Geiger, R. Dror, and Y. Zick. 1991. Modulation of intercellular adherens-type junctions and tyrosine phosphorylation of their components in RSV-transformed cultured chick lens cells. *Cell Regul.* 2:105-20.
- Volberg, T., Y. Zick, R. Dror, I. Sabanay, C. Gilon, A. Levitzki, and B. Geiger. 1992. The effect of tyrosine-specific protein phosphorylation on the assembly of adherens-type junctions. *Embo J.* 11:1733-42.
- Wadham, C., J.R. Gamble, M.A. Vadas, and Y. Khew-Goodall. 2003. The protein tyrosine phosphatase Pez is a major phosphatase of adherens junctions and dephosphorylates beta-catenin. *Mol Biol Cell.* 14:2520-9.
- Warren, S.L., and W.J. Nelson. 1987. Nonmitogenic morphoregulatory action of pp60v-src on multicellular epithelial structures. *Mol Cell Biol.* 7:1326-37.

Xu, G., A.W. Craig, P. Greer, M. Miller, P.Z. Anastasiadis, J. Lilien, and J. Balsamo. 2004. Continuous association of cadherin with beta-catenin requires the non-receptor tyrosine-kinase Fer. *J Cell Sci.* 117:3207-19.

Yan, H.X., W. Yang, R. Zhang, L. Chen, L. Tang, B. Zhai, S.Q. Liu, H.F. Cao, X.B. Man, H.P. Wu, M.C. Wu, and H.Y. Wang. 2006. Protein-tyrosine phosphatase PCP-2 inhibits beta-catenin signaling and increases E-cadherin-dependent cell adhesion. *J Biol Chem.* 281:15423-33.

福永剛隆, 2006 「細胞間接着における β カテニンとプラコグロビンの機能解析」 学位論文