



# Wnt5a modulates glycogen synthase kinase 3 to induce phosphorylation of receptor tyrosine kinase Ror2

山本, 裕之

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4094

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004094>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	山本 裕之
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 1870 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 19 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Wnt5a modulates glycogen synthase kinase 3 to induce phosphorylation of receptor tyrosine kinase Ror2(Wnt5a による受容体型チロシンキナーゼ Ror2 のリン酸化は glycogen synthase kinase3 を介する)

審 査 委 員

主 査	教 授	寺島 俊雄
	教 授	饗場 篤
	教 授	久野 高義

## 要旨

受容体型チロシンキナーゼ Ror2 は、JNK 経路を介した non-canonical Wnt 経路の活性化及び canonical Wnt ( $\beta$ -catenin-TCF)経路の抑制において重要な役割を果たしている。我々はこれまでに、分子・細胞レベルの解析として、Ror2 同様、形態形成過程に必須の分子である Wnt5a が Ror2 の細胞外領域と選択的に会合すること、Ror2 と Wnt5a が JNK シグナルを介し、協調的に発生過程の convergent extension movement を制御し得ること、更に Ror2 が Wnt5a の既知の受容体である rFrizzled2 と会合することなどを明らかにしており、Ror2 が Wnt5a 受容体複合体の構成要素として機能することを明らかにしてきた。一方、培養細胞を用いた解析において、Wnt 経路における重要な制御分子である、セリン・スレオニンキナーゼ casein kinase 1 $\epsilon$  (CK1 $\epsilon$ ) を Ror2 と共発現させた時、CK1 $\epsilon$ によって Ror2 のセリン・スレオニン残基がリン酸化され、またそのリン酸化に伴い Ror2 のチロシンキナーゼ活性が増加することを見出している。しかしながら、Ror2 のリン酸化が Wnt5a 刺激によって誘導されるのかどうかに関しては、これまで不明であった。今研究において、内在的に Ror2 を発現している培養細胞を Wnt5a で刺激すると、SDS-PAGE 後のウェスタンブロット解析において Ror2 のバンドがシフトアップすることを見出した。また、このシフトアップは Wnt5a の刺激処理時間依存的に増加した。このシフトアップのタンパク質修飾に関しては、リン酸化修飾を疑い、Wnt5a 処理した培養細胞から調製した細胞溶解液を脱リン酸化酵素により処理し解析した結果、Ror2 のバンドは Wnt5a 刺激未処理の basal レベルにまでシフトダウンしたことから、Wnt5a 刺激による Ror2 のシフトアップはリン酸化によるものであることが明らかになった。また、内在性 Ror2 の免疫沈降による解析から、このリン酸化修飾に関してはセリン・スレオニン残基がリン酸化されていることを見出した。しかしながら、主に canonical Wnt 経路を制御する Wnt である Wnt3a でのリン酸化は認めないことから、Ror2 のリン酸化は Wnt5a 特異的であることが示唆された。また、Wnt5a 刺激による Ror2 チロシン残基のリン酸化は検出できなかった。次に、Wnt5a 刺激に伴い Ror2 をリン酸化する酵素を同定するために、各種セリン・スレオニンキナーゼ阻害剤を用いた探索を行った。前述のように Ror2 は CK1 $\epsilon$ によりリン酸化されることから、Wnt5a 刺激による Ror2 のリン酸化（シフトアップ）の関与に CK1 $\epsilon$ を候補分子として考え、CKI 阻害剤である CKI-7 による解析を行ったものの、明らかな Ror2 のリン酸化抑制（シフトダウン）は認めなかった。そこで、 $\beta$ -catenin をリン酸化し分解へと誘導することで、canonical Wnt 経路を負に制御する重要な分子であり、セリン・スレオニンキナーゼである glycogen synthase kinase-3(GSK-3)の阻害剤 (LiCl 及び SB216763) を用いた解析を行った結果、Ror2 のセリン・スレオニン残基の明らかなリン酸化抑制が認められた。更に、RNA 干渉法を用いて、GSK-3 のタンパク質発現抑制下での Wnt5a 刺激に伴う Ror2 のリン酸化を解析した結果、阻害剤と同様に Ror2 のリン酸化抑制を認め、Wnt5a

刺激に伴う Ror2 のリン酸化には、GSK-3 の 2 種類の isoform (GSK-3 $\alpha$ ・GSK-3 $\beta$ ) の中でも、主に GSK-3 $\alpha$ の関与が示唆された。また、精製した Ror2 と GSK-3 を用いた in vitro kinase assay もしくは培養細胞での Ror2 及び GSK-3 共発現下における in vivo 解析の両者において、Ror2 は GSK-3 によりリン酸化されることが明らかとなった。また、このリン酸化は、GSK-3 阻害剤 SB216763 によって抑制されることが明らかになった。更に、培養細胞に Ror2 及び GSK-3 を共発現させ、両者の物理的な会合を解析した結果、免疫沈降した Ror2 に GSK-3 $\alpha$ もしくは GSK-3 $\beta$ が共沈することを見出した。これらの結果より、Wnt5a 刺激によって誘導される Ror2 のセリン・スレオニン残基のリン酸化には、GSK-3 が強く関与することが示唆された。一方、以前に我々は培養細胞を用いた解析において、Wnt5a 刺激により細胞移動が増加し、更にこの移動には Ror2 が必要であることを報告している。このことより、我々は更に Wnt5a による細胞移動の増加が GSK-3 阻害剤 SB216763 存在下もしくは GSK-3 の RNA 干渉法によるタンパク質発現抑制下において抑制されるのかどうかを解析した。その結果、阻害剤及び RNA 干渉法の両者によって明らかに細胞移動が抑制されるという興味深い結果が得られた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1872 号	氏名	山本 裕之
論文題目 Title of Dissertation	<p><b>Wnt5a modulates glycogen synthase kinase 3 to induce phosphorylation of receptor tyrosine kinase Ror2</b></p> <p>Wnt5a による受容体型チロシンキナーゼ Ror2 のリン酸化は glycogen synthase kinase 3 を介する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 寺島 俊雄 Chief Examiner</p> <p>副 査 饗 場 篤 Vice-Examiner</p> <p>副 査 久野 尚義 Vice-Examiner</p>		
審査終了日	平成 19 年 8 月 15 日		

(要旨は1, 000字〜2, 000字程度)

受容体型チロシンキナーゼ Ror2 は、JNK 経路を介した non-canonical Wnt 経路の活性化及び canonical Wnt ( $\beta$ -catenin-TCF)経路の抑制において重要な役割を果たしている。これまでに Ror2 が Wnt5a 受容体複合体の構成要素として機能することは明らかとなっていたが、Wnt5a 刺激によって Ror2 のリン酸化が誘導されるのかどうかに関しては 不明であった。本研究において、まず内在的に Ror2 を発現している培養細胞を Wnt5a で刺激すると、SDS-PAGE 後のウェスタンブロット解析において Ror2 のバンドが Wnt5a の刺激時間依存的にシフトアップすることを見出した。このシフトアップは、脱リン酸化酵素処理により消失することから、リン酸化修飾によるものであることが示された。また、抗リン酸化セリン・スレオニン及びリン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロット解析から、Ror2 のセリン・スレオニン残基がリン酸化されていることを見出した。一方、canonical Wnt 経路を制御する Wnt である Wnt3a 刺激ではリン酸化は認められないことから、この Ror2 のリン酸化は Wnt5a 特異的であることが示唆された。次に、Wnt5a 刺激に伴い Ror2 をリン酸化する酵素を同定するために、各種セリン・スレオニンキナーゼ阻害剤を用いた探索を行った。CKI 阻害剤である CKI-7 では明らかな Ror2 のリン酸化抑制（シフトダウン）は認めなかったが、セリン・スレオニンキナーゼである glycogen synthase kinase-3(GSK-3)の阻害剤（LiCl 及び SB216763）によって Ror2 のセリン・スレオニン残基の明らかなリン酸化抑制が認められた。更に、RNA 干渉法により GSK-3 のタンパク質発現抑制下での Wnt5a 刺激に伴う Ror2 のリン酸化を解析した結果、GSK-3 阻害剤と同様に Ror2 のリン酸化抑制を認めた。特に Wnt5a 刺激に伴う Ror2 のリン酸化には、GSK-3 の 2 種類の isoform の中でも、主に GSK-3 $\alpha$  の関与が示唆された。また、精製した Ror2 と GSK-3 を用いた in vitro kinase assay または培養細胞での Ror2 及び GSK-3 共発現下における in vivo 解析の両者において、Ror2 は GSK-3 によりリン酸化され、このリン酸化は GSK-3 阻害剤 SB216763 によって抑制された。更に培養細胞において Ror2 及び GSK-3 は物理的に会合していることが見

出された。これらの結果から Wnt5a 刺激によって誘導される Ror2 のセリン・スレオニン残基のリン酸化には、GSK-3 が関与することが示唆された。このような生化学的解析に加え、我々は Wnt5a による細胞移動の更新が GSK-3 阻害剤 SB216763 または RNA 干渉法による GSK-3 の発現抑制下において影響を受けるか否かを検討した。その結果、GSK-3 阻害剤及び RNA 干渉法による GSK-3 の発現抑制によって Wnt5a による細胞移動の亢進が阻害されることを明らかにした。

本研究は、受容体型チロシンキナーゼ Ror2 について、その Wnt5a によるシグナル伝達、特に Ror2 自身のリン酸化について研究を行ったものであるが、従来ほとんど不明であった Wnt5a による Ror2 のリン酸化における GSK-3 の役割について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。