

氏 名 鈴木 美奈子

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2507 号

学位授与の日付 2024 年 3 月 22 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 ヘパラン硫酸プロテオグリカンの糖鎖修飾による Wnt の制御
の研究

論文審査委員 主 査 藤森 俊彦
基礎生物学コース 教授
高田 慎治
基礎生物学コース 教授
野中 茂紀
基礎生物学コース 准教授
松尾 勲
大阪母子医療センター研究所 病因病態部門
部長

博士論文の要旨

氏 名：鈴木 美奈子

論文題目：ヘパラン硫酸プロテオグリカンの糖鎖修飾による Wnt の制御の研究
(Regulation of Wnt by sugar chain modifications of heparan sulfate proteoglycans)

Wnts comprise a family of secreted proteins with various functions in embryogenesis and homeostasis. They are thought to form concentration gradients in tissues to regulate cell polarity or cell fate. Long-range distribution of Wnts requires heparan sulfate proteoglycans (HSPGs), which possess heparan sulfate (HS) chains attached to the core protein. A number of studies have shown that HS chain modifications are important for Wnt activity and distribution. HS chains are glycosaminoglycans, which consist of repeating disaccharide units of uronic acid (GlcA) and *N*-acetylglucosamine (GlcNAc). They can be classified into at least three groups based on modifications of the *N*-position in GlcNAc: unsubstituted, deacetylated (GlcNH₃), and *N*-sulfated glucosamine (GlcNS). These modifications are catalyzed by a bifunctional enzyme, *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase (NDST), which has both *N*-deacetylase and *N*-sulfotransferase domains. However, biological functions of these HSPG modifications have been poorly understood. Therefore, I examined the significance of differences in HS chain modifications in Wnt signaling (Chapter 1) and in formation of planar cell polarity (PCP), which is regulated by Wnt (Chapter 2).

Chapter 1: Examination of HS chain modification involved in Wnt accumulation on the cell surface and in Wnt signaling

Wnt8 activates canonical Wnt signaling, resulting in transcription of its target genes via β -catenin. Modification of HS chains by NDST1 is important to activate this

Wnt signaling pathway. Since NDST has two enzyme activities that generate *N*-deacetylated glucosamine and *N*-sulfated glucosamine, it is difficult to determine which modification is important for Wnt signaling. To tackle this problem, I attempted to separate these two enzyme activities of NDST1. I successfully generated an NDST1 mutant (NDST1-mPBS) that increases *N*-deacetylation, but not *N*-sulfation of HS chains. This was accomplished by introducing mutations into the two binding sites of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate (PAPS), the donor of sulfate groups for *N*-sulfation.

By comparing the function of this mutant with wild-type (WT) NDST1, I examined the significance of *N*-deacetylation and *N*-sulfation of HS chains separately in early *Xenopus* embryos. While overexpression of wild-type (WT) NDST1 enhanced Wnt8 accumulation on cell surfaces, overexpression of NDST1-mPBS did not affect it. Furthermore, the capacity of NDST1-mPBS to activate canonical Wnt signaling was significantly weaker than in WT NDST1. These results show that *N*-sulfation of HS chains is required for Wnt8 accumulation on cell surfaces and its signaling activity.

Chapter 2: Examination of HS chain modifications in regulation of PCP

Cells in a tissue plane are often aligned. This alignment results in what is termed planar cell polarity (PCP), established by proteins called core PCP components, which are asymmetrically localized within a cell. In vertebrates, Wnt gradients are believed to regulate PCP. However, since it has been difficult to visualize Wnts, the precise mechanism by which they regulate PCP is largely unknown.

Proper PCP formation in the neural plate is necessary for neural tube closure. Since Wnt11 is required for neural tube closure in *Xenopus*, a Wnt11 gradient seems to regulate PCP formation in this tissue. However, findings obtained in our laboratory that Wnt11 does not disperse to form a concentration gradient in the neural plate. Rather, it accumulates along the medio-lateral axis of cell boundaries, in a similar fashion to core PCP components. Based on these findings, it appears that Wnt11 regulates PCP in local

association with core PCP components, rather than by forming a long-range gradient. Given this finding, I addressed the question how Wnt11 localization is regulated in the neural plate.

HS chains and their modification by NDST1 are necessary for Wnt8 accumulation on the cell surface. Thus, I suspected that specific modifications of HS chains are also required for Wnt11 localization in the neural plate. In this study, I found that Wnt11 accumulation on the cell surface was increased by overexpression of NDST1, while it was reduced by knockdown of *ndst1*. Furthermore, Wnt11 was significantly co-localized with *N*-deacetyl and *N*-sulfo HS. These data suggest that HS chains modified by NDST1 may serve as molecular reservoirs to accumulate Wnt11 on the cell surface.

Importantly, I found that HSPGs were polarized like Wnt11 or core PCP components in the neural plate and that this polarization was dependent on PCP formation. In addition, HS chain modification by NDST1 was required for proper PCP formation. Conversely, core PCP components were required for membrane localization of HS chains. These data strongly suggest that mutual regulation between HSPGs, especially those enriched with HSs modified by NDST1, and core PCP components are crucial for PCP formation.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 鈴木 美奈子

Title
論文題目 ヘパラン硫酸プロテオグリカンの糖鎖修飾による Wnt の制御の研究

多細胞動物の発生においては、分泌性のシグナル因子が細胞間のコミュニケーションに関わる。しかしながら、そのような因子が細胞外においてどのように輸送され、受容細胞にまで届けられるかという問題については、理解は十分ではない。ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) は糖鎖に富む細胞外基質タンパク質の一種であり、様々な分泌性のシグナル因子の輸送に関わることが知られている。従来 of 遺伝学的あるいは生化学的解析から、HSPG は分泌性シグナル因子を一時的に細胞膜上に捕捉し、受容体に受け渡す分子として考えられて来た。一方、近年の研究からは、糖鎖の修飾状態によって HSPG の細胞膜上での局在性が変化し、分泌性シグナル因子への作用にも違いが生まれることが明らかになりつつあり、HSPG の糖鎖修飾の制御と生物学的意義についてのさらなる解明が望まれている。

出願者はこの問題に対して、代表的な分泌性のシグナル因子である Wnt に着目し、HSPG の糖鎖修飾が Wnt の機能に対して及ぼす影響と糖鎖修飾の制御機構について、アフリカツメガエル胚を用いて研究を行った。まず、第 1 章では、HSPG の糖鎖修飾酵素である *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase (NDST) に着目し、Wnt シグナルへの作用の詳細を検討した。HSPG はコアタンパク質に複数のグルクロン酸 (GlcA) と *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の繰り返し構造 ([GlcA-GlcNAc]_n) からなるヘパラン硫酸 (HS) 鎖が結合した糖タンパク質であるが、NDST によって *N*-脱アセチル化および *N*-硫酸化される。NDST は Wnt8 の分布と作用を制御することが示されているが、NDST の持つ 2 つの酵素活性のどちらが重要であるかは明らかになっていなかった。そこで出願者は、*N*-脱アセチル化のみを促進する NDST1 変異体蛋白質を作成し Wnt8 に対する影響を検討したところ、*N*-脱アセチル化ではなく *N*-硫酸化が Wnt8 の分布とシグナル活性化に関与することが示され、糖鎖修飾の使い分けによって HSPG の機能が精巧に制御されていることを明らかになった。第 2 章では、出願者は Wnt11 により制御される神経板での平面内細胞極性 (planar cell polarity, PCP) に注目し、HSPG の関与について研究を展開した。PCP の制御には、コア PCP 因子と呼ばれる一連のタンパク質群が関与することが知られている。脊椎動物胚の神経板細胞において、コア PCP 因子は極性化した分布を示すが、出願者の所属研究室の先行研究で Wnt11 蛋白質も同様の分布を示すことが判明していた。そこで出願者は、NDST1 の過剰発現およびノックダウン実験を行い、NDST1 が神経板における Wnt11 とコア PCP 因子の極性化に重要であることを明らかにした。さらに、NDST1 により *N*-脱アセチル化および *N*-硫酸化された HS 鎖を持つ HSPG も、神経板において極性化した分布パターンを形成することを発見した。この HSPG の極性化は PCP に依存しており、Wnt11 の作用でコア PCP 因子の Vangl2 がリン酸化されると HSPG を安定化し、その結果 Wnt11 の集積がより促進することを突き止めた。これらの結果から出願者は、Wnt11、コア PCP

因子、HSPG の相互作用の結果生み出される正のフィードバック制御によって、神経板の PCP が形成されるというモデルを提唱した。

以上の研究成果は、シグナル因子の輸送における HSPG の糖鎖修飾の重要性についての理解を深めた点において、HSPG 自体の分布が生理的な文脈に応じて変化することを初めて明らかにした点において、またそれをもとに PCP の形成機構に新たなモデルを提唱した点において、高く評価できる。第 1 章は既に国際誌に掲載決定済みであり、第 2 章も国際学会での発表等を通して当該分野の研究者からも評価されており、国際誌への発表の準備も進んでいる。以上の理由により、審査委員会は、本論文が学位の授与に値すると判断した。