

博士論文の要約

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

総合研究大学院大学生命科学研究科基礎生物学専攻
鈴木美奈子

Wntは発生において様々な機能を担う分泌性のタンパク質である。Wntは組織内に濃度勾配を形成し、組織のパターニングや細胞の方向性を制御していると考えられている。Wntが組織内に長距離にわたってシグナルを伝えるためには、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) のような膜タンパク質が必要であることが知られている。HSPGはコアタンパク質に複数のグルクロン酸とN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の繰り返し構造からなるヘパラン硫酸 (HS) 鎖が結合する膜タンパク質である。HS鎖には多段階の反応による様々な修飾が知られており、それらの違いがWntへの作用に大きな影響を及ぼすことが知られている。HS鎖の多段階の修飾のうち、最初の修飾を行うN-deacetylase/N-sulfotransferase-1 (NDST1) は2つのドメインがあり、GlcNAcを脱アセチル化しGlcNH₃⁺を生成するN-deacetylaseドメインと、そこに硫酸化を行い、GlcNSを生成するN-sulfotransferaseドメインが存在する。私はNDST1によって修飾されるHS鎖の修飾に着目し、どのような修飾のHS鎖がWntのシグナル伝達に重要かを検討した (第1章)。さらに、Wntにより制御される発生現象の一つである平面内細胞極性 (planar cell polarity: PCP) に注目し、特定のHS鎖の修飾が適切なPCP形成に必要なことを明らかにするとともに、HS鎖の細胞膜上の分布がPCPによって制御されることを見出し、その機構を明らかにするとともにその意義について検討した (第2章)。

第1章： Wnt8の集積と活性におけるHS鎖の修飾の重要性

Wntファミリーの一つであるWnt8はcanonical Wnt経路を介して細胞内にシグナルを伝達する。このシグナルの活性化にはNDST1によって修飾されるHS鎖が重要であることが報告されている。上記のようにNDST1には2つのドメインがあり、GlcNAcの脱アセチル化とN-硫酸化を行うため、どちらの修飾がWnt8の制御に重要なのかは明らかでない。そこで、NDST1の2つの活性のうち一方を操作することができれば、どちらの修飾のHS鎖がWnt8の制御に関わるかを検討することができる考えた。

複数のNDST1変異体を作成したところ、N-硫酸化の際の硫酸基の供与体である3'-phosphoadenosine 5'-phosphate (PAPS) の2つの結合サイトを全てアラニンに置換した変異体、NDST1-PAPS binding site mutant (NDST1-mPBS) は、*Xenopus*初期胚での過剰発現においてはN-硫酸化活性を失い、脱アセチル化のみを亢進させることができた。*Xenopus*初期胚では、Wnt8は細胞表面にドット状に集積するが、wild-type (WT) のNDST1は過剰発現によりこの集積を亢進させることが報告されている。それに対して、

NDST1-mPBSの過剰発現ではWnt8の蓄積の亢進が見られなかった。また、canonical Wntシグナル経路の活性評価では、WT NDST1がWntシグナルに対して促進的に働く一方、NDST1-mPBSはシグナルに対して阻害的に働くことが明らかとなった。以上の結果から、Wnt8の細胞膜上への集積とシグナル伝達にはHS鎖のN-硫酸化が重要であることが示唆された。

第2章：平面内細胞極性形成におけるHS鎖の修飾の重要性

表皮のようなシート状に並ぶ細胞、即ち上皮細胞は主に2つの方向性を持つ。一つは細胞の頂端側と基底側から成る頂端基底極性であり、もう一方はシート内の方向性で頂端基底極性に直交する平面内細胞極性（planar cell polarity: PCP）である。PCPは、コアPCP因子と呼ばれる複数のタンパク質が一細胞内で偏った分布をすることで形成される。脊椎動物においてはPCPの制御、特に方向付けにはWntの濃度勾配が重要であると考えられてきたが、分泌因子の免疫組織染色が困難であることから、Wntの分布をはじめ、WntによるPCPの詳しい制御機構は明らかになっていない。

神経板での適切なPCPの形成が、後の神経管閉鎖に必要であることが報告されている。特に*Xenopus*胚における神経板のPCPの制御には、神経板最後方に発現するWnt11が関与すると考えられている。所属研究室での先行研究から、Wnt11は神経板内では明確な濃度勾配を形成して分布するのではなく、むしろコアPCP因子と同様に偏った分布を示すことが見出された。このWnt11の分布から、Wnt11は濃度勾配を作ることでPCPを制御するのではなく、局所で直接コアPCP因子と相互作用しているのではないかと考えた。そこで、私はこの様な極性化したWnt11の分布の制御機構を明らかにするため、Wntの分布に関与する分子の候補としてHSPGに着目した。

Wnt8を集積する細胞表面上の足場がNDST1で修飾されるHS鎖によって形成されることから、Wnt11の足場形成においてもHS鎖の特異的な修飾が重要である可能性を考えた。そこでまず、過剰発現したWnt11に対して、どの様な修飾状態のHS鎖が共局在を示すか検討したところ、NDST1によって修飾されるN-脱アセチル化が豊富なHS（N-deacetyl HS）及びN-硫酸化が豊富なHS（N-sulfo HS）鎖が足場となりうることを見出した。そこで、HS鎖の修飾酵素である*ndst1*を神経板でノックダウンしたところ、神経板で見られるWnt11の細胞膜上の分布量が減少した。即ち、神経板におけるWnt11の分布にはNDST1によって修飾されるN-deacetyl及びN-sulfo HS鎖が必要であると考えられる。さらに、*ndst1*のノックダウンのコアPCP因子への影響を調べると、コアPCP因子の一つであるVangl2の膜分布が減少しており、形態的にも神経管閉鎖に異常が見られることがわかった。従って、NDST1によって修飾されるHS鎖が適切なPCPの形成に重要であることが示唆された。

次に、神経板におけるHS鎖の空間分布を検討したところ、NDST1によって修飾されるHS鎖はWnt11やコアPCP因子同様の偏りを持った分布をしていることを見出した。ここで、神経板におけるHSPGによるWnt11の分布の制御に関して、2つの可能性が考えられる。一つは、HS鎖の分布はPCPとは関係なく初めから極性化しており、その極性化したHS鎖にWnt11が結合することで、極性化したWnt11の分布が形成されるという可能性である。もう一方は、HS鎖はPCPの形成に伴い、Wnt11及びコアPCP因子と相互作用すること

で極性化し、さらにそこにWnt11を集めることで、Wnt11の極性化を促進しているという可能性である。そこで、*Xenopus*胚のアニマルキャップの領域に異所的にPCPを形成し、その際のHS鎖の分布を可視化することで、HS鎖の分布の制御機構を検討した。この結果、NDSTによって修飾される*N*-deacetyl及び*N*-sulfo HS鎖はPCPの形成に伴い、極性化した分布を示すことを見出した。

そこで、HS鎖がどのようにPCPの形成に伴い極性化するのか検討を行った。コアPCP因子であるVangl2の過剰発現及びノックダウンにより、神経板内のHS鎖の膜上の分布量がそれぞれ増加および減少すること、逆に、NDST1の過剰発現によりVangl2の膜上の分布量が増加したことから、コアPCP因子とHS鎖の間に正のフィードバック機構が存在することが示唆された。以上を総合して、NDST1によって修飾されるHS鎖はWnt11やコアPCP因子と相互作用することで極性化し、PCPを制御していると考えられる。