

氏 名 Tran Thi Hong Nguyen

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2508 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 Soluble Frizzled-related proteins promote
exosome-mediated Wnt re-secretion

論文審査委員 主 査 青木 一洋
基礎生物学コース 教授
高田 慎治
基礎生物学コース 教授
椎名 伸之
基礎生物学コース 准教授
石谷 太
大阪大学 微生物病研究所 教授

Summary of Doctoral Thesis

Name in Full : Tran Thi Hong Nguyen

Title : Soluble Frizzled-related proteins promote exosome-mediated Wnt re-secretion
(分泌型 Frizzled 様タンパク質はエキソソームによる Wnt の再分泌を亢進する)

Wnt is a secreted signaling protein, or morphogen, that participates in various aspects of embryogenesis, tissue homeostatics and tumorigenesis. Disruption of any Wnt signaling components can lead to mis-regulation in cell-cell communication, tissue patterning, and limb development. Therefore, the transduction of the Wnt signal is tightly controlled by various modulators at multiple levels. Wnt is post-translated with palmitoleic and believed to act at both short and long range from the producing to the responding cells by generating a concentration gradient. Due to the lipid modification, after secretion into the extracellular space, members of Wnt family require carriers to form complexes that shield their hydrophobic lipid adduct. For example, Wnt3a associates together to form a homo-trimer, a basic unit of a higher molecular weight complex. Alternatively, in cell culture supernatant, the heterodimers of Wnt with a serum component, afamin, are detectable. Wnt3a complexes with homotrimers or heterodimers with afamin in conditioned media can be dissociated efficiently when co-expressed with sFRP2, leading to the formation of Wnt3a/sFRP2 heterodimers. This dissociation was also observed in *Xenopus* embryo to expand the diffusion range of Wnt proteins. In addition, various models have been proposed to provide the explanation of how these Wnt signaling molecules propagate in extracellular space with lipid adduct, affecting the trafficking, diffusion, and solubility. For instance, progress has been made in explaining how secreted Wnts are carried on the extracellular spreading membranous deliverers like exosomes, on filopodium-like protrusions and morphogen binding proteins on cell surface. However, little is known about whether and/or how these different

transport systems and extracellular Wnt complexes relate to one another. In this study, using Wnt3a as a model, I addressed the question of whether various forms of morphogens are independently involved in their signaling in tissues or whether these forms affect one another in secretion and/or extracellular trafficking.

First of all, by establishing of an assay culture system to recover Wnts re-secreted on exosome, I found that re-secretion of Wnt3a on exosome is mediated by members of Frizzled-related proteins family, sFRPs. I detected a significant increase in the level of Wnt3a ligands re-secreted on exosome in the presence of sFRP1 and sFRP2, but not sFRP3, sFRP4 or exFzd8. In addition, co-culture of GFP-Wnt3a expressing L cells with sFRP2 expressing HEK293 cells or microinjection of mRNA of GFP-Wnt3a and sFRP2 observed many GFP-positive puncta, clearly localized along cell boundaries of sFRP1 and sFRP2-expressing cells. Taking advantage of live imaging, I could directly visualize the movement of mCherry-Wnt3a after incorporation into cells, by comparing colocalization with CD63, an exosome marker, fused with BFP and pH-sensitive green fluorescent protein, pHluorin.

Interestingly, taking the advantage of non-invasive approach, Analytical Ultra Centrifugation with a fluorescence detection system, AUC-FDS, which enables to examine protein complexes from cultured media without any requirement of detergent, I could measure the interaction of Wnt3a and Wnt5a, but not Wnt11 with sFRP2 secreted in culture supernatant. Since complex-forming ability is correlated with a specificity of sFRP-induced cell surface accumulation and exosome-mediated re-secretion of Wnt proteins, I hypothesized that heterodimer formation under natural conditions is involved in the accumulation of Wnt on cell membranes, which seems to be followed by exosome-mediated re-secretion.

Furthermore, our results obtained from western blotting revealed the involvements of

membrane proteins in sFRP2-mediated exosomal re-secretion of Wnt. The level of Wnt3a incorporated into the cells in the presence of sFRP2 was not reduced when endocytosis was blocked at 4°C. These surprising results suggest the binding of Wnt ligands occurred before internalization even. Surprisingly, heparan sulfate proteoglycan, HSPG, but not co-receptors LRP5/6, is crucial for the attachment of Wnt3a on the cell surface for further Wnt internalization and re-secretion of exosome. While Frizzled receptors are required for Wnt activity and re-secretion of Wnt on exosome, their effect is not specific for sFRP2-mediated exosomal re-secretion of Wnt3a. GFP-Wnt3a puncta on boundaries of sFRP2 expressing cell and the level of Wnt3a recovered in exosome fraction were dependent on HSPG, because they disappeared with expression of a membrane-bound form of Heparinase, an enzyme could cleave HS chain of HSPG both in vivo and in vitro.

Based on these above results, I propose that Wnt heterodimerization with its carrier protein, sFRP2, enhances Wnt accumulation at sugar chains on HSPGs on the cell surface, leading to increased endocytosis and exosome-mediated Wnt re-secretion.

Results of the doctoral thesis defense

博士論文審査結果

^{Name in Full}
氏名 Tran Thi Hong Nguyen

^{Title}
論文題目 Soluble Frizzled-related proteins promote exosome-mediated Wnt re-secretion

分泌性シグナルタンパク質を介した細胞間の情報伝達は、様々な組織の発生や機能維持において重要である。Wnt は代表的な分泌性のシグナルタンパク質であり、ヒトやマウスでは 19 種類の Wnt タンパク質が様々な組織の発生や機能維持に重要な働きをすることが知られている。Wnt はパルミトレイン酸により翻訳後修飾され細胞外では単量体としては存在できないことから、キャリアタンパク質と複合体を形成して輸送されるというモデルや、エキソソームの様な分泌小胞に取り込まれることによって輸送されるというようなモデル、さらに糸状仮足を介して直接細胞間で受け渡されるモデルなどが提唱されている。しかしながら、これら複数の輸送モデルの関連性については理解が進んでいない。

Tran Thi Hong Nguyen さんは、Wnt による組織の発生機構を理解する上で、Wnt の細胞外輸送の制御機構を解明することが不可欠であると考え、この問題に取り組んだ。特に、キャリアタンパク質である sFRP による Wnt の輸送と、エキソソームによる輸送の関連性について焦点を当てた。まず、Tran さんは、培養細胞に添加した Wnt3a がエキソソームに取り込まれて再分泌されることを見出した。この再分泌は Wnt3a のキャリアタンパク質である sFRP1 や sFRP2 の添加により亢進したが、sFRP3 や sFRP4 にはその様な効果はなかった。また、この再分泌の亢進には、Wnt の受容体である Frizzled や、細胞表面上に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンの糖鎖が必要であった。さらに、各種 Wnt と sFRP の複合体形成を分析超遠心法により解析したところ、Wnt3a や Wnt5a は sFRP2 とは複合体を形成するものの、sFRP3 や sFRP4 とはしなかった。一方、Wnt11 はどの sFRP 分子とも結合せず、エキソソームを介した再分泌の亢進も認められなかった。そこで、sFRP と複合体を形成できない Wnt3a の変異体を用いて解析を進めたところ、sFRP2 による細胞膜への結合とエキソソームによる再分泌の亢進が起きないことが示された。これらの結果から、sFRP と複合体を形成することによって、Wnt3a の細胞膜上へのリクルートとエキソソームを介した再分泌が亢進されるものと結論された。

以上の研究成果は、異なる Wnt の輸送機構の関連性を明らかにした初めての例であり、組織内におけるシグナル伝達の制御機構の理解に大きく貢献する研究であると言える。また、細胞間輸送の観点から Wnt と sFRP 間の特異性の違いを初めて明らかにした点においても大きな価値がある。本研究で提示されたコンセプトは、Wnt だけに留まらず多くの分泌シグナルにも当てはめ得るものであり、発生生物学や細胞生物学を含む生物学の幅広い分野にインパクトを与えることが期待される。それとともに、本論文の主たる内容は既に国際誌に概ね受理されており、当該分野の研究者からも評価されている。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。