

分泌性シグナル蛋白質 Wnt8 の分布とシグナル受容を制御する HS のクラスター構造

三井 優輔

自然科学研究機構 基礎生物学研究所 分子発生学研究部門

【要旨】

発生生物学において、濃度勾配によって細胞や組織に位置の情報を与える物質、すなわち「モルフォゲン」は中心的命題の一つである。分泌性シグナル蛋白質の Wnt8 は初期発生における領域化に関わることが知られ、モルフォゲンとして濃度勾配を形成することで働くと考えられている。しかし、Wnt 蛋白質が実際どのように分布しているかの知見は乏しい。我々がアフリカツメガエル初期胚において Wnt8 蛋白質を可視化することで空間的分布を解析したところ、予想されたように Wnt8 蛋白質の分布は広い範囲にわたって濃淡を示していた。しかし個々の細胞がはっきり見えるような高倍率で観察すると、Wnt8 は細胞表面にドット状に分布していた。このドット状の分布はヘパラン硫酸 (HS) を heparitinase で分解したところ、消失したことから HS 鎖依存的と考えられた。そこでツメガエル胚で抗 HS 抗体の NAH46 (連続した GlcA-GlcNAc 構造を認識) および HepSS-1 (連続した GlcA-GlcNS 構造を認識) の免疫染色を行ったところ、どちらも細胞表面にクラスター状の染色像を呈した。しかしそのパターンは大きく異なっており、同一細胞上でも N-acetyl-rich HS クラスター、N-sulfo-rich HS クラスターというべきものが存在することが示唆された。類似した HS 鎖の分布はヒト由来の HeLa 細胞でも観察され、一般性が示唆された。このことは従来知られている NA/NS ドメインモデルとは違った助スケールである細胞膜上において、HS 鎖がどのように組織化されているか、の基礎的な知見になりうると考えている。

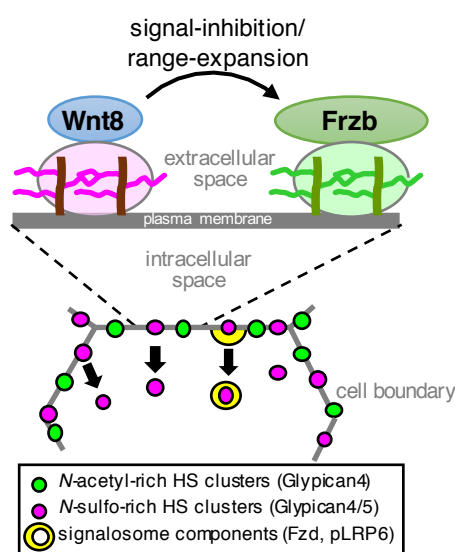
HS 鎖はコア蛋白質に由来すると考えられるので、今回見いだした HS クラスターのコア蛋白質の同定を試みた。その結果、GPI アンカーを有する Glypican4 (Gpc4) および Glypican5 (Gpc5) がコア蛋白質であることが示された。興味深いことに、Gpc4 は N-acetyl-rich、N-sulfo-rich HS の両方を生じる一方、Gpc5 は主に N-sulfo-rich HS を生じ、N-acetyl-rich HS には寄与しないことが示唆された。このようなコア蛋白質依存的な HS 鎖の修飾の違いが生じる機構は現在のところ不明であるが、将来的な解明が望まれる。また 2 種類の HS の機能的な違いとして、N-acetyl-rich HS は N-sulfo-rich HS よりも細胞内に取り込まれやすいことが示唆された。

これら 2 種類の HS のうち、N-sulfo-rich HS は Wnt8 の染色とよく一致し、ツメガエル初期胚では Wnt8 の足場として機能することが示唆された。実際、N-sulfation を促進する酵素である *ndst1* の過剰発現および機能阻害は Wnt8 の分布に対して、そ

れぞれ促進的および抑制的に作用した。さらに解析を進めた結果、N-sulfo-rich HS クラスタは Wnt8 が細胞にシグナルを伝える際に必要な受容体やその他の因子を集めさせ「シグナロソーム」を形成する際の足場構造であることが示唆された。

一方 N-acetyl-rich HS にも Wnt シグナル系における機能があることが示唆された。それは Wnt8 の阻害因子として知られる Frzb 蛋白質の足場になることである。Frzb は分泌性の蛋白質であり、Wnt 蛋白質に結合してシグナルを阻害する活性がある。我々の以前の研究で、Frzb の分布は広い一方、Wnt8 は単独では分布が狭いこと、さらに Frzb 存在化では Wnt8 の分布範囲が拡大することが示されている (Mii & Taira, 2009)。上に述べた N-acetyl-rich HS と N-sulfo-rich HS の細胞内への取り込みの違いは、Frzb による Wnt シグナルの阻害および Wnt8 の分布範囲の拡大をうまく説明する。

このように、今回報告する 2 種類の HS クラスタは一つのシステムとして Wnt 蛋白質の分布とシグナル受容に関わると考えられる。



モデル図

Wnt8 は N-sulfo-rich HS 上に局在し、シグナロソームを形成することで細胞にシグナルを伝達する。また N-sulfo-rich HS は活発に細胞内に取り込まれるため、Wnt8 の分布範囲は狭くなる。一方 N-acetyl-rich HS は Frzb が細胞膜上に分布する際の足場となる。このことは Frzb による、シグナルの阻害および Wnt8 の分布範囲の拡大をうまく説明する。

【参考文献】

1. Yusuke Mii & Masanori Taira Secreted Frizzled-related proteins enhance the diffusion of Wnt ligands and expand their signalling range. *Development* **136**, 4083-8 (2009).
2. Yusuke Mii, Takayoshi Yamamoto, Ritsuko Takada, Shuji Mizumoto, Makoto Matsuyama, Shuhei Yamada, Shinji Takada & Masanori Taira Roles of two types of heparan sulfate clusters in Wnt distribution and signaling in *Xenopus*. *Nat. Commun.* **8**, 1973 (2017).