

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790095

研究課題名（和文） 形態形成因子 Wnt のシグナル伝達を調節する硫酸化糖鎖

研究課題名（英文）

Regulation of Wnt-3a signaling and diffusion by sulfated glycosaminoglycans

研究代表者 灘中 里美 (Nadanaka Satomi)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60378578

研究成果の概要（和文）：発生過程を統合的に制御する鍵因子として働く Wnt シグナルの強弱を微細に調節することは、細胞の運命決定、恒常性の維持、代謝調節のために重要であるので、申請者らは、細胞表面や細胞外マトリクスに存在する硫酸化糖鎖による Wnt シグナルの調節に焦点を当てて研究を行った。Wnt に高親和性を示す硫酸化糖鎖構造を合成するコンドロイン 4-O-硫酸基転移酵素-1 (C4ST-1)によって Wnt シグナルや Wnt 分子の拡散が調節されるが、一方で、C4ST-1 は Wnt シグナルの下流で転写調節を受ける。本研究では、Wnt シグナルによる C4ST-1 遺伝子の発現調節機構を明らかにすることを目的として、C4ST-1 遺伝子の 5' 上流に存在する Wnt シグナル応答配列を決定した。

研究成果の概要（英文）：

Wnt signaling is implicated in numerous physiological events such as morphogenesis. Here we found *cis*-acting element implicated in the transcriptional regulation of chondroitin 4-O-sulfotransferase (C4ST-1) gene by Wnt signaling,

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学

キーワード：生化学・糖鎖生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) コンドロイチン-4-O-硫酸基転移酵素 (C4ST-1) の Wnt シグナル調節における重要性

◇C4ST-1 遺伝子欠損細胞において Wnt シグナルが減弱しており、これは C4ST-1 遺伝子の導入によってレスキューできることを明らかにしていた

◇C4ST-1 によって合成される特別な硫酸化糖鎖構造を培養系に共存させると Wnt-3a シグナルが影響を受けることを明らかにしていた

◇C4ST-1 によって合成される特別な硫酸化糖鎖構造と Wnt-3a タンパクが強く結合することを明らかにしていた

(2) Wnt シグナルによるコンドロイチン-4-O-硫酸基転移酵素(C4ST-1) の発現調節
◇ Wnt-3a を過剰発現した細胞で C4ST-1 遺伝子の発現が顕著に低下することを明らかにしていた

◇Wnt シグナルによる C4ST-1 の発現抑制は細胞表面糖鎖の構造改変を引き起こした結果、細胞表面や細胞外マトリクスの硫酸化糖鎖に結合していた Wnt 分子の拡散を促進することを明らかにしていた。

2. 研究の目的

(1) Wnt シグナルの調節や Wnt 分子の拡散を調節する C4ST-1 の発現調節機構を明らかにする

(2) C4ST-1 によって合成される硫酸化糖鎖構造が、乳がん細胞の Wnt シグナルと浸潤能に与える影響を調べる

(3)硫酸化糖鎖が Wnt とその受容体の複合体形成に与える影響について調べる

3. 研究の方法

(1) C4ST-1 遺伝子の 5'上流をルシフェラーゼ遺伝子の 5'上流に連結したレポーターベクターを作成し、これの欠失変異体を作成することで、Wnt-3a に応答性を示すシス配列を絞り込んだ。

(2) C4ST-1 によって合成される硫酸化糖鎖構造とヒト乳がん細胞を共存させた条件で、マトリゲルインベージョンチャンバーアッセイを行い、硫酸化糖鎖の乳がん細胞の浸潤能に与える影響について調べた。また、乳がん細胞の増殖活性や Wnt シグナル活性に与える影響についても調べた。

(3) Wnt-3a の受容体である Frizzled-4 と EGFP の融合タンパク質の発現プラスミドを構築し、細胞表面の硫酸化糖鎖の違いによる受容体の挙動の変化を観察する。

4. 研究成果

(1) C4ST-1 遺伝子の 5'上流をルシフェラーゼ遺伝子の 5'上流に連結したレポーターベクターを作成し、これの欠失変異体を解析することによって、CTCCC 配列が Wnt シグナルによる C4ST-1 遺伝子の発現調節に関わることがわかった。
この配列に結合する転写抑制因子を TESS データベースによって検索したところ、CTCF が結合することがわかったので、現在、CTCF によって C4ST-1 遺伝子の発現が調節されるかどうかについて調べている。

(2) C4ST-1 によって合成される硫酸化糖鎖構造が、ヒト乳がん細胞の浸潤能や増殖、Wnt シグナル活性に与える影響を調べた結果、C4ST-1 によって合成される硫酸化糖鎖構造は Basal-like 型に分類される乳がん細胞

の Wnt シグナル活性を上昇させることで、浸潤能を著しく亢進させることがわかった。また、増殖能には大きな影響を与えなかった。現在、C4ST-1 によって合成される硫酸化糖鎖構造によって浸潤が亢進する乳がん細胞を選択し、硫酸化糖鎖の標的分子の同定を試みている。

(3)硫酸化糖鎖が Wnt とその受容体の複合体形成に与える影響を調べるために、Wnt-3a の受容体である Frizzled-4 と EGFP の融合タンパク質の発現プラスミドを構築し、その発現を確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Nadanaka, S., Kinouchi, H., Taniguchi-Morita, K., Tamura, J., and Kitagawa, H. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 4199-41208

Down-regulation of chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 by Wnt signaling triggers diffusion of Wnt-3a.

2. Sato, Y., Nadanaka, S., Okada, T., and Mori, K. (2011) *Cell Struct. Funct.*, 36, 35-47

Luminal domain of ATF6 alone is sufficient for sensing endoplasmic reticulum stress and subsequent transport to the Golgi apparatus.

3. Tamura, J., Tsutsumishita-Nakai, N., Nakao, Y., Kawano, M., Kato, S., Takeda, N., Nadanaka, S., and Kitagawa, H. (2012) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22, 1371-1374

Synthesis and interaction with midkine of biotinylated chondroitin sulfate tetrasaccharides.

4. Nadanaka, S. and Kitagawa, H. (2011) *Seikagaku*, 83, 1027-1031

Regulation of Wnt-3a signaling and diffusion by sulfated glycosaminoglycans

[学会発表] (計 2 件)

1. 灘中 里美、染谷 健次、宮崎 泰太、北川 裕之
硫酸化糖鎖による形態形成因子 Wnt のシグナル伝達と拡散の調節機構
第30回日本糖質学会年会
2011. 7. 11~2011.7.13、長岡

2. Nadanaka, S., Kinouchi, H., Taniguchi-Morita, K., Tamura, J., and Kitagawa, H.

Down-regulation of Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 by Wnt Signaling Triggers Diffusion of Wnt-3a

7th International Conference on Proteoglycans

ans
16th-20th October 2011, Sydney, Australia

[その他]
ホームページ等
<http://www.kobepharma-u.ac.jp/~biochem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

灘中 里美 (Nadanaka Satomi)
神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号 : 60378578

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし