

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：63904

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24870031

研究課題名(和文) Wnt モルフォゲンの動態と受容の発生・細胞生物学的解析

研究課題名(英文) Dynamics and signal reception of the Wnt morphogen.

研究代表者

三井 優輔 (Mii, Yusuke)

基礎生物学研究所・分子発生学研究部門・助教

研究者番号：70634129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000 円、(間接経費) 690,000 円

研究成果の概要(和文)：1. 蛍光相関分光法および光変換後蛍光減衰法による定量的解析に基づき、結合成分と自由拡散成分の2状態を考慮する、モルフォゲンの細胞外挙動の数理モデルを構築した。これは従来の1状態モデルでは記述しづらい、モルフォゲン分子の局所的集積をうまく記述するものである。

2. *Xenopus* の Wnt8 および Wnt11 に対する抗体を作成し、内在性の Wnt 蛋白質の分布を可視化した。内在性の Wnt 蛋白質はドット状の分布を示し、N-sulfo 修飾を受けたヘパラン硫酸と共局在を示した。またヘパラン硫酸の N-sulfo 修飾に関わる酵素である NDST1 が内在性の Wnt 蛋白質の適切な分布に必要であると示唆された。

研究成果の概要(英文)：1. Based on quantitative analyses including fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and fluorescence decay after photoconversion (FDAP), a mathematical model of extracellular behaviour of morphogens with two states (freely diffusing and bound molecules) was constructed. This model well describes accumulation of morphogen molecules, which is difficult with previous one-state models with diffusing molecules only.

2. Antibodies against *Xenopus* Wnt8 and Wnt11 were generated and using these antibodies, distribution of endogenous Wnt proteins were visualized. Endogenous Wnt proteins show punctate distributions similar to those of exogenous Wnt proteins. Puncta of endogenous Wnt proteins were colocalized with N-sulfo heparan sulfate (HS). It is also suggested that NDST1, which is involved in N-sulfo HS formation, is required for proper distribution of endogenous Wnt proteins.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：Wnt ヘパラン硫酸

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の秩序だった形態が形成される上で、位置情報は必須だと考えられ、位置情報は古くから発生生物学における中心的命題の一つである。細胞あるいは組織に対して、濃度勾配により位置情報を与える物質「モルフォゲン」の分子の実体として Wnt 蛋白質は動物の発生過程で重要な役割を果たすことが知られている。しかしながら、濃度勾配形成において Wnt をはじめとするモルフォゲン分子がどのように振る舞うかという根本的な問題についての理解は未だ十分ではない。

このような中で、私は人工リガンドおよび人工レセプターを用いた一種の再構成系の実験から、分泌性蛋白質にとっては細胞外分布が見られることは細胞表面等に結合していることに他ならないことを見いだした。またアフリカツメガエル胚での過剰発現系において Wnt8 蛋白質が細胞間隙にドット状に分布することを見いだした。このことは上述の再構成系の実験結果を考慮すると細胞表面に Wnt 蛋白質を集積するドット状の構造があることを示唆するはずである。その候補因子として内在性のヘパラン硫酸がドット状の微小構造を形成していることを見だし、ヘパラン硫酸ナノ構造 (HSNS) と命名した。さらに過剰発現系での Wnt8 のドットが N-sulfo 修飾を受けた HSNS に共局在することを見いだした。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、モルフォゲンとして知られる分泌性シグナル蛋白質の Wnt に蛍光蛋白質を融合することでリガンドそのものを可視化し、アフリカツメガエル初期胚の組織中でどのように振る舞うか (拡散等) について定量的解析を行い、更にそれを元に数理モデルを構築することでモルフォゲンの細胞外での挙動の定量的・理論的理解を目指す。

(2) 内在性の Wnt 蛋白質の分布を解析する。これまで脊椎動物においては *in vivo* で内在性の Wnt がどのように分布しているかに関する知見は皆無に等しい。本研究では良質の抗体を作成することで Wnt 蛋白質の可視化を試みる。

またドット状に局在する Wnt の役割を解析する。

(3) Wnt の分布を制御しうる HSNS の形成過程の解析を行う。これまでの教科書的知見としては、糖鎖であるヘパラン硫酸の修飾に関して、一つの糖鎖分子内に N-sulfo 化が進んだドメイン (NS ドメイン) と生合成過程での初期状態である N-acetyl 状態が多く保たれたドメイン (NA ドメイン) が存在することが知られている。しかしながら、私のこれまでの観察からは、N-sulfo 化の度合いが HSNS ごと

に違っている可能性が示唆される。このことは細胞表面に異なる結合特異性を持つ微小構造が存在することを意味し、例えば、分布範囲等の分泌性蛋白質の性状の制御を考える上で重要である。そこで本研究では N-sulfo 化を触媒する酵素である NDST1 に着目して、HSNS の形成過程を理解することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 蛍光相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy, FCS) を用いて、細胞外空間において、Wnt リガンドがどのような挙動を示すか解析する。その結果などをもとに数理モデルを構築し、モルフォゲン分子の細胞外における挙動を理解する。

(2) 内在性の Wnt 蛋白質の分布を解析するために免疫染色に使用できる抗体を作成し、免疫染色によって Wnt 蛋白質を可視化する。また他の因子と共染色を行うことで、局在する Wnt のもつ生理的な意味を探る。

(3) さらに Wnt 蛋白質の分布を制御しうる新規の細胞構造、ヘパラン硫酸微小構造 (HSNS) について、その性状を N-sulfo 修飾を触媒する酵素である NDST1 に着目して解析を行う。そのために NDST1 の過剰発現実験、アンチセンスモルフォリノオリゴ (MO) による発現阻害実験を行う。また NDST1 に対する抗体を作成し、内在性の NDST1 の局在性を検討する。

4. 研究成果

(1) 蛍光相関分光法および光変換後蛍光減衰法による定量的解析から、細胞外の Wnt 蛋白質は結合成分と自由拡散成分の 2 状態から成ることが示唆された。さらに量的には自由拡散成分は結合成分に比べ著しく少ないことが示唆された。そこで結合成分と自由拡散成分の 2 状態を考慮する、モルフォゲンの細胞外挙動の数理モデルを構築した。これは従来の 1 状態モデルでは記述しづらい、モルフォゲン分子の局所的集積 (ドット状に N-sulfo HSNS と共局在する Wnt 蛋白質等) をうまく記述するものである。

(2) アフリカツメガエル (*Xenopus*) の Wnt8 および Wnt11 に対する抗体を作成し、内在性の Wnt 蛋白質の分布を可視化した。内在性の Wnt 蛋白質は過剰発現系と同様に、ドット状の分布を示し、N-sulfo 修飾を受けたヘパラン硫酸と共局在を示した。

特に非標準経路シグナルを主に活性化すると考えられる Wnt11 はファロイジン染色で可視化される F-actin と局所的に非常に強く共局在が認められた。このことから、局所において Wnt11 がアクチンの重合を調節することで細胞形態・極性、さらには形態形成運動

が調節されている可能性が考えられる。

(3)ヘパラン硫酸の N-sulfo 修飾に関わる酵素である NDST1 の過剰発現においては、N-sulfo HSNS が増加し、N-acetyl HSNS が減少した。逆に *ndst1MO* による発現阻害実験では N-sulfo HSNS が減少する一方、N-acetyl HSNS は増加した。さらに NDST1 の過剰発現細胞の周囲に Wnt8 および Wnt11 が集積することが認められ、Wnt 蛋白質が N-sulfo 化されたヘパラン硫酸に特異的に結合することが支持された。

内在性の Wnt に対する NDST1 の発現阻害の影響を検討したところ、*ndst1MO* の注入領域では、細胞外での内在性の Wnt8 および Wnt11 蛋白質の減少が認められ、内在性の Wnt 蛋白質の適切な分布に NDST1 が必要であることが示唆された。

さらに *ndst1MO* の表現型は原腸形成運動の異常を示し、*wnt11MO* の表現型に類似していた。Wnt11 が N-sulfo HSNS と共局在することから、Wnt11 のドット状の集積が形態形成運動の制御に関与する可能性が示唆される。

NDST1 はゴルジ体に局在すると考えられている。そこで内在性の NDST1 の分布を本研究で作成した抗体を用いて、ゴルジ体マーカーである GM130 と共染色して検討したところ、ともに細胞内にドット状の染色が認められ部分的に共局在していた。興味深いことにドット状の GM130 の染色のうち、NDST1 と共局在するものとしめないものが認められた。このこと及び、過剰発現・発現阻害実験から NDST1 ポジティブなゴルジ小胞から N-sulfo HSNS が形成される可能性が示唆された。

以上より、本研究では内在性の Wnt が細胞間隙においては過剰発現と同様にドット状に集積し、N-sulfo HSNS と共局在することを明らかにした。そしてモルフォゲン一般に関して、これまで理解が十分ではなかった局所的な集積機構を数理モデルで記述することに成功した。さらに N-sulfo HSNS の形成に必要な酵素として NDST1 を同定し、NDST1 が内在性の Wnt 蛋白質の適切な分布に必要であることが示唆された。そして NDST1 の機能解析及び、内在性 NDST1 蛋白質の細胞内局在の解析から、新たなヘパラン硫酸糖鎖の修飾様式が示唆された。

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0件)

〔学会発表〕(計4件)

(1) Yusuke Mii, Ritsuko Takada, Masanori Taira, Shinji Takada, Spatial localization

of noncanonical Wnt proteins during the early *Xenopus* embryogenesis.

アフリカツメガエル初期胚における非標準経路Wnt蛋白質の空間的局在、第47回日本発牛生物学会大会、2014年5月27日～2014年5月30日、ウイック愛知、名古屋

(2) Yusuke Mii, Heparan sulfate nanostructures regulate distribution and signal reception of secreted proteins., EMBO Workshop Morphogen Gradients 2013, 2013年6月26～2013年6月29日, Lady Margaret Hall, Oxford, (イギリス)

(3) 三井 優輔, Heparan sulfate nanostructures (HSNSs)によるWntモルフォゲンの分布およびシグナル受容制御、第85回日本生化学会大会(招待講演)、2012年12月14日、福岡国際会議場、福岡市

(4) Yusuke Mii, Heparan sulfate nanostructures regulate the range and signal reception of the Wnt morphogen, via endocytosis and signalosome formation., 14th International *Xenopus* Conference, 2012年9月9日～2012年9月13日, Belambra Clubs, Giens Peninsula (フランス)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.nibb.ac.jp/cib2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井 優輔 (MII, Yusuke)
基礎生物学研究所・分子発生学研究部門・助教

研究者番号：70634129

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：