

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840032

研究課題名(和文)GPC4のヘパラン硫酸によるWntシグナル経路の選択的活性制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the function of heparan sulfate in GPC4 as a selective Wnt signal regulator

研究代表者

金岩 知之(TOMOYUKI, KANEIWA)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・招へい研究員

研究者番号：60647519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Wntは、細胞の増殖や分化など様々な細胞機能を制御しており、複数のシグナル経路が存在している。しかし、Wntシグナル経路の選択的な制御機構はほとんどわかっていない。私共の研究室はHS鎖を側鎖に持つグリピカン(GPC)4が、Wntシグナル経路の選択的な制御に関与していることを見出した。そこで、本研究はGPC4に着目し、Wntシグナル経路の選択的活性制御機構の解明を目指した。その結果、GPC4はHS鎖を介してWntシグナル経路を活性化していること明らかにした。さらに詳細な側鎖構造の解析の結果、HS糖鎖の構成二糖単位ではなくその長さが、Wntシグナル経路の選択的な制御に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Wnt plays important role in many cell functions through multiple wnt signaling pathways. However, how the multiple signaling pathways are selectively regulated is not clear. Previously our results showed that glypican (GPC)4 was involved in the wnt signaling pathways selectively. Therefore, in this research, the selective activation mechanisms of wnt signaling pathways by GPC4 were investigated. The results showed that GPC4 regulated wnt signaling pathways through heparan sulfate (HS) side chains. The HS disaccharide compositions were not important but the length of HS chain is seems to be crucial for the regulation of wnt signaling pathways by GPC4.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Wnt グリピカン ヘパラン硫酸

### 1. 研究開始当初の背景

Wnt は線虫から哺乳類まで生物種を超えて保存され、初期発生や形態形成、細胞の増殖や分化などを制御する分泌性糖タンパク質である。細胞内伝達機構である Wnt シグナル経路は、 $\beta$ -カテニンを介して遺伝子発現を制御する  $\beta$ -カテニン経路、細胞内の平面内極性を制御する PCP 経路、 $Ca^{2+}$  の細胞内動員を促進する  $Ca^{2+}$  経路の少なくとも 3 種類が存在している (図 1)。また、Wnt 遺伝子はヒトやマウスのゲノム上に 19 種類存在し、さらに、Wnt 受容体として 7 回膜貫通型 Frizzled (Fz) が 10 種類、その共役受容体として、1 回膜貫通型 LRP5/6 や Ror1/2、Ryk 等が存在する (図 1)。しかし、この多様な Wnt と受容体の組み合わせが、どのようにして特定のシグナル経路を選択的に活性化するのか (選択的活性制御) は不明であり、Wnt と受容体の親和性を調整する第三の因子の存在が考えられている。

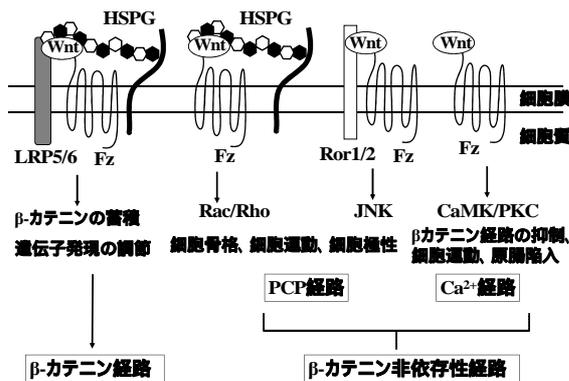


図 1 Wnt シグナル経路の多様性

Wnt が活性化する経路は  $\beta$ -カテニン経路、PCP 経路、 $Ca^{2+}$  経路が存在する

多糖鎖であるヘパラン硫酸 (HS) はウロン酸とグルコサミンの二糖が交互に 50-100 回程度繰り返し重合した非常に長い直鎖状の多糖鎖であり、コアとなるタンパク質に共有結合した HS プロテオグリカン (HSPG) として、

細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に存在している。HSPG は HS 鎖を介して Wnt の濃度勾配を形成し、 $\beta$ -カテニン経路やそれ以外の Wnt シグナル経路にも関与することが知られている。このため HSPG は Wnt シグナル経路を選択的に活性化する候補の 1 つと考えられる。

### 2. 研究の目的

多糖鎖である HS 鎖は、共役受容体として Wnt シグナルに関わっていることが知られている。私共の研究室は HSPG の 1 つであるグリピカン (GPC) 4 が、脂質ラフト領域に存在しているときと非脂質ラフト領域に存在しているときとは、異なる Wnt シグナル経路を制御していることをこれまでに見出している。しかし、どのようにして GPC4 が Wnt シグナル経路を選択的に制御しているかは不明である。そこで、本研究は脂質ラフト領域と非脂質ラフト領域に存在している、それぞれの GPC4 の HS 鎖に着目し、どのようにして GPC4 が Wnt シグナル経路の選択的活性化を制御しているかを明らかにすることを目的としている。

### 3. 研究の方法

GPC4 は GPI アンカータンパク質であり脂質ラフト領域と非脂質ラフト領域の両方に存在している。GPC4 の C 末端側を 1 回膜貫通型 HSPG であるシンデカン (SDC) 1 の C 末端側に変異させた GPC4/SDC1 は、脂質ラフト領域には存在せず非脂質ラフト領域にのみ存在し、GPC4 とは異なる Wnt シグナル経路を活性化する。そこで、両者の Wnt シグナル経路の制御機能の違いを両者の HS 鎖の糖鎖構造単位に着目し解析を行う。

### 4. 研究成果

初めに GPC4 による Wnt シグナルの活性化に

HS鎖が関わっているかを GPC4 を安定的に発現させた HeLa 細胞を用いて確かめた。GPC4 を発現させた細胞では、Wnt3a の刺激により LRP6 のリン酸化がコントロールと比較して亢進した。しかし、HS 分解酵素処理により HS 鎖を除去すると、Wnt3a による LRP6 のリン酸化は著しく少なかった(図 2)。これにより、GPC4 はその HS 鎖を介して Wnt シグナル経路を活性化していることが明らかとなった。

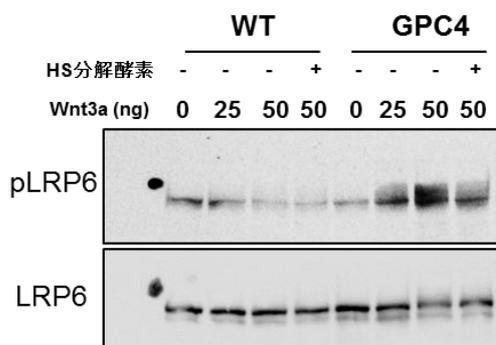


図 2 HS 鎖を介した Wnt シグナル経路の活性化

GPC4 を発現した HeLa 細胞での Wnt シグナルの活性化は、HS 分解酵素処理により減少する。

次に、HeLa 細胞に発現させた GPC4 と GPC4/SDC1 それぞれを精製後、両者の HS 鎖を HS 分解酵素で二糖単位にまで分解し、詳細な二糖単位の構造を陰イオン交換 HPLC を用いて解析した。その結果、両者の HS 鎖を構成する二糖単位構造に違いは見られなかった。しかし、タンパク量あたりの HS 二糖構造の割合は GPC4/SDC1 の方が二倍程度多く検出された(表 1, 2)。

表 1 HeLa 細胞に発現させた GPC4 のヘパラン硫酸の二糖組成 (HeLa 細胞のタンパク量として 1mg 使用)

	mol (%)
HexUA-GlcNAc	7.48 (82.7)
HexUA-GlcNAc(6S)	0.48 (5.4)
HexUA-GlcN(NS)	0.71 (7.9)
HexUA-GlcN(NS,6S)	0.04 (0.5)
HexUA(2S)-GlcN(NS)	0.12 (1.3)
HexUA(2S)-GlcN(NS,6S)	0.21 (2.4)
Total	9.05

HexUA, GlcNAc, GlcN はそれぞれ不飽和ウロン酸、N-アセチルグルコサミン、グルコサミンを表し、2S, 6S, NS はそれぞれ 2-O-sulfate, 6-O-sulfate, 2-N-sulfate を表す。

表 2 HeLa 細胞に発現させた GPC4/SDC1 のヘパラン硫酸の二糖組成 (HeLa 細胞のタンパク量として 1mg 使用)

	mol (%)
HexUA-GlcNAc	14.0 (82.5)
HexUA-GlcNAc(6S)	0.9 (5.2)
HexUA-GlcN(NS)	1.3 (7.9)
HexUA-GlcN(NS,6S)	0.1 (0.5)
HexUA(2S)-GlcN(NS)	0.3 (1.5)
HexUA(2S)-GlcN(NS,6S)	0.4 (2.3)
Total	17.0

このことから、GPC4 と GPC4/SDC1 の HS 鎖の鎖長の違いが示唆され、それが両者の Wnt シグナル伝達の違いを制御していると予想された。

## 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 1 件)

Yamamoto H, Awada C, Matsumoto S, Kaneiwa T, Sugimoto T, Takao T, Kikuchi A.

Basolateral secretion of Wnt5a in polarized epithelial cells is required for apical lumen formation.

J Cell Sci. 128(5):1051-63. 2015

(査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

山本英樹、花木英明、辻本育子、金岩知之、  
栗田ちひろ、高尾敏文、菊池章

極性化された上皮細胞における Wnt の分泌  
制御機構

第 86 回日本生化学大会、2013 年 9 月 11 日、  
パシフィコ横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molbiomo/recruit.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

金岩 知之 (KANEIWA TOMOYUKI)

大阪大学・医学系研究科・招へい研究員

研究者番号 : 60647519

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし