

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790280

研究課題名(和文) Wntの上皮細胞における選別輸送の制御機構の解析

研究課題名(英文) Selective secretion mechanism of Wnt in polarized epithelial cells

研究代表者

坂根 洋(Sakane, Hiroshi)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：80457291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：極性化した上皮細胞において、Wnt3aの側底面への選別輸送には膜蛋白質であるWntless、クラスリンやクラスリンアダプター蛋白質が関与することを明らかとし、Wntlessは側底面に主に局在することを明らかとした。Wnt11は上皮細胞の頂端面へ選別輸送されること、また、Wntに付加されている糖鎖もWntの選別輸送に関与することを明らかとした。さらに、syntaxin4に結合するα-taxilinがトランスフェリン受容体のリサイクリングに関与することを明らかとした。以上の知見は、Wntの上皮細胞における選別輸送の制御機構および細胞内小胞輸送の制御因子の機能の一端を明らかとしたものである。

研究成果の概要(英文)：Selective basolateral secretion of Wnt3a in polarized epithelial cells was regulated by Wntless, clathrin and clathrin adaptor proteins. We found that Wntless was localized to the basolateral membrane. We also found that Wnt11 was sorted to the apical side and glycosylation was involved in the selective secretion of Wnt proteins. Furthermore, we found that α-taxilin, a syntaxin4 binding protein, was involved in the recycling of transferrin receptor. These results clarified a part of mechanism of selective secretion of Wnt in polarized epithelial cells and the function of regulator of intracellular vesicle traffic.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞内シグナル伝達 Wnt リサイクリング

1. 研究開始当初の背景

分泌性糖蛋白質である Wnt は、細胞膜上の受容体と結合して、細胞の増殖や分化などの細胞機能を制御しており、Wnt シグナルの異常は発癌と密接に関連することが知られている。Wnt シグナルにおいて、 β -カテニンの安定化を伴う β -カテニン経路は遺伝子の発現に関与することが知られており、Wnt3a によって活性化される一方で、Dkk1 によって抑制される。また、細胞運動や細胞極性を制御する β -カテニン非依存性経路は Wnt11 によって制御されることが知られている。私共は、極性化した上皮細胞において、Wnt が頂端面あるいは側底面に選別輸送されることを見出した。Wnt の選別輸送の制御機構を解析することは、上皮細胞同士および上皮細胞-結合組織間における Wnt シグナル伝達の機能を解明する上で重要であると考えられる。

(1) 私共はこれまでに、Wnt3a が極性化した上皮細胞において側底面に選別輸送されることを見出しているが、側底面への選別輸送の制御機構については明らかではない。また、Wnt11 が極性化した上皮細胞において頂端面に選別輸送されることを見出したが、頂端面への選別輸送の制御機構については明らかではない。

(2) 私共はこれまでに、極性化した腸管上皮細胞において、Dkk1 は側底面へ選別輸送されることを見出した。しかしながら、側底面への選別輸送において重要な機能を持つ t-SNARE である syntaxin4 および syntaxin4 結合蛋白質が Dkk1 の選別輸送に関与するか否かは明らかではない。

2. 研究の目的

上皮細胞における Wnt 関連蛋白質の選別輸送において、明らかとなっていない以下の点について解析を行う。

(1) MDCK 細胞における Wnt3a の側底面への選別輸送機構、および Wnt11 の頂端面への選別輸送機構について解析する。

(2) Dkk1 の腸管上皮細胞における選別輸送への syntaxin4 結合蛋白質の機能について解析する。

3. 研究の方法

上皮細胞における Wnt および Dkk1 の選別輸送機構を解明するため、以下の方法で解析を行った。

(1) Wnt3a あるいは Wnt11 を安定発現する MDCK 細胞を作成し、頂端面あるいは側底面への選別輸送を検討した。MDCK 細胞については特殊コートされたフィルター上で培養することで、極性化した際、頂端面あるいは側底面に運ばれた蛋白質を検出できるよう工夫した。Wnt3a および Wnt11 は分泌性蛋白質であるため、細胞表面にとどまっている Wnt3a および Wnt11 については、細胞表面の蛋白質

をビオチン化し、ビオチン化蛋白質中に含まれている Wnt3a と Wnt11 を観察することで検出した。培地中に分泌されたものについては Wnt を吸着する Blue sepharose を用いて回収した。Wnt3a の選別輸送におけるクラスリン、クラスリンアダプター蛋白質や Wntless などの機能を調べる際は、それぞれの蛋白質の発現を siRNA により抑制することで検討した。また、Wntless の選別輸送を調べる際には Wntless を安定発現する MDCK 細胞を作成した。Wnt11 に付加されている複合型糖鎖の役割を検討するために、Wnt3a の N 末端領域を Wnt11 の複合型糖鎖修飾を受ける N 末端領域と入れ換えた Wnt11/Wnt3a を作成し、Wnt11/Wnt3a の選別輸送を検討した。

(2) 腸管上皮細胞において、syntaxin4 結合蛋白質である α -taxilin の発現を siRNA により抑制し、Dkk1 の側底面への分泌について検討した。

4. 研究成果

(1) MDCK 細胞において、Wnt3a は側底面の細胞表面上に大部分が存在しており、頂端面の培地中には一部のみが分泌されていたことから、Wnt3a は側底面に選別輸送されていることがわかる (図 1)。また、Wnt3a の輸送は Wntless の発現抑制により、阻害されることが明らかとなった (図 2)。さらに、Wnt3a の輸送はクラスリンあるいはクラスリンアダプター蛋白質の発現抑制により、阻害されることが明らかとなり、Wnt3a の選別輸送について新たな知見を得ることができた (図 3)。膜蛋白質である Wntless の局在を MDCK 細胞において検討したところ、主に側底面に局在することが明らかとなり、Wnt の分泌に関与する Wntless の性質について新たな知見を得ることができた (図 4)。

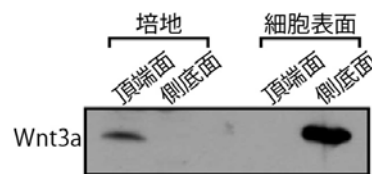


図 1: MDCK 細胞において、Wnt3a は側底面の細胞表面に主に存在する一方で、頂端面の培地あるいは細胞表面には一部のみ存在していた。

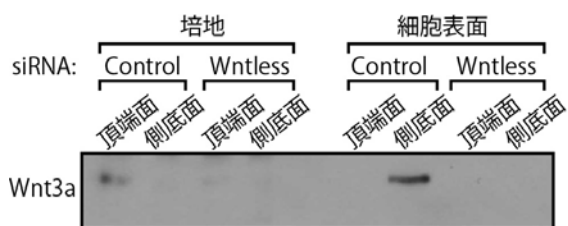


図 2: MDCK 細胞において、Wntless の siRNA による発現抑制が Wnt3a の輸送を阻害した。

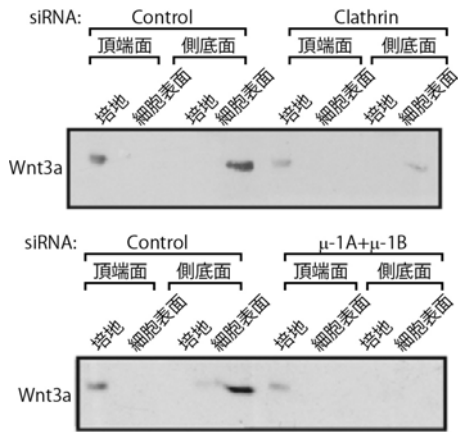


図3: MDCK細胞において、クラスリン(上図)あるいはクラスリンアダプター蛋白質(下図)のsiRNAによる発現抑制がWnt3aの輸送を阻害した。

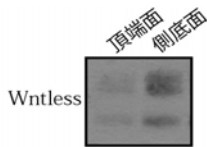


図4: MDCK細胞において、Wntlessは側底面の細胞膜に主に局在していた。

MDCK細胞において、Wnt11は頂端面に選別輸送されていることが明らかとなった(図5)。Wnt11はAsn40において、複合型糖鎖修飾を受けるため、Wnt3aのN末端領域をWnt11のN末端領域に入れ換えたWnt11/Wnt3aを作成し、Wnt11/Wnt3aの選別輸送を検討したところ、頂端面側に選別輸送された(図6)。すなわち、Wntに付加されている糖鎖がWntの選別輸送に関与することが明らかとなり、新たな知見を得ることができた。

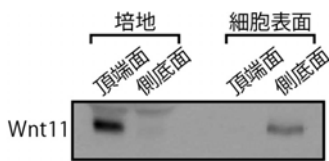


図5: MDCK細胞において、Wnt11は頂端面の培地に主に存在する一方で、側底面側には一部のみ存在していた。

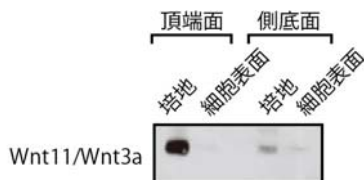


図6: MDCK細胞において、Wnt11/Wnt3aは頂端面の培地に主に存在した。

(2) 腸管上皮細胞において、 α -taxilinの発現をsiRNAにより抑制しても、Dkk1の側底面への輸送には大きな影響はなかったが、一方で、 α -taxilinの発現抑制が鉄の取り込みに重要な機能を果たすトランスフェリン受容

体(TfnR)の存在量の減少を引き起こすことを見出した(図7)。TfnRは通常、エンドサイトーシスされた後に、リサイクリング経路を介して細胞膜に戻り、再利用されることが知られており、lysosomeによる分解を積極的に受けない。TfnRのリサイクリングが阻害されると、TfnRはリソソームに輸送されることが知られている。 α -Taxilinの発現抑制によるTfnRの存在量の減少は、リソソーム阻害剤であるbafilomycin A1処理によってrescueされた(図8)。このことから、 α -taxilinがTfnRのリサイクリングに関与することが示唆された。これは細胞内小胞輸送における α -taxilinの機能に関する新たな知見である。 α -Taxilinについて、さらに詳細な機能を解析したところ、TfnRのリサイクリングに関与することが報告されているsorting nexin 4(SNX4)と結合することが明らかとなり(図9)、 α -taxilinについて新規の知見を得ることができた。

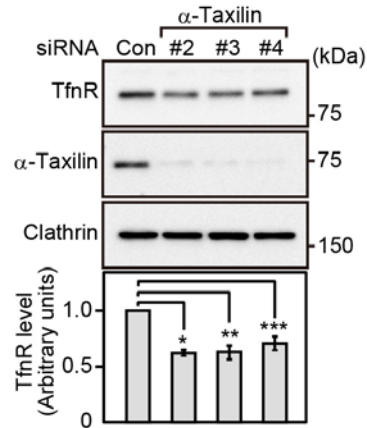


図7: HeLaS3細胞において、 α -taxilinのsiRNAによる発現抑制がTfnRの存在量を減少させた(*, $P < 0.0005$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.005$)。

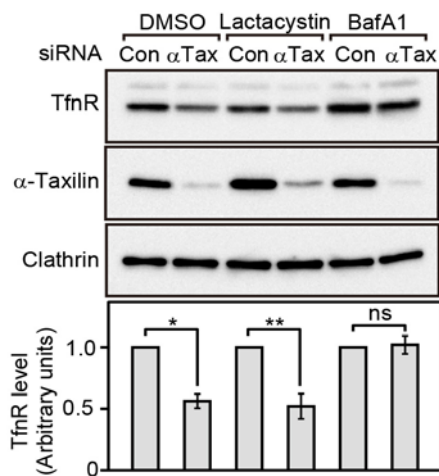


図8: HeLaS3細胞において、 α -taxilinの発現抑制によるTfnRの存在量の減少は、lysosome阻害剤bafilomycin A1処理によってrescueされた(*, $P < 0.005$; **, $P < 0.01$; ns, not significant)。

細胞表面において、TfnR は鉄イオンと結合したトランスフェリン (Tfn) を認識する。Tfn-TfnR 複合体は結合した状態で細胞内に輸送される。蛍光標識された Tfn は細胞内に取り込まれた後、リサイクリング経路を介して細胞外に放出されるため、Tfn signal の減弱が観察される。HeLaS3 細胞において、 α -taxilin の発現を siRNA により抑制した細胞では、control 細胞と比較して、Tfn signal の減弱の速度が遅延しており、 α -taxilin が Tfn-TfnR 複合体のリサイクリングに関与することが示され、新規の知見を得ることができた (図 10)。

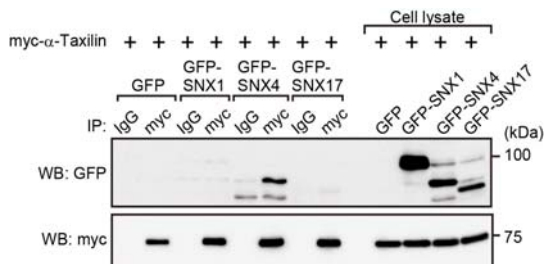


図 9: HEK293 細胞を用いた免疫沈降実験において、myc- α -taxilin は GFP-SNX4 と共沈することが示された。

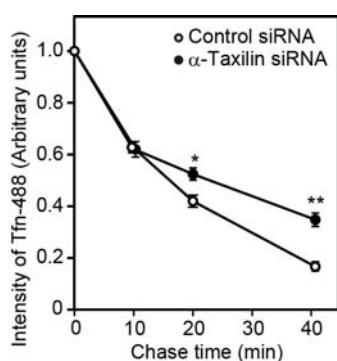


図 10: HeLaS3 細胞において、細胞内に取り込まれた Tfn-488 の signal は時間依存性に減弱するが、 α -taxilin の発現を抑制すると、減弱の速度が遅延した (*, $P < 0.005$; **, $P < 0.001$)。

HeLaS3 細胞において、HA-SNX4 を発現させると、HA-SNX4 は点状の構造とチューブ状の構造に局在する。HA-SNX4 と内在性の α -taxilin は共局在を示さないが、一方で、 α -taxilin の発現を抑制した HeLaS3 細胞では、HA-SNX4 陽性のチューブ状構造の数が減少していた。このことから、 α -taxilin が HA-SNX4 陽性のチューブ状構造の形成、あるいは HA-SNX4 のチューブ状構造への局在に関与することが考えられ、 α -taxilin に関して新たな知見を得ることができた (図 11)。

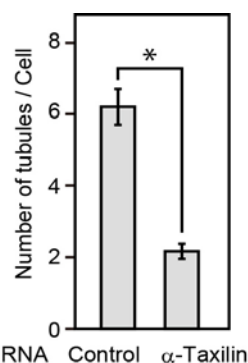


図 11: HeLaS3 細胞において、 α -taxilin の発現抑制すると、HA-SNX4 陽性のチューブ状構造の数が減少した (*, $P < 0.001$)。

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 2 件)

1. Sakane H., Horii Y., Nogami S., Kawano Y., Kaneko-Kawano T., and Shirataki H. α -Taxilin interacts with sorting nexin 4 and participates in the recycling pathway of transferrin receptor. *PLoS One*. 9, e93509, 2014 (査読有)
doi: 10.1371/journal.pone.0093509
2. Yamamoto H., Awada C., Hanaki H., Sakane H., Tsujimoto I., Takahashi Y., Takao T., and Kikuchi A. The apical and basolateral secretion of Wnt11 and Wnt3a in polarized epithelial cells is regulated by different mechanisms. *J. Cell Sci.* 126, 2931-2943, 2013 (査読有)
doi: 10.1242/jcs.126052

[その他]

ホームページ

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molbiobc/>

<http://www.dokkyomed.ac.jp/dep-m/mol-cell-bio/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂根 洋 (SAKANE Hiroshi)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80457291

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: