

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790081  
 研究課題名 (和文) 形態形成因子 Wnt3a のシグナル伝達と拡散に関わる  
 プロテオグリカンの役割  
 研究課題名 (英文) Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 modulates Wnt-3a signaling through  
 control of E disaccharide expression of chondroitin sulfate  
 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)：

発生過程や生体における恒常性の維持において、Wnt シグナルの厳密な調節が重要であるが、その分子機構の詳細は明らかでない。本研究において、コンドロイチン 4-O-硫酸基転移酵素-1(C4ST-1)を Wnt シグナルの正の調節因子として同定した。C4ST-1 は Wnt-3a に高い親和性を示す糖鎖を合成する。したがって、C4ST-1 は Wnt-3a の細胞表面結合量を制御することによって Wnt シグナルの強さを調節すると考えられた。

## 研究成果の概要 (英文)：

Wnt signaling is implicated in numerous physiological events such as morphogenesis. Here we show the importance of chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 (C4ST-1) in the efficient signaling of Wnt-3a. We propose a mechanism in which structural alterations in CS chains mediated by C4ST-1 control the strength of Wnt-3a signaling.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
21年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、プロテオグリカン、コンドロイチン硫酸、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

(1) C4ST-1 が合成するコンドロイチン硫酸が Wnt-3a シグナルを調節するという考えに至った経緯

①ヒトの軟骨細胞において、Wnt のシグナル伝達がコンドロイチン硫酸によって調節

されることが報告されていた。

②Wingless (Wnt のショウジョウバエホモログ) が細胞表面や細胞外マトリクスの硫酸化グリコサミノグリカンと強く結合することが示されていた。

③コンドロイチン硫酸の合成に関与する酵素の一つ、*C4ST-1* 遺伝子の変異細胞で *Wnt* シグナリングが抑制されることを、私たちは独自に見いだしていた。

④*C4ST-1* は *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 残基の 4 位の硫酸化を触媒する硫酸基転移酵素であるが、CS-E 構造 (-GlcUA-GalNAc(4S,6S)-) と呼ばれる特別な糖鎖構造の合成にも関与する。CS-E 構造は、ウイルスタンパクや神経細胞の突起形成に関わるコンタクチンなどによって認識されることが知られている。

これらの知見から、*C4ST-1* によって合成される特別な硫酸化構造が *Wnt-3a* のシグナル伝達を調節する可能性を検証しようと考えた。

(2) *C4ST-1* が合成するコンドロイチン硫酸が産生細胞からの *Wnt-3a* の拡散を調節するという考えに至った経緯

①私たちは、*Wnt-3a* を恒常的に発現する L-*Wnt-3a* 細胞で *C4ST-1* 遺伝子の発現が顕著に減少するという興味深い知見を得ていた。

②*Wnt* は産生細胞でつくられた後、受容細胞へ拡散し、シグナルを入力し、受容細胞の機能を調節する。しかし、*Wnt* 分子は粘着性の高いタンパク質であり、分泌後、細胞表面や細胞外マトリクスの糖鎖に強く結合する。したがって、*Wnt* 分子を糖鎖から遊離させる機構が存在する可能性が考えられた。

これらの知見から、産生細胞は *C4ST-1* の発現レベルを抑制し、産生細胞周辺の糖鎖構造を変化させることによって、*Wnt* と糖鎖の親和性を低下させ、*Wnt* の産生細胞からの拡散

を促す可能性について調べようと考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 同じ刺激に対しても、細胞は状況依存的に応答性を変化させる。本研究は細胞表面や細胞外マトリクスに存在する糖鎖の変化が、細胞の応答性を変化させる可能性について調べることを目的としている。形態形成因子 *Wnt-3a* に対する細胞の応答を例にとり、*Wnt-3a* のシグナル伝達に関与する糖鎖合成酵素遺伝子と糖鎖構造を決める。

(2) 形態形成因子 *Wnt* は産生細胞でつくられた後、標的細胞へ拡散し、標的細胞の細胞運命を決定する。*Wnt* は粘着性の高いタンパク質で、分泌された後、産生細胞の表面や細胞外マトリクスの糖鎖に強く結合する。本研究では、産生細胞から *Wnt* の拡散を促す機構を見いだすことを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) *Wnt3a* 情報伝達に関与するグリコサミノグリカン合成酵素の同定

幾つかのグリコサミノグリカン合成酵素の変異細胞を用いて、*Wnt-3a* に対する応答性を調べる。*Wnt-3a* に対する応答性は、細胞質に蓄積する  $\beta$ -カテニンの量を指標にウェスタンブロッティングを行って評価する。また、同定された合成酵素遺伝子を変異細胞に戻し、*Wnt-3a* に対する応答性が回復することを確認する。

### (2) *Wnt3a* が認識する糖鎖構造の同定

コンドロイチン硫酸は硫酸化パターンの違いにより複数のアイソタイプが存在する。いくつかのコンドロイチン硫酸アイソタイプをビオチン化し、それぞれセンサーチップに固相化し、表面プラズモン共鳴解析装置(BIAcore)を用いて、*Wnt-3a* との親和性を調べる。

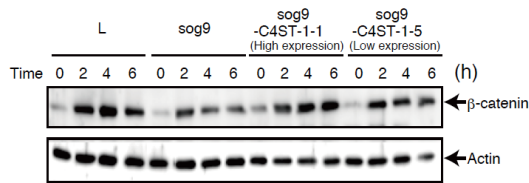
### (3) Wnt-3a の細胞表面結合量の解析

予め複合体を形成させておいた recombinant Wnt-3a と抗 Wnt-3a 抗体複合体を、*C4ST-1* の発現レベルの様々な細胞に添加した後、蛍光標識した 2 次抗体を用いて、細胞表面に結合した Wnt-3a を可視化する。

## 4. 研究成果

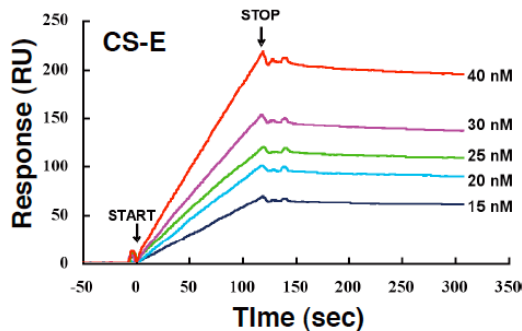
### (1) Wnt3a 情報伝達に關与するグリコサミノグリカン合成酵素の同定

コンドロイチン-4-O-硫酸基転移酵素-1 (*C4ST-1*) を欠損した *sog9* 細胞において、Wnt-3a に対する応答性が低下していた。また、*sog9* 細胞に *C4ST-1* 遺伝子を戻すと応答は回復した。また、*C4ST-1* の発現レベルによって Wnt-3a シグナル伝達が調節されることが明らかになった。



### (2) Wnt3aが認識する糖鎖構造の同定

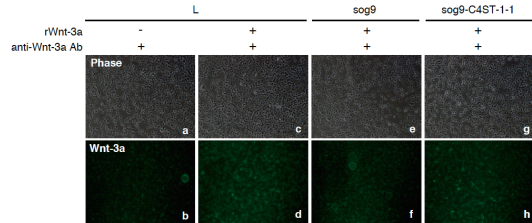
*C4ST-1* によって合成される CS-E 構造 (-GlcUA-GalNAc(4S,6S)-) を含むコンドロイチン硫酸と Wnt-3a が高い結合親和性をもつことが明らかになった。



### (3) Wnt-3aの細胞表面結合量の解析

*C4ST-1* の発現レベルが高い細胞(L細胞、*sog9-C4ST-1*細胞)ほど、細胞表面に結合す

る Wnt-3a は多く、発現レベルの低い細胞 (*sog9*細胞)では Wnt-3a の細胞表面結合量が少ないことがわかった。したがって、*C4ST-1* は特別な糖鎖構造 (CS-E 構造) の合成量を調節することによって、Wnt-3a の結合/解離を制御し、その結果、細胞表面の Wnt-3a 量が調節されることがわかった。



以上の結果から、細胞は *C4ST-1* の発現レベルを厳密に制御することで Wnt-3a に対する応答性を微細調節していると考えられる。一般に、形態形成因子の濃度依存的に細胞応答が調節されるモデルが提唱されているが、今回の結果から、たとえ同じ濃度であっても、形態形成因子に対する結合能を細胞自律的に変化させることで異なる応答反応を起こすことができる可能性が示された。細胞は *C4ST-1* の発現レベルを制御することで Wnt に対する応答性の強弱を調節すると考えられる。

### (4) 糖鎖による産生細胞からWntの拡散を促す機構の解析

Wnt3a を発現するマウス線維芽細胞 (L-Wnt-3a 細胞) に *C4ST-1* 遺伝子を安定に導入した細胞を樹立した。*C4ST-1* の発現レベルと Wnt3a の分泌量の相関性を調べるために、培地に分泌された Wnt-3a を高感度に測定できるレポーターアッセイ法を確立し、現在解析中である。

## 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5件)

1. Megumi Okada, Satomi Nadanaka, Naoko Shoji, Jun-ichi Tamura, and Hiroshi Kitagawa  
Biosynthesis of heparan sulfate in *EXT1*-deficient cells  
*Biochemical Journal*, 査読有, 2010, *in press*

2. Kitagawa, H., Tsutsumi, K., Ikegami-Kuzuhara, A., Nadanaka, S., Goto, F., Ogawa, T., and Sugahara, K.  
Sulfation of the galactose residues in the glycosaminoglycan-protein linkage region by recombinant human chondroitin 6-*O*-sulfotransferase-1.  
*Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 2008, 283, 27438-27443

3. Nadanaka S., Ishida M, Ikegami M, and Kitagawa H.  
Chondroitin 4-*O*-sulfotransferase-1 modulates Wnt-3a signaling through control of E disaccharide expression of chondroitin sulfate.  
*Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 2008, 283, 27333-27343

4. Nadanaka, S., and Kitagawa, H.  
Heparan sulphate biosynthesis and disease.  
*Journal of Biochemistry*, 査読有, 2008, 144, 7-14

5. 宮田 真路、灘中 里美、北川 裕之  
受容体結合における硫酸化グリコサミノグリカンの役割  
蛋白質核酸酵素, 査読有, 2008, 53, 1533-1539

〔学会発表〕(計6件、H.21のみ)

1. 灘中 里美, 石田 美穂, 池上 優美, 北川 裕之  
コンドロイチン-4-*O*-硫酸基転移酵素-1 による Wnt-3a シグナリングの微細調節  
第59回 日本薬学会近畿支部総会・大会 支部会奨励賞受賞者講演  
平成21年10月24日、近畿大学

2. 灘中 里美, 石田 美穂, 池上 優美, 木内 啓貴, 北川 裕之  
Fine-tuning of the Cellular Response to Wnt-3a by Chondroitin 4-*O*-sulfotransferase-1  
比較発生糖鎖生物学とその医工学への応用に関する日本・オーストリア二国間セミナー  
平成21年9月21~22日、湘南国際村

3. 灘中 里美, 石田 美穂, 池上 優美, 木内 啓貴, 北川 裕之  
コンドロイチン-4-*O*-硫酸基転移酵素-1 による Wnt-3a シグナリングの微細調節  
第56回日本生化学会近畿支部例会

平成21年5月23日、大阪医科大学

4. 木内 啓貴, 池上 優美, 灘中 里美, 北川 裕之  
Wnt-3a-mediated down-regulation of chondroitin 4-*O*-sulfotransferase-1 gene modulates diffusion of Wnt-3a

第29回 日本糖質学会年会、平成21年9月9日~11日、飛騨高山

5. 久世 彩加, 岡田 めぐみ, 灘中 里美, 北川 裕之  
*EXT* 遺伝子ファミリーによるヘパラン硫酸鎖の合成

第29回 日本糖質学会年会、平成21年9月9日~11日、飛騨高山

6. 木内 啓貴, 池上 優美, 灘中 里美, 北川 裕之  
Wnt-3a-mediated down-regulation of chondroitin 4-*O*-sulfotransferase-1 gene modulates diffusion of Wnt-3a

日本薬学会第130年会、平成22年3月28日~30日、岡山

〔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

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 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
なし ( )

研究者番号：