

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590333

研究課題名(和文) 精製Wnt蛋白質を用いたWntシグナル経路の選択的活性化機構の解析

研究課題名(英文) Selective activation of Wnt signaling pathway using with purified Wnt proteins

研究代表者

山本 英樹 (Yamamoto, Hideki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20372691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：質量分析法によりWnt3aには高マンノース型、Wnt11に高マンノース型に加えて複合型の糖鎖が付加されていることを見出した。極性化MDCK細胞においてWnt3aは側底部、Wnt11は頂端部へ分泌された。ゴルジ体においてWntの細胞外分泌を制御するWntlessはWnt3aと同様に側底部へ輸送され、両者はクラスリンやAP-1によって側底部への輸送が制御された。一方、Wnt11はN末端側の複合型の糖鎖修飾が頂端部への輸送に必要であり、ガレクチン3によって頂端部への輸送が制御された。これらの結果から、極性化された上皮細胞において糖鎖修飾の違いによってWntの細胞外分泌が制御されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Wnts are glycan- and lipid-modified morphogens that are important for cellular responses, but how Wnt is secreted in polarized epithelial cells remains unclear. Here we show the apicobasal secretion of Wnts is regulated by different mechanisms. Wnt11 and Wnt3a were secreted apically and basolaterally, respectively, in polarized epithelial cells. Wntless was localized to the basolateral membrane. Mass-spectrometric analyses revealed that Wnt11 is modified with complex/hybrid-(Asn40), high-mannose-(Asn90), and high-mannose/hybrid-(Asn300) type glycans and that Wnt3a is modified with two high-mannose-type glycans (Asn87 and Asn298). Glycosylation processing at Asn40 and galectin-3 were required for the apical secretion of Wnt11, while clathrin and adaptor protein-1 were required for the basolateral secretion of Wnt3a. These results suggest that Wls has different roles on the polarized secretion of Wnt11 and Wnt3a and that glycosylation processing of Wnts decides their secretory routes

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：Wntシグナル経路 Wnt 受容体 翻訳後修飾 細胞内小胞輸送

## 1. 研究開始当初の背景

分泌蛋白質の Wnt は線虫やショウジョウバエからヒトに至るまで種を越えて保存されており、初期発生における体軸形成や器官形成に必須であることが明らかになっている。Wnt は細胞膜上の受容体に結合した後に活性化される細胞内のシグナル伝達機構には、

-カテニン経路と平面内細胞極性 (PCP) 経路、Ca<sup>2+</sup>経路の少なくとも3種類が存在する。Wnt シグナルは細胞内の複数のシグナル経路を活性化することにより、細胞増殖や分化、運動、極性等、多彩な細胞応答を制御する。哺乳動物において Wnt は 19 種類、Fz 受容体は 10 種類存在し、1 回膜貫通型受容体の LRP5/6 や Ror1/2 をはじめ複数の共役受容体が存在する。しかし、Wnt 蛋白質の生化学的性状や Wnt と受容体との結合の特異性については明らかにされていなかった。これは Wnt 蛋白質が細胞外マトリックスに結合する傾向が強く、生理活性を有する Wnt として単離、精製することが困難であったためである。2003 年 4 月に Wnt3a の精製法が報告され、私共もその方法を改良することにより、Wnt3a に加えて Wnt5a、Wnt5b の精製に成功している。Wnt の多様な生理活性を考えれば、今後は精製 Wnt 蛋白質を用いて細胞増殖や分化、運動等の細胞応答を解析することが Wnt シグナル経路の全貌を理解する上で必須である。

また、Wnt が受容体と結合した後に、いかにして選択的に細胞内のシグナル経路を活性化するかも不明であった。これまでは Wnt と受容体の結合の組み合わせにより、Wnt シグナル経路の特異的活性化が決定されると考えられてきたが、私共はそれらに加えて受容体のエンドサイトーシスも関与することを見出し、同一の Wnt 受容体においてモリガンドと共役受容体の組み合わせに加えて、エンドサイトーシス経路の違いによって -カテニン経路、あるいは -カテニン非依存性経路が特異的に活性化されることを明らかにしてきた。しかし、Wnt が受容体に結合した後、いかにして細胞内の Dvl や Axin にシグナルを選択的に伝達して、特異的な細胞応答を引き起こすのか、その分子機構は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

哺乳動物において 19 種類存在する Wnt が

細胞内の複数のシグナル経路を活性化することにより、多彩な細胞応答を制御する。本研究は、Wnt と受容体の複合体がいかにして複数の細胞内シグナル経路の中で特異的な経路を活性化するのかという普遍的な疑問に答えるために、以下の3点を明らかにすることを目的としている。

- 1) Wnt 固有の生理活性を解析するために器官形成に必須である Wnt1 や Wnt4、Wnt11 蛋白質の精製法を確立し、それらの精製 Wnt 蛋白質を用いて糖鎖や脂質修飾を質量分析法によって解析し、翻訳後修飾による Wnt の細胞外分泌や機能発現の制御機構を解明する。
- 2) 各 Wnt が結合する受容体を同定し、Wnt シグナル経路を選択的に活性化する分子機構を解明する。
- 3) -カテニン非依存性経路を活性化する Wnt5a と Wnt11 の conditional ノックアウトマウスの表現型を比較することにより、両者の生理機能の違いを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) Wnt 蛋白質の精製と翻訳後修飾による Wnt の機能発現制御の解析について以下の方法を用いて解析した。

アフィニティカラムやゲルろ過カラムを組み合わせた数段階のクロマトグラフィーにより分画し、Wnt11 を精製した。各分画を抗 Wnt11 抗体による検出と Dvl のリン酸化、Rac の活性化を指標に Wnt11 の活性分画を検出した。

連携研究者の大阪大学蛋白質研究所の高尾敏文教授の共同研究により、精製した Wnt3a や Wnt5a、Wnt5b、Wnt11 蛋白質を用いて、各々の糖鎖修飾や脂質修飾の翻訳後修飾を質量分析法によって解析した。

極性化した上皮細胞における Wnt の分泌や Wnt 受容体の輸送経路の解析にはイヌ腎臓上皮細胞の MDCK 細胞を用いた。トランスウエルに MDCK 細胞を播種することにより、極性化 MDCK 細胞を培養し、Wnt やそれらの受容体の輸送経路を免疫染色やビオチン化とアフィニティビーズによって定量することにより解析した (図 4A 参照)。

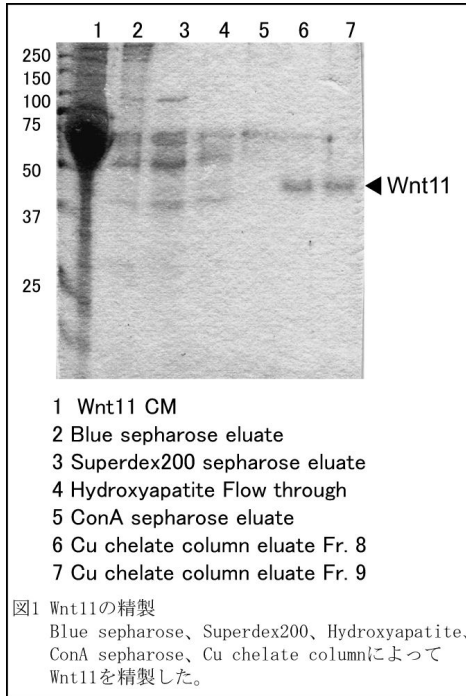
(2) Wnt と受容体のどの組み合わせにより、受容体エンドサイトーシスを誘導するかを調べることにより、Wnt シグナルの選択的活性化を解析する実験系を確立した。

(3) Wnt5a のノックアウトは胎生致死のために、Wnt5a のコンディショナルノックアウトマウスを作製した。また、Wnt5b と Wnt11 のノックアウトマウスを作製した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Wnt11の精製

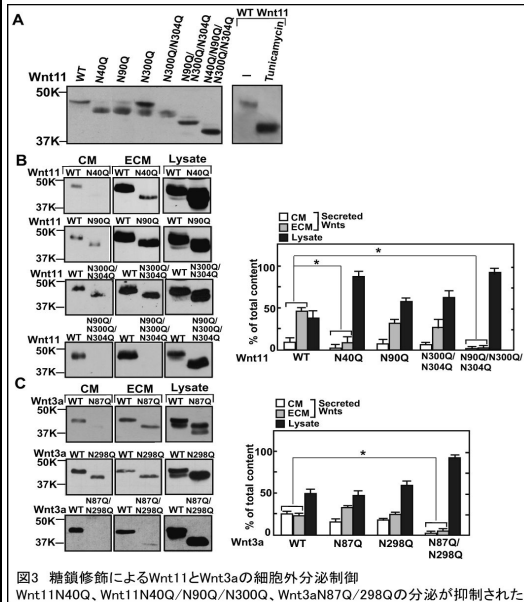
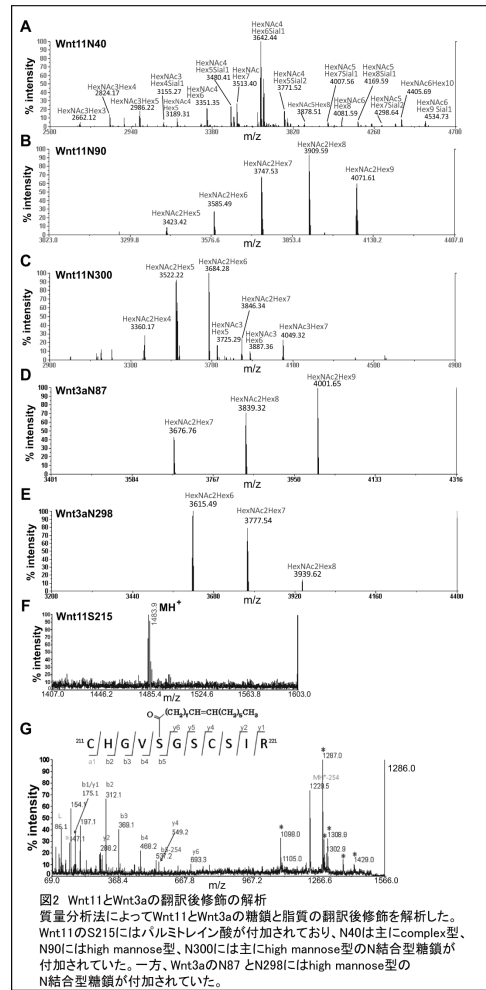
Blue sepharose, Superdex200(ゲルろ過), Hydroxyapatite, ConA sepharose, Cu chelate columnの5段階のカラムを用いて、抗Wnt11抗体による検出とDvlのリン酸化を指標にWnt11の活性画分を検出し、同一蛋白質にまで精製することに成功した(図1)。



##### (2) Wnt11とWnt3aの翻訳後修飾と機能解析

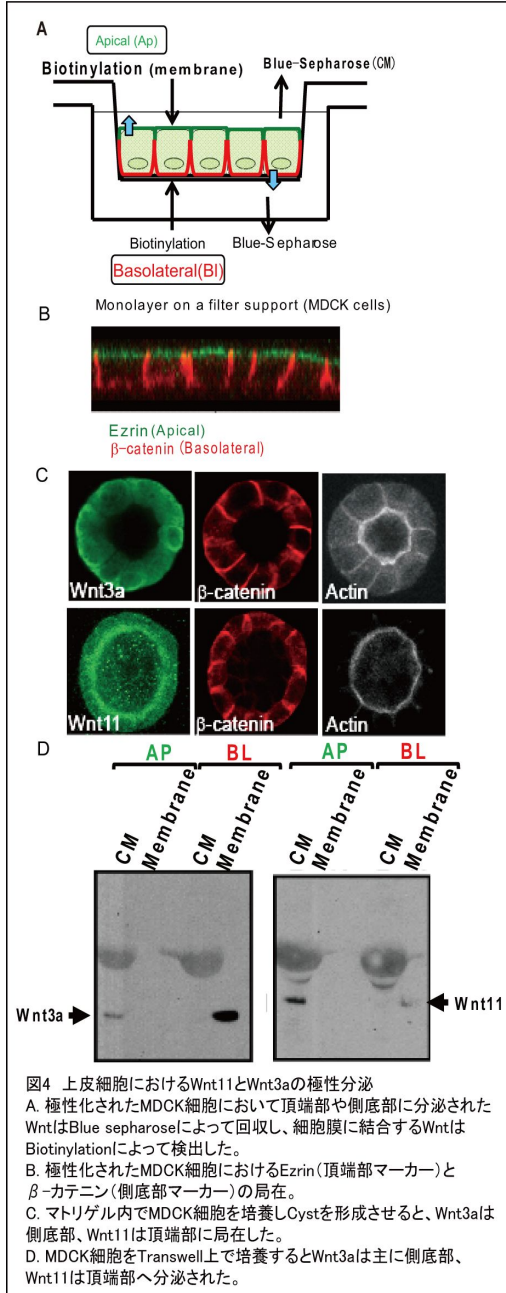
精製蛋白質を用いて翻訳後修飾を質量分析法により解析したところ、Wnt11はN40、N90、N300に糖鎖が修飾され、S215にはパルミトレイン酸が付加されていた。さらに、N40は主に複合型、N90には高マンノース型、N300には主に高マンノース型のN結合型糖鎖が修飾されていた。一方、Wnt3aのN87とN298には高マンノース型のN結合型糖鎖が修飾されていた(図2)。また、変異体を用いた解析により、Wnt11の細胞外分泌にN40の糖鎖修飾、Wnt3aの細胞外分泌にはN87、N298のいずれかの糖鎖修飾が必要であることを明らかにした(図3)。

これまでに、極性化された上皮細胞においてWntが頂上部、側底部のどちらに分泌されるかは明らかにされていなかった。イヌ腎臓上皮細胞のMDCK細胞をトランスウエルのフィルター上で培養するとEzrinが細胞の頂上部、-カテニンが側底部に局在する頂底極性を有する上皮細胞の形態をとる(図4B)。また、マトリゲル中でMDCK細胞を三次元培養すると内腔側にアクチン、側底部には-カテニンが局在するシストを形成する。Wnt3aは基質側の底部、Wnt11は管腔側の頂上部に局在した(図4C)。トランスウエルのフィルター上にMDCK細胞を培養し、両者の極性分泌について解析した。その結果、Wnt3aは主に側底部、Wnt11は頂上部へ極性分泌されることを見出した(図4D)。

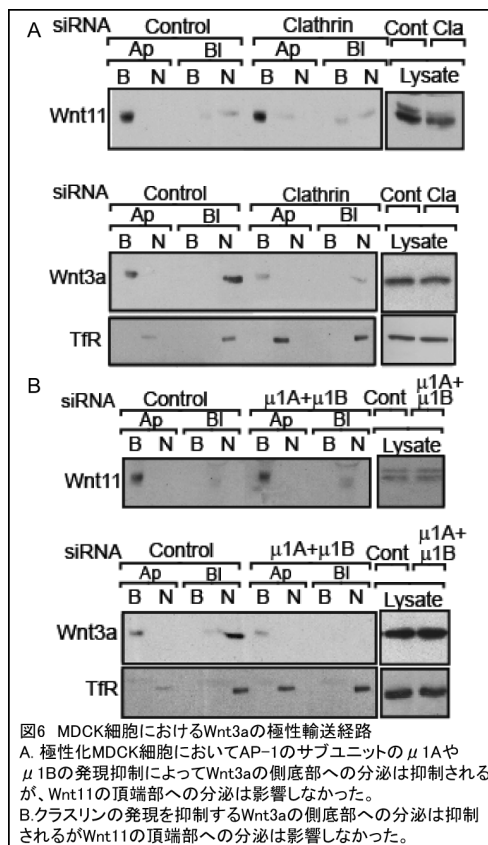
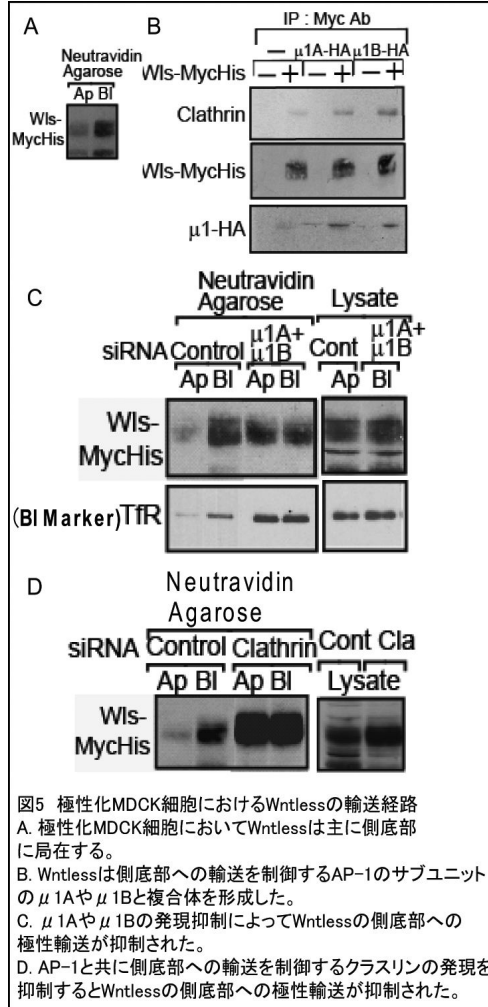


Wnt less (Wls)はWntの細胞外分泌に必要なであるがWntの極性分泌との関連は明らかにされていなかった。そこで、極性化MDCK細胞においてWlsの輸送経路について解析した。その結果、Wlsは主に側底部に局在した(図5A)。これまでに、側底部への極性輸送にクラスリンとアダプター蛋白質(AP-1)が関与することが報告されている。WlsとクラスリンやAP-1のサブ

ユニットの一つである  $\mu 1A$ 、 $\mu 1B$  の複合体形成を解析したところ、Wls は  $\mu 1A$  や  $\mu 1B$  を介して、クラスリンと複合体を形成した (図 5B)。また、 $\mu 1A$  や  $\mu 1B$ 、クラスリンを発現抑制すると Wls の側底部への輸送が抑制された (図 5C, D)。これらの結果から、Wls はクラスリンと AP-1 を介して側底部へ極性輸送されることが示唆された。



次に、MDCK細胞におけるWnt3aの側底部への極性分泌の制御機構について解析した。クラスリンやAP-1の発現を抑制するとWlsと同様に、Wnt3aの側底部への極性分泌は抑制されるが、Wnt11の頂端部への分泌には影響しなかった(図6)。これらの結果から、Wnt3aはクラスリンとAP-1を介してWlsと共に側底部へ分泌されるが、Wnt11はWls非依存性に頂端部へ輸送されることが示唆された。上皮細胞において頂端部への輸送シグナルの一つにN結合型糖鎖がある。Wnt3aとWnt11の糖鎖修飾の違いを考えると、Wnt11のN末端側に付加



される複合型糖鎖が極性分泌に関連することが示唆される。そこで、マンノシダーゼ阻害剤のキフネンシンやdMM、あるいはGnt-1の発現抑制によって複合型糖鎖修飾を抑制するとWnt11の頂端部への分泌が抑制された(図7A,B)。

したがって、Wnt11の頂端部への輸送には複合型糖鎖の付加が必要であると考えられた。これまでに、複合型糖鎖が付加されたタンパク質の頂端部への輸送を制御する分子としてガラクトースを認識するガレクチンが存在する。哺乳動物においてガレクチンは14種類存在し、そのうち、ガレクチン3が膜タンパク質の頂端部への輸送を制御することが報告されている。そこで、ガレクチン3とWnt11の極性分泌の関連を解析した結果、ガレクチン3の発現を抑制するとWnt11の頂端部への極性分泌が抑制された(図7C)。したがって、Wnt11はガレクチン3に結合することにより、ゴルジ体から頂端部へ分泌されると考えられる。

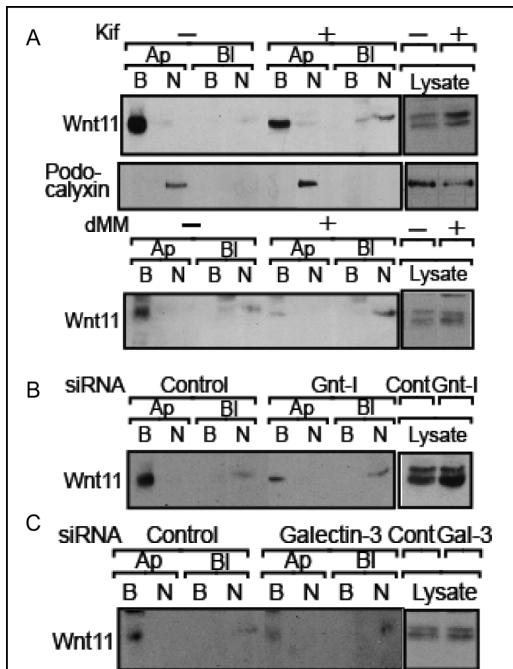


図7 MDCK細胞におけるWnt11の極性分泌経路  
A. 極性化MDCK細胞においてcomplex型のN結合型糖鎖修飾を抑制するKifunensin(Kif)やdMMで処理すると頂端部への分泌が抑制された。  
B. complex型のN結合型糖鎖修飾に必要である、Gnt-1の発現を抑制するとWnt11の頂端部への極性分泌が抑制された。  
C. complex型のN結合型糖鎖修飾を認識し、頂端部への極性輸送を制御するレクチンの一種であるガレクチン3の発現を抑制するとWnt11の頂端部への極性分泌が抑制された。

Wnt11の複合型糖鎖修飾が頂端側への分泌に必要であることが示されたので、WntのN末端側に複合型糖鎖の付加と頂端部への輸送との関連を解析した。Wnt11のN40を含むN末端領域をWnt3aのC末端領域に融合させたキメラタンパク質を作成し、糖鎖修飾と極性輸送について解析した。その結果、Wnt11/3aはWnt11と同様にN40には複合型糖鎖が付加された(図8A)。また、シストを構成させたMDCK細胞においては頂端膜の近傍に局在した(図8B)。さらに、極性化されたMDCK細胞においてWnt11/3aは頂端部へ分泌され、キフネンシンやdMMの処理、あるいはGnt1のノックダウン

によって頂端部への分泌は抑制された(図8C)。したがって、N末端側に複合型糖鎖が付加されると側底部よりも頂端部への輸送シグナルが優位に働き、Wnt11が頂端部へ分泌されると考えられた。

これまでに、Wntは小胞体において糖鎖と

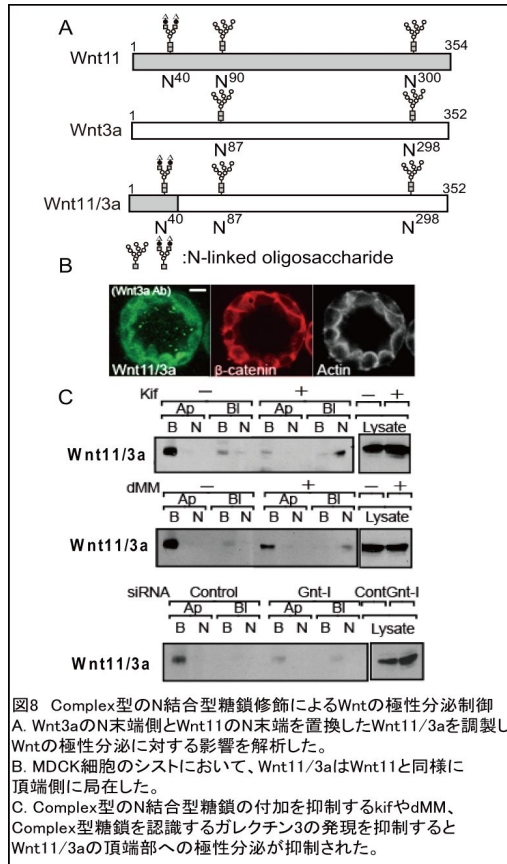


図8 Complex型のN結合型糖鎖修飾によるWntの極性分泌制御  
A. Wnt3aのN末端側とWnt11のN末端を置換したWnt11/3aを調製しWntの極性分泌に対する影響を解析した。  
B. MDCK細胞のシストにおいて、Wnt11/3aはWnt11と同様に頂端側に局在した。  
C. Complex型のN結合型糖鎖の付加を抑制するkifやdMM、Complex型糖鎖を認識するガレクチン3の発現を抑制するとWnt11/3aの頂端部への極性分泌が抑制された。

パルミトレイン酸が付加された後、TMED5によってゴルジ体に輸送されることが明らかにされている。Wnt11はさらに糖鎖のプロセシングによってN末端側の糖鎖はcomplex型糖鎖に変換される。ゴルジ体から遊離したWnt11を含む小胞はガレクチン3が含まれるエンドソームに融合した後、Wnt11はガレクチン3と結合することにより、頂端部へ分泌されると考えられる(図9A)。一方、高マンノース型糖鎖のみが付加されるWnt3aはゴルジ体においてWntlessと共にクラスリンとAP1と複合体を形成することにより、側底部へ選別輸送されることが示された(図9B)。このように、糖鎖構造の違いによってWnt11の頂端部への分泌とWnt3aの側底部への分泌が制御されることが明らかになった。

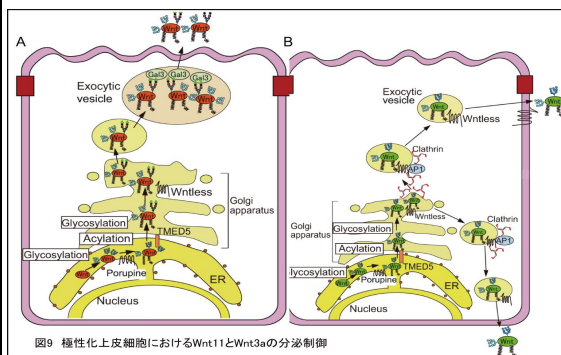


図9 極性化上皮細胞におけるWnt11とWnt3aの分泌制御

## 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 7件)

### 原著論文

1. Yamamoto, H., Awada, C., Hanaki, H., Sakane, H., Tsujimoto, I., Takahashi, Y., Takao, T., and Kikuchi, A. Apical and basolateral secretion of Wnt11 and Wnt3a in polarized epithelial cells is regulated by different mechanisms. *J. Cell Sci.*, 126, 2931-2943, 2013  
doi:10.1242/jcs.126052 (査読:有)
2. Sakane, H., Yamamoto, H., Matsumoto, S., Sato, A. and Kikuchi, A. Localization of glypican-4 in different membrane microdomains is involved in the regulation of Wnt signaling. *J. Cell Sci.* 125, 449-460, 2012  
doi:10.1242/jcs.091876 (査読:有)
3. Hanaki, H., Yamamoto, H., Sakane, H., Matsumoto, S., Ohdan, H., Sato, A., and Kikuchi, A. An anti-Wnt5a antibody suppresses metastasis of gastric cancer cells *in vivo* by inhibiting receptor-mediated endocytosis. *Mol. Cancer Tehr.*, 11, 298-307, 2012  
doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0682 (査読:有)
4. Kagermeier-Schenk, B., Wehner, D., Özhan-Kizil, G. Yamamoto, H., Li, J., Kirchner, K., Hoffmann, C., Stern, P., Kikuchi, A., Schambony, A., and Weidinger, G. The transmembrane protein Waif1/5T4 inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and activates noncanonical Wnt pathways by modifying LRP6 subcellular localization. *Dev. Cell*, 21, 1129-1143, 2011  
doi:10.1016/j.devcel.2013.07.020. (査読:有)

### 英文総説

5. Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., and Matsumoto, S. Wnt5a: its signaling, functions, and implication in diseases. *Acta physiol.*, 204, 17-33, 2012 doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02294.x. (査読:有)
6. Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato,

A., and Matsumoto, S. New Insights into the Mechanism of Wnt Signaling Pathway Activation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 291, 21-71, 2011  
doi:10.1016/B978-0-12-386035-4.00002-1. (査読:有)

### 和文総説

7. 山本 英樹、菊池 章 極性化上皮細胞における Wnt 分泌制御 *細胞工学「Wnt 協奏曲」* 32 巻 4 号, 388-395, 2013

〔学会発表〕(計 3件)

1. 山本英樹, 花木英明, 辻本育子, 金岩知之, 粟田ちひろ, 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 回日本生化学会大会, 横浜, 2013 年
2. 山本英樹, 花木英明, 辻本育子, 粟田ちひろ, 高尾敏文, 菊池章: 翻訳後修飾による Wnt11 の機能発現の制御. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡, 2012 年
3. 山本英樹, 粟田ちひろ, 高尾敏文, 岸田昭世, 岸田想子, 菊池章: 翻訳後修飾による Wnt 蛋白質の機能発現の制御. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011 年

〔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/molbiobc/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 英樹 (Yamamoto Hideki)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 20372691

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

高尾 敏文 (Takao Toshifumi)

大阪大学・蛋白質研究所・教授  
研究者番号: 10197048