

令和 5 年 9 月 27 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25251026

研究課題名(和文)モルフォゲンの分布とシグナル受容におけるヘパラン硫酸ナノ構造の役割

研究課題名(英文) Role of heparan sulfate nanostructures in morphogen distribution and signal reception

研究代表者

平良 眞規 (Taira, Masanori)

中央大学・理工学部・共同研究員

研究者番号：60150083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,200,000円

研究成果の概要(和文)：Wntはモルフォゲンとして胚のパターン形成に関わるが、その分布とシグナル受容に関する制御基盤は不明な点が多い。本研究で我々は細胞表面にN-acetylあるいはN-sulfoヘパラン硫酸(HS)がクラスターを形成して独立に存在することを見出し、これらHSクラスターのコア蛋白質はglypican 4と5と同定した。Wnt8はN-sulfo HSクラスターと特異的に共局在して細胞内に取り込まれ、シグナルソームを形成してシグナル伝達に関わる。一方、Wnt結合蛋白質のFrzbとWnt8の複合体はN-acetyl HSクラスターに特異的に結合しWnt8シグナル伝達を阻害することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、細胞に位置情報を伝えるWnt8の分布と作用が、細胞膜上にドット状に存在する2種類の修飾が異なるヘパラン硫酸(HS)クラスターによって協調的に制御されることが初めて明らかになった。Wntは発生現象のみならず、幹細胞やがん化などにおいても密接に関わっている。またHSは全身の多くの細胞で普遍的に存在する糖鎖で、種々の分泌性蛋白質と結合することが知られており、創薬分野でも注目されている分子であり、2種類のHSクラスターは、創薬の標的分子になり得るものである。このように本研究で得られた知見はWntとHSとの密接な関係を理解する上での基盤となると共に、応用への活用も期待される。

研究成果の概要(英文)：Wnt proteins direct embryonic patterning as a morphogen, but the regulatory basis of their distribution and signal reception remain unclear. In this project, we show that the Wnt8 protein is accumulated on the cell surface in a punctate manner in association with "N-sulfo heparan sulfate (HS)," not with "N-acetyl HS". These two types of HS are differentially clustered by attaching to different types of glypicans, Gpc4 and Gpc5 as core proteins. N-sulfo HS is frequently internalized and associated with the signaling vesicle, known as the Frizzled/Wnt/LRP6 signalosome. Conversely, N-acetyl HS is rarely internalized and accumulates Frzb, a secreted Wnt antagonist. Upon interaction with Frzb, Wnt8 associates with N-acetyl HS, suggesting that N-acetyl HS supports Frzb-mediated antagonism by sequestering Wnt8 from N-sulfo HS. Thus, these two types of HS clusters may constitute a cellular platform for the distribution and signaling of Wnt8.

研究分野：分子発生学

キーワード：ヘパラン硫酸 グリピカン アフリカツメガエル モルフォゲン Wnt sFRP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胚発生は誘導や細胞間相互作用による細胞内シグナル伝達と遺伝子発現調節により進行し、パターン形成や細胞分化が引き起こされる。この過程で、ペプチド増殖因子の Wnt、TGF β 、FGF、Hh などは、濃度勾配を形成してモルフォゲンとしてパターン形成に重要な役割を果たすとされている。しかし、ペプチド増殖因子が細胞間隙に濃度勾配を形成していることを実際に示した例はほとんどなく、また細胞間隙でどのような挙動をするかの解析もほとんどなかった。そこで、我々は Wnt とその結合蛋白質の sFRP (secreted Frizzled-related protein) にタグを付けてアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 胚に発現させ、それらがどのように細胞間隙に分布するかを調べた (Mii and Taira, 2009 Development 136, 4083-4088)。まず蛍光蛋白質 Venus を付加した Wnt8 と Wnt11、および sFRP ファミリーの Frzb と Crescent (Cres) を *X. laevis* 胚に発現させて分布を調べたところ、sFRP は胚全体に分布したのに対し、Wnt は発現細胞の近傍のみに分布することを見出した。さらに、Venus-Wnt と一緒に sFRP を共発現させると Venus-Wnt の分布が広がること、また本来 sFRP は Wnt に対する結合阻害因子と考えられていたが、適度な量の sFRP は Wnt の分布を拡大させかつシグナル範囲も拡大させることを見出した。そこでモルフォゲン Wnt はそれ自体では濃度勾配を作れないが、これまで阻害因子と考えられてきた sFRP により濃度勾配が形成される、というモデルを提唱した (Mii and Taira, 2011 Dev. Growth Differ. 53, 911-928)。では Wnt と sFRP の細胞間隙での分布の違いは何によってもたらされているのであろうか。我々はこの問題に取り組み、まず Wnt と sFRP が細胞間隙にドット状に分布することに注目して、それがヘパラン硫酸 (heparan sulfate: 以下 HS) の細胞膜上でのクラスター構造に起因することを見出した。さらに Wnt と sFRP は異なる修飾の HS クラスターと共局在して分布することも見出したことで、これが Wnt と sFRP の分布の違いを説明できるのではないかと考えた。これまでモルフォゲンの勾配形成のメカニズムとして、restricted diffusion model や source-sink model などが提唱されているが、その分子実体についてはほとんど解析されていなかった。また分布とシグナル受容との密接な関連性についてもほとんど考慮されていなかった。本研究はこれらの課題に迫るものである。

2. 研究の目的

種々の抗ヘパラン硫酸 (HS) 抗体を用いた組織切片の免疫染色については、これまで数多く報告されているが、高倍率での注意い観察がなされていなかったためか、HS が細胞間隙にドット状に分布することを記載した報告はなかった。我々は *X. laevis* 胚を用いた実験で、タグ付き Wnt8 が細胞間隙にドット状に分布する要因として HS に着目して、NAH46 (抗 N-acetyl HS 抗体) と HepSS-1 (抗 N-sulfo HS 抗体) による免疫染色を行い、それらがドット状のシグナルを呈することを明らかにした。さらにこれらの抗体との共免疫染色で sFRP ファミリーの Frzb が N-acetyl HS クラスターと共局在し、Wnt8 は N-sulfo HS クラスターと共局在することを見出した。これらの結果は、HS クラスターが分泌性蛋白質の細胞外分布や Wnt のシグナル受容と深く関わる可能性を示唆していた。そこで本研究では HS クラスターの分子実体を明らかにし、Wnt と sFRP の分布ならびに Wnt のシグナル受容にどのように関わるかを明らかにするため以下の解析を行なった。(1) N-acetyl と N-sulfo の HS クラスターを構成するコア蛋白質は何か、(2) N-acetyl HS から N-sulfo HS へ変換する修飾酵素 Ndst1 を操作することで、N-acetyl HS クラスターと N-sulfo HS クラスターとを相互変換することができるか、(3) Frzb と Wnt8 がそれぞれ N-acetyl と N-sulfo の HS クラスターと共局在することで何故両者の分布に違いがもたらされるのか、(4) N-sulfo HS クラスターと Wnt8 のシグナル伝達との関係はどのようなになっているか、などである。これらの結果を統合することで、モルフォゲンの分布のメカニズムとシグナル受容のメカニズムについて考察し、HS クラスターの実体と機能の総合的理解を得る。

3. 研究の方法

- 1) 実験動物と培養細胞: *X. laevis* を人工授精させ、13~23 度で胚発生をさせた。培養細胞として HeLa 細胞を用いた。
- 2) 遺伝子クローニング: *X. laevis* の全ゲノム配列 (Session et al., 2016 Nature 538, 336-343) から目的の遺伝子あるいは mRNA 配列を取得し、それを基に PCR プライマーを設計して遺伝子クローニングを行った。それを基に、monomeric Venus (mVenus) や Myc あるいは HA タグを付加したコンストラクトを作成した。ベクターは pCsf107mT (Mii and Taira, 2009) を用いた。
- 3) 発現解析: 遺伝子が原腸胚期で発現しているかの有無は、報告されている *X. laevis* の RNA-seq データを参照した (Session et al., 2016)。
- 4) 顕微注入実験: *X. laevis* 胚の 4 細胞期の 1 割球の動物極側に合成 mRNA あるいはアンチセンス・モルフォリノオリゴ (MO) を顕微注入した。mRNA 合成は mMESSAGING MACHINE (Ambion) を用い、MO は Gene Tools 社に外注した。
- 5) 抗体染色: 用いた抗体は市販のマウスモノクローナル IgM 抗体の NAH46 (抗 N-acetyl HS 抗体) と HepSS-1 (抗 N-sulfo HS 抗体) (生化学工業)、抗 GFP ポリクローナルウサギ抗体 (Invitrogen) などである。NAH46 と HepSS-1 のハイブリドーマを培養しその培養上清を抗体液としても用いた。二次抗体は蛍光標識した抗マウス IgM あるいは抗ウサギ IgG 抗体を用いた。免疫染色の観察は共焦点レーザー顕微鏡 Zeiss LSM5 PASCAL を用いた。

- 6) HS クラスターのコア蛋白質の同定: candidate screening 法で行った。HS のコア蛋白質として膜貫通型と GPI アンカー型があるので、GPI アンカー型を膜から遊離させる PI-PLC (phosphatidylinositol-specific phospholipase C) を用いて検討した。候補遺伝子の過剰発現とノックダウン実験を行い、免疫染色による HS クラスターの消長で判定した。
- 7) 脂質ラフトの検討: 脂質ラフトは methyl- β -cyclodextrin (M β CD) で処理すると消失することから、*X. laevis* 胚を種々の濃度の M β CD で処理したのち、HS 抗体で免疫染色を行った。
- 8) 糖鎖画分の抽出と電気泳動: *X. laevis* の原腸胚よりグリコサミノグリカン (glycosaminoglycan: GAG) 画分を常法に従い抽出し、cellulose acetate membrane 電気泳動 (CAME) 法により負電荷の大小で GAG を分離した。alcian blue で軽く染色後に NAH46 あるいは HepSS-1 抗体と反応させて N-acetyl HS あるいは N-sulfo HS を免疫染色した。cellulose acetate membrane 上の糖鎖を抗体で検出する alcian immunostaining (AiS) 法は本研究で開発したものであり、CAME-AiS 法と命名した。

4. 研究成果

本研究期間の後半の成果は論文として未発表のため、既に論文 (Mii et al., 2017) として公表した N-acetyl HS クラスターと N-sulfo HS クラスターのコア蛋白質の同定と Wnt8 と Frzb に関する解析結果について以下に報告する。

1) HS クラスターのコア蛋白質の同定

コア蛋白質が細胞膜貫通型か GPI アンカー型かを識別するため、*X. laevis* 胚の初期胞胚期の胞胚腔に PI-PLC の酵素液を顕微注入し、原腸胚期で NAH46、HepSS-1 抗体で免疫染色した。結果、N-acetyl と N-sulfo HS クラスターは PI-PLC 処理により共に顕著に減少した。そこで GPI アンカー型コア蛋白質として glypican (gpc) を候補とした。gpc はショウジョウバエの遺伝学的解析からは gpc の Dally が Wnt シグナル伝達に関与し、別のタイプの Dally-like が Wnt の分布に関与することが示されている。脊椎動物の gpc には 1~5 のパラログあり、異質四倍体の *X. laevis* にはさらに同祖遺伝子 (homeolog) の L と S 遺伝子が存在する。そこで初期原腸胚期に発現している gpc を選別するため、既報の RNA-seq データを解析したところ、gpc4.L、gpc4.S、gpc5.L、gpc5.S が他の gpc に比べて強く発現していることがわかった。gpc4 は Dally-like に、gpc5 は Dally に属する。gpc4 と gpc5 の mRNA とアンチセンス MO の顕微注入実験を行った結果、Gpc4 は N-sulfo HS クラスターと N-acetyl HS クラスターの形成に、Gpc5 は N-sulfo HS クラスターの形成に関与することが示された (図 1A)。

2) Ndst1 による N-acetyl HS クラスターと N-sulfo HS クラスターとの相互変換

N-acetyl HS から N-sulfo HS への修飾酵素である Ndst1 の cDNA をクローニングし解析に用いた。ndst1 mRNA を顕微注入し発現させた結果、N-acetyl HS クラスターが N-sulfo HS クラスターへ変換することが示された。逆にアンチセンスの ndst1 MO を顕微注入して ndst1 をノックダウンすると、N-sulfo HS クラスターが減少し N-acetyl HS クラスターが増大した。これらの結果は、Ndst1 を操作することで N-acetyl HS クラスターと N-sulfo HS クラスターとの相互変換が可能であることが示された。

3) N-acetyl HS クラスターと N-sulfo HS クラスターの動態の違い

Wnt8 と N-sulfo HS クラスターは、N-acetyl HS クラスターと異なり、細胞内にもドット状に検出されることから、共に細胞内に取り込まれることが示唆された。そこで両 HS クラスターの動態の違いをさらに明らかにするため、NAH46 抗体あるいは HepSS-1 抗体を初期胞胚の胞胚腔に顕微注入して一過性に細胞膜上の HS クラスターを標識し、原腸胚期で抗 IgM 抗体で HS 抗体を検出した。結果、NAH46 抗体は細胞膜上に留まっているのに対し、HepSS-1 抗体は細胞膜上には検出されず、細胞内のみ検出された。先の予想を支持するものであった。同様な結果は mVenus-Wnt8 の動態を time-laps 共焦点顕微鏡撮影で観察することでも得られた。

HS クラスターの普遍性を調べるため、ヒト由来の HeLa 細胞を用いて NAH46 と HepSS-1 抗体で免疫染色を行った。結果、N-acetyl HS クラスターが細胞表面上に検出された一方、N-sulfo HS クラスターは細胞表面と細胞内部に検出された。このことから、両 HS クラスターの存在と動態は少なくとも四肢動物では保存されていることが示唆された。今後他の後生動物での解析が必要であるが、HS は後生動物に広く存在することから glypican (gpc) 遺伝子をもつ生物ならば、HS クラスターをもつことが十分に予想される。

4) HS クラスターの生化学的解析

N-acetyl HS クラスターと N-sulfo HS クラスターは独立に存在することから、N-acetyl HS クラスターには N-sulfo HS がほとんど共存しないこと、すなわちヘパラン硫酸の前駆体糖鎖であるヘパラン (heparan: Hn と略記) である可能性が考えられた。そこで N-acetyl HS (あるいは Hn) と N-sulfo HS が生化学的に存在するか否かを、原腸胚から抽出した GAG 画分について CAME-AiS 法 (研究の方法を参照) により検討した。結果、予想された電荷-1 のポジションに NAH46 で染色される GAG 画分が存在し、電荷-2 の付近に HepSS-1 で染色される GAG 画分が存在することを認めた。したがって N-acetyl HS クラスターはスルホン基と硫酸基をもたない Hn クラスターであることが示唆された。

5) HS クラスターは脂質ラフトに存在する

glypican などの GPI アンカー型の膜蛋白質は脂質ラフトに局在することが報告されている。そこで細胞膜上の脂質ラフトを破壊するとされている M β CD を 48 細胞期の胞胚腔に顕微注入し原

腸胚期で固定し免疫染色した結果、M β CD の量依存的に、N-acetyl HS クラスターと N-sulfo HS クラスターが共に消失した。これは両 HS クラスターが脂質ラフトに形成されることを支持した。

6) Wnt シグナル伝達における N-sulfo HS クラスターの役割

Wnt のシグナル伝達において、Wnt とレセプター複合体に Lrp6、Dishevelled (Dvl)、GSK3 などの Wnt シグナル伝達分子がリクルートされ、シグナロソーム (signalosome) と呼ばれるエンドソーム (endosome) を形成して細胞内に取り込まれる (Bilic et al., 2007 Science 316, 1619-22)。これまで細胞内の Wnt8-Myc と N-sulfo HS が Dvl や GSK3 と共局在する結果が免疫染色で得られていたが、本研究では Wnt 依存的にリン酸化される Lrp6 について、抗リン酸化 Lrp6 抗体を用いた検討した。その結果、Wnt8 依存的に Lrp6 のリン酸化が増大し、そのリン酸化 Lrp6 のシグナルと N-sulfo HS クラスターのシグナルとの共局在性が細胞表面と細胞内に認められた。この結果は N-sulfo HS クラスターがシグナロソームの形成の起点となっていることを示唆している。

7) Wnt8 と Frzb の HS クラスターとの共局在性の検討

Wnt8 は N-sulfo HS クラスターと共局在し、Frzb は N-acetyl HS クラスターと共局在すること、および Wnt8 を Frzb と共発現させると N-acetyl HS クラスターと共局在ようになること、すなわち Wnt8-Frzb 複合体は N-sulfo HS クラスターではなくて、Frzb と同様に N-acetyl HS クラスターに結合することが先の実験で既に示唆されていた。そこで本研究では、Wnt8 と Frzb の HS への結合特異性をさらに確かめるため、ndst1 の mRNA 顕微注入による gain-of-function 実験とアンチセンス MO の顕微注入による loss-of-function 実験を行った。その結果、予想通り、Ndst1 を発現した細胞では Wnt8 の集積が増大する一方 Frzb の集積はなくなり、逆に Ndst1 を低下させた細胞では Frzb の集積が増大する一方 Wnt8 の集積は減少した。これらの結果から、Wnt8 と Frzb の HS への結合の特異性がさらに明確に示された。

8) 内在性の Wnt8 の解析

タグ付き Wnt8 の細胞間隙での分布や動態が果たして内在性の Wnt8 にも当てはまるかは重要な点である。そこで、基礎生物学研究所の高田慎治博士らとの共同研究で、抗 Wnt8 抗体を用いた免疫染色の解析を行った。その結果、内在性の Wnt8 の検出に初めて成功し、*X. laevis* 胚の帯域の側方から正中線にかけて (これは後の後方から前方に相当) Wnt8 が勾配を形成して分布していることが示された。高倍率の共焦点顕微鏡観察では予想通り、内在性の Wnt8 も細胞間隙と細胞の内部に N-sulfo HS クラスターと共局在するドット状の分布を示し、それが ndst1 MO によるノックダウンにより減少した。これらのデータ全てタグ付き Wnt8 で得られた結果と一致した。

9) 結果のまとめ

本研究で得られた以上の結果と、以前に得られた結果とを合わせて考察すると以下のようなことになる (図 1 と 2)。

(1) N-acetyl HS クラスターは Gpc4 をコア蛋白質として、N-sulfo HS クラスターは Gpc5 あるいは Gpc4 をコア蛋白質として、それぞれ独立にゴルジ体を通して生成されて、細胞膜上の脂質ラフトにクラスターを形成すると考えられる (図 1A)。

(2) N-acetyl HS クラスターは細胞表面に留まり、N-sulfo HS クラスターは細胞内に取り込まれる (図 1B)。Wnt8 は N-sulfo HS クラスターに結合して細胞内に取り込まれる一方、Frzb は N-acetyl HS クラスターに結合して細胞表面に留まる。さらに Frzb に結合した Wnt8 は局在を HS クラスターから N-acetyl HS クラスターに変えることで、分布範囲とシグナル範囲を広げることが示唆される (図 1B、詳細は図の説明を参照)。このように、Wnt8 と Frzb の分布の違いと Frzb による Wnt8 の分布拡大とシグナル範囲の拡大という現象は (Mii and Taira, 2009)、それらが特異的に結合する 2 種類の HS クラスターの動態の違いで説明可能となった。これはまた、これまで提案されてきたモルフォゲンの勾配形成の source-sink モデルと restricted diffusion モデルの分子実体を例示するものであり、両モデルを N-acetyl HS クラスターと N-sulfo HS クラスターを用いて統合的に理解することが可能となった。さらにリガンドの分布とシグナル伝達とが Wnt8 では N-sulfo HS クラスターによりカップルしていることが示された。

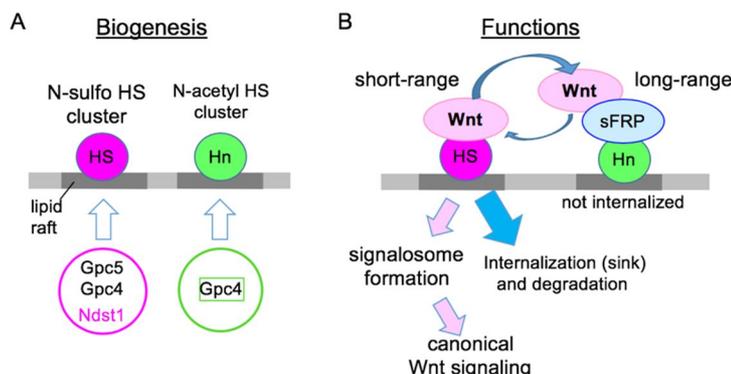


図 1. ヘパラン硫酸 (HS) クラスターの生合成過程と機能のモデル図。(A) HS クラスターの生合成経路の予想図。

N-sulfo HS クラスタは、Dally サブファミリーの Gpc5 と Dally-like サブファミリーの Gpc4 をコア蛋白質とし、Ndst1 による N-sulfo の修飾を受ける。N-acetyl HS クラスタは Gpc4 をコア蛋白質として、Ndst1 の修飾を受けないか（この場合はヘパラン (Hn) となる）あるいはほとんど受けない。両クラスタは脂質ラフト (lipid raft) に存在する。(B)機能と役割。N-sulfo HS クラスタ (HS) に結合した Wnt8 は細胞内に一緒に取り込まれるので、モルフォゲンの勾配形成の source-sink モデルの sink として N-sulfo HS クラスタは働き、Wnt8 の分布は狭くなる (short range)。取り込まれる Wnt8 の一部はリン酸化 Lrp6 などと共に signalosome を形成し Wnt シグナルを伝達し、残りは分解される。N-acetyl HS クラスタ (ここでは Hn と表記) は細胞表面に留まるので、それに結合する Frzb は細胞内に取り込まれることなく広範囲に分布する (long range)。これはモルフォゲンの restricted diffusion モデルに相当する。Wnt8 は Frzb と複合体をつくと N-acetyl HS クラスタ (Hn) に結合するようになり、分布範囲が広がる。Wnt8 は N-acetyl HS クラスタ上ではシグナルを伝えられないが、Frzb から解離して N-sulfo HS クラスタに結合するとシグナル伝達に使われ Wnt8 のシグナル範囲も Frzb により拡大する。

リガンドのレセプターへの結合やシグナル伝達における HS の重要性についてはこれまでも様々な知見がある。例えば、Wnt のシグナル受容には Dally (Gpc5 オーツログ) が必要であることはショウジョウバエの遺伝学で示されているが、その分子機構は解析されていなかった。そこで従来考えられていた Wnt のシグナル受容のモデルとしては、図 2A に示すように、HS に結合している Wnt がレセプター (Fz) とコレセプター (Lrp6) に結合して、Wnt-Fz-Lrp6 複合体により Lrp6 がリン酸化を受け、それをコアにして他のシグナル伝達分子 (Dvl や GSK3 など) が会合してシグナロソームを形成し GSK3 を不活化するモデルが提唱されている (図 2A)。しかし、Wnt-Fz-Lrp6 複合体が会合する前に既に N-sulfo HS がクラスタを作って存在すること、およびシグナロソームに N-sulfo HS 含まれているという本研究の結果を合わせて考えると、これまでのモデルを再考する必要がある。

そこで新たな Wnt シグナルの受容モデルを提案した (図 2B)。従来のモデルとの大きな違いは、Wnt の有無に関わらず細胞表面には予めシグナロソームの核となる N-sulfo HS クラスタが用意されており、そこに Wnt とそのレセプターとコレセプターが集積して会合体を作る点である (詳細は図の説明参照)。このモデルは、Wnt のシグナル伝達に脂質ラフトからの caveolin を介すエンドソーム形成 (シグナロソーム形成) が必要であるという報告 (Yamamoto et al., 2006 Dev. Cell 11, 213-23) と合致するものであり、事実我々は、内部移行 (internalization) した N-sulfo HS と caveolin とが共局在するというデータを得ている。このように N-sulfo HS クラスタは Wnt シグナルを受容する場を形成していると共に、シグナロソーム形成の核としての重要な役割を担っていると考えられる。

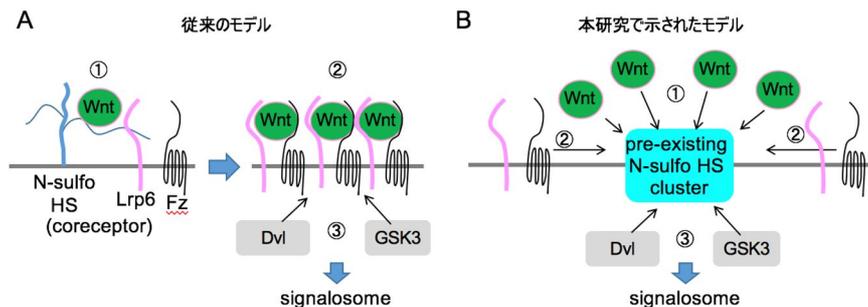


図 2. Wnt シグナロソーム形成のモデル。(A) 従来のモデル。 N-sulfo HS にリガンド (Wnt) が結合する。その近傍のレセプター (Frizzled: Fz) とコレセプター (Lrp6) が Wnt と結合し、その 3 者複合体が会合して活性化し Lrp6 がリン酸化を受ける。そこに Dishevelled (Dvl) や GSK3 がリクルートされて全体が内部移行してシグナロソーム (signalosome) が形成され、Wnt シグナルが伝わる。(B) 本研究で示されたモデル。 N-sulfo HS クラスタが予め形成されており (pre-existing N-sulfo HS cluster)、そこに親和性をもつ Wnt が多数集積し局所的に Wnt 濃度が高まる。そこにレセプターとコレセプターがリクルートされて、リガンド・レセプター・コレセプターの 3 者複合体が形成されかつ会合して活性化し Lrp6 がリン酸化を受ける。そこに Dvl と GSK3 がリクルートされ、それらが N-sulfo HS クラスタごと内部移行してシグナロソームが形成される。

以上、本研究により、Wnt のモルフォゲンとしての勾配形成の分子メカニズムとそれに基づくシグナル伝達分子の分子メカニズムの両方に関わる 1 つの重要な要素として、HS クラスタの存在が明らかになった。すなわち、これまで独立に議論されてきた Wnt の分布の制御とシグナル伝達の機構は、どちらも N-sulfo HS クラスタと N-acetyl HS クラスタとの機能的な違いに基づいたものであることが示された。今後 Wnt の分布とシグナル受容についての統合的理解さらに進むことが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Satou, Y., Minami, K., Hosono, E., Okada, H., Yasuoka, Y., Shibano, T., Tanaka, T. and *Taira, M.

(2018). Phosphorylation states change Otx2 activity for cell proliferation and patterning in the *Xenopus* embryo. *Development* 145, published online

Mii, Y., Yamamoto, T., Takada, R., Mizumoto, S., Matsuyama, M., Yamada, S., *Takada, S. and *Taira, M. (2017). Roles of two types of heparan sulfate clusters in Wnt distribution and signaling in *Xenopus*. *Nat. Commun.* 8, 1973. *co-corresponding authors

†Session, A., †Uno, Y., †Kwon, T., (69 名省略), *Harland, R., *Taira, M., and *Rokhsar, D. (2016) Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature* 538, 336-343 (Article). †co-first author; *co-corresponding authors

Yasuoka, Y., Suzuki, Y., Takahashi, S., Sudou, N., Haramoto, Y., Cho, K. W., Asashima, M., Sugano, S., & *Taira, M. (2014). Occupancy of Tissue-Specific cis-Regulatory Modules by Otx2 and TLE/Groucho for Embryonic Head Specification. *Nat. Commun.* 5, Article number: 4322.

〔学会発表〕(計 4 件)

平良眞規 "細胞表面の「ヘパラン硫酸クラスター」の発見と分泌性蛋白質との相互作用の新展開。" シンポジウム 1S05a 「発生における細胞間コミュニケーション研究の新展開」で招待講演。第 91 回日本生化学会大会 (2018 年 9 月 24-26 日) 国立京都国際会館 (京都市)

山元孝佳、平良眞規 "Modulation of BMP4 distribution and signaling with heparosan, heparan sulfate, and cerberus" 日本発生生物学会第 50 回大会 (2017 年 5 月 10-13 日) タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)

Yamamoto, Y., Mii, Y., Takada, S., Taira, M. "Distribution and signaling of Wnt and BMP ligands are modulated by secreted antagonists and heparosan/heparan sulfate proteoglycans in *Xenopus* embryos" (口頭とポスター発表)、16th International *Xenopus* Conference (2016 年 8 月 28 日-9 月 1 日) Orthodox Academy of Crete (ハニア市、ギリシャ)

三井優輔、山元孝佳、平良眞規、高田 慎治 "NDST1 は *Xenopus* 初期胚でのヘパラン硫酸ナノ構造の修飾と内在性 Wnt 蛋白質の適切な分布に必要である" (三井、口頭・ポスター発表) 第 37 回分子生物学会年会、横浜 (2014 年 11 月 25 日~27 日)

〔図書〕(計 1 件)

平良眞規 (2019) 「2 . 遺伝子の発生制御—細胞分化と遺伝子の差次的発現」, pp. 4-14 (11 ページ) in 「発生生物学—基礎から応用への展開」塩尻信義、弥益恭、加藤容子、中尾啓子 共編著 (培風館) ISBN 978-4-563-07823-2 C3045

〔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 なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : 三井優輔、山元孝佳、高田慎治、高田律子、水本秀二、山田修平、松山誠
ローマ字氏名 : Yusuke Mii, Takayoshi Yamamoto, Shinji Takada, Ritsuko Takada, Shuji Mizumoto, Shuhei Yamada, Makoto Matsuyama

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。