

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460365

研究課題名(和文) Wntとその受容体の細胞内トラフィック制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of membrane traffic of Wnt and its receptors

研究代表者

山本 英樹 (Yamamoto, Hideki)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20372691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Wnt5aやWnt5bの翻訳後修飾を質量分析法により明らかにした。極性化MDCK細胞においてWnt5aは側底部、Wnt1は頂端部と側底部の両側に分泌され、両者の側底部への輸送はクラスリンやAP1によって制御され、Wnt1の頂端部への輸送はエクソシストによって制御された。Wnt5bはエクソソームと呼ばれる細胞外小胞と共に分泌され、Wnt5b含有エクソソームには癌細胞の増殖と運動能を亢進させる機能があることを見出した。一方、Wnt受容体のLRP6やRor2、Fz2は側底部に輸送された。さらにシストの内腔形成にWnt5aが関連することを見出し、Wnt5aが側底側に分泌される生理的役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mass-spectrometric analyses revealed that Wnt5a and Wnt5b are modified with palmitoleic acid and two high-mannose-type and hybrid-type glycans. We found that Wnt5a is secreted basolaterally and Wnt1 is equivalently secreted both apically and basolaterally in polarized MDCK cells. We also found that Wnt5b is secreted as a soluble form or as an exosome-associated form. The basolateral secretion of Wnt5a and Wnt1 required Wntless (Wls), clathrin and AP-1. Wnt1 was secreted apically via exocyst-mediated transport. Wnt5a receptors were also localized to the basolateral membranes. Knockdown of Wnt5a delayed apical lumen formation of the epithelial cyst, and these phenotypes were rescued by wild-type Wnt5a, but not by a Wnt5a mutant that is secreted apically. These results suggest that Wnt5a and its receptors are sorted to their correct destination by different mechanisms and that the basolateral secretion of Wnt5a is necessary for apical lumen formation in the epithelial cyst.

研究分野：生化学、細胞生物学

キーワード：Wnt 受容体 小胞輸送 翻訳後修飾

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、Ca²⁺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 や Wnt11 の精製に成功している。Wnt の多様な生理活性を考えれば、他の精製 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。

一方、繊維芽細胞を用いた解析により、Wnt の小胞体からゴルジ体への輸送に TMED5、ゴルジ体から分泌小胞への輸送に Wntless が関与することが報告されている。私共と連携研究者は Wnt3a の翻訳後修飾について解析し、糖鎖と脂質の付加が Wnt の細胞外分泌と機能発現に必要であることを明らかにしている。それらに加えて、最近私共は精製 Wnt 蛋白質を用いて Wnt3a と Wnt11 の糖鎖構造を質量分析法によって解析し、Wnt3a は 2 箇所を高マンノース型糖鎖、Wnt11 には 2 箇所の高マンノース型に加えて、N 末端側に複合型糖鎖が付加されていることを見出した。さらに極性化した上皮細胞において、Wnt3a は主に側底部、Wnt11 は主に頂上部へ分泌されることを明らかにした。したがって、付加される糖鎖構造の違いによって Wnt の極性分泌が制御されることが示唆された。しかし、Wnt とその受容体の

細胞質から細胞膜への輸送制御と Wnt シグナル活性化との関連については明らかにされていない。また、Wnt ファミリーの細胞外分泌制御を明らかにするには、Wnt3a や Wnt11 に加えて他の Wnt の翻訳後修飾と細胞外分泌の関連について解析する必要がある。

2. 研究の目的

Wnt 研究領域において重要課題である次の 3 点を明らかにすることを目的としている。

(1) 精製した Wnt 蛋白質を用いて糖鎖修飾や脂質修飾を解析し、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明らかにする。

(2) 極性化 MDCK 細胞における Wnt とその受容体のゴルジ体から細胞膜への輸送経路を解析し、上皮細胞における Wnt と受容体の極性輸送と Wnt シグナル活性化との関連を明らかにする。

(3) Wnt やその受容体の細胞膜から細胞質へのエンドサイトーシスや小胞輸送の制御機構を解析し、Wnt や Wnt 受容体の細胞内トラフィックによる細胞応答制御を明らかにする。

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、Wnt5a や Wnt5b を精製した。各分画を抗 Wnt5a あるいは Wnt5b 抗体による検出と Dvl のリン酸化を指標に Wnt5a や Wnt5b の活性画分を検出した。

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 Wnt5a や Wnt5b 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る Nano-liquid chromatography (LC) / electrospray ionization (ESI)-mass spectrometry (MS)/MS を用いて、各 Wnt の糖鎖修飾や脂質修飾を解析した。

(2) イヌ腎臓上皮細胞の MDCK 細胞をトラン

スウェルのフィルター上に播種し、極性化した MDCK 細胞を培養することにより、Wnt や Wnt 受容体の輸送経路を解析した。具体的には頂端部と側底部の培養液中に分泌された Wnt はブルーセファロースによって定量し、Wnt 受容体や細胞膜表面に結合する Wnt はビオチン化することによって定量した。また、3D マトリゲル内で MDCK 細胞を培養し、内腔側に頂端膜、基質側に側底膜を有する球状のシストを形成させ、Wnt の極性分泌や Wnt 受容体の局在を免疫染色によって解析した。

(3) Wnt5a の細胞内輸送と細胞 - 基質接着の関連については MDCK 細胞における Wnt5a の極性分泌による FAK や Paxillin のリン酸化や Rac の活性化、ならびにシストの内腔形成に対する影響を解析した。

(4) エキソソームにおける Wnt については培養液中に含まれるエキソソームを 10 万 x g の超遠心によって回収して Wnt タンパク質を定量した。

4. 研究成果

(1) Wnt の精製

Blue sepharose、Superdex200(ゲルろ過)、Hydroxyapatite、Heparin spharose column の 3 段階のカラムを用いて、抗 Wnt5b 抗体による検出と Dvl のリン酸化を指標に Wnt5b の活性画分を検出し、同一蛋白質にまで精製した。Wnt5a も同様の手法により精製した。一方、Wnt1 の精製も試みたが、質量分析法によって翻訳後修飾を解析可能となる高濃度の Wnt1 タンパク質を精製出来なかった。

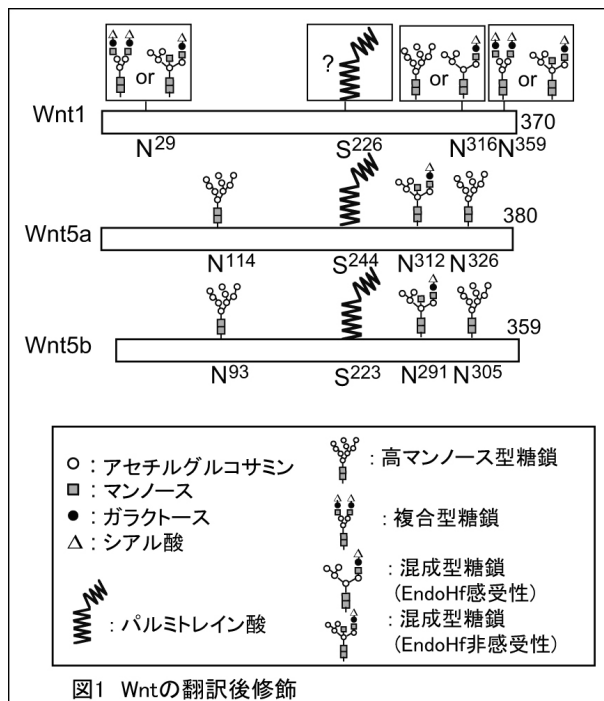


図1 Wntの翻訳後修飾

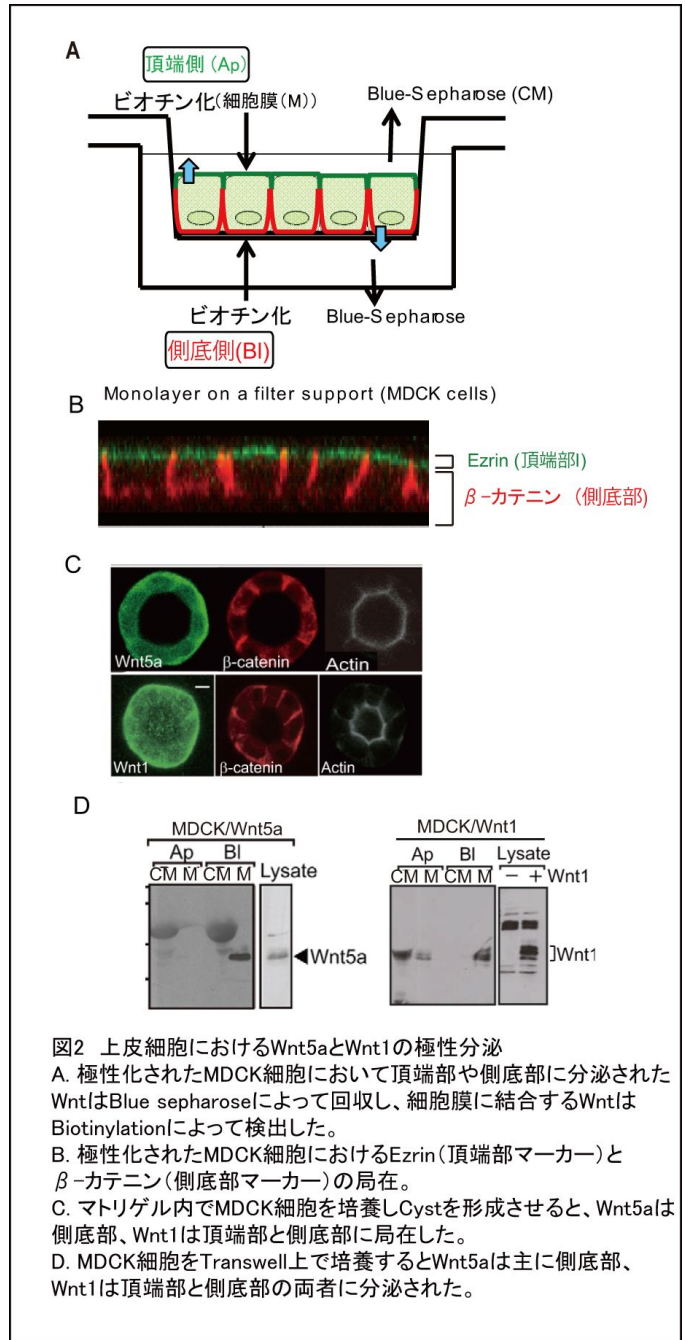


図2 上皮細胞におけるWnt5aとWnt1の極性分泌

A. 極性化されたMDCK細胞において頂端部と側底部に分泌されたWntはBlue sepharoseによって回収し、細胞膜に結合するWntはBiotinylationによって検出した。
 B. 極性化されたMDCK細胞におけるEzrin(頂端部マーカー)とβ-カテニン(側底部マーカー)の局在。
 C. マトリゲル内でMDCK細胞を培養しCystを形成させると、Wnt5aは側底部、Wnt1は頂端部と側底部に局在した。
 D. MDCK細胞をTranswell上で培養するとWnt5aは主に側底部、Wnt1は頂端部と側底部の両者に分泌された。

(2) Wnt 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、Wnt5a の S244 にはパルミトレイン酸が付加されていた。さらに、N114 と N326 は高マンノース型、N312 には混成型の N 結合型糖鎖が修飾されていた。また、Wnt5b の S223 にはパルミトレイン酸が付加され、N93 と N305 には高マンノース型、N291 には混成型の N 結合型糖鎖が修飾されていた(図1)。さらに、Glycosidase F や Endoglycosidase Hf 処理によって Wnt 1 に付加される糖鎖構造のプロファイリングを解析し

た。その結果、Wnt1 の N316 には高マンノース型あるいはEndoglycosidase H感受性の混成型糖鎖、N29 と N359 には複合型あるいはEndoglycosidase H非感受性の混成型糖鎖が付加されることを明らかにした(図1)。Wnt1 の 201 番の S は他の Wnt と保存されており、パルミトレイン酸が付加されると考えられる(図1)。

(3) 極性化 MDCK 細胞における Wnt の分泌制御

Wnt5a や Wnt1 が極性化された上皮細胞において頂端部、側底部のどちらに分泌されるかを解析した。イヌ腎臓上皮細胞の MDCK 細胞をトランズウエルのフィルター上で培養する(図2A)と Ezrin が細胞の頂端部、 β -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2B)。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 β -カテニンが局在するシストを形成する。このシストにおいて Wnt5a は基質側の底部、Wnt1 は管腔側の頂上部と基質側の底部の両者に局在した(図2C)。そこで、トランズ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、Wnt5a は主に側底部、Wnt1 は頂端部と側底部の両者へ極性分泌されることを見出した(図2D)。また、Wnt5a と Wnt1 はクラスリン AP1(adaptor protein 1)を介して側底側に分泌された。一方、Wnt1 の頂端側への分泌には Sec8 や Sec6 が必要であり、Exocyst を介して頂端側へ分泌されることを明らかにし、極性化上皮細胞における Wnt の分制御を明らかにした。

(4) Wnt 受容体の極性輸送

Wnt シグナルの選択的活性化は7回膜貫通型受容体の Frizzled (Fz) と一回膜貫通型受容体の LRP6 や Ror2、Ryk の組み合わせによって決定されている。例えば、LRP6 は Wnt3a や Wnt1 に結合し、 β -カテニン経路を活性化し、Ror2 と Ryk はそれぞれ Wnt5a と Wnt11 に結合し、 β -カテニン非依存性経路を活性化するが、Wnt 受容体の極性輸送については明らかにされていない。そこで、極性化された MDCK 細胞において Wnt 受容体の輸送経路について解析した。その結果、Fz2 や LRP6、Ror2 は側底側

に局在し、Fz7 や Ryk は頂端部、側底部の両者に局在した(図3)。また、Wnt リガンドの分泌を制御する Wntless の発現抑制によって Wnt 受容体の極性輸送には影響しなかった。さらに、クラスリンや AP-1 の発現抑制によって Fz2 や Ror2、LRP6 の側底部への輸送が抑制された(図4)。これは Wnt とその受容体は別々の小胞によって側底部へ輸送され、細胞膜への輸送時に両者の結合による Wnt シグナル活性化が誘導されないためと考えられる。Wnt3a や Wnt5a を頂端部から作用させても Wnt シグナルは活性化されませんが、側底側から刺激すると Wnt シグナルが活性化された。したがって、Wnt と Wnt 受容体を同じ側底部に輸送することにより、効率よく Wnt シグナルが活性化されると考えられる。

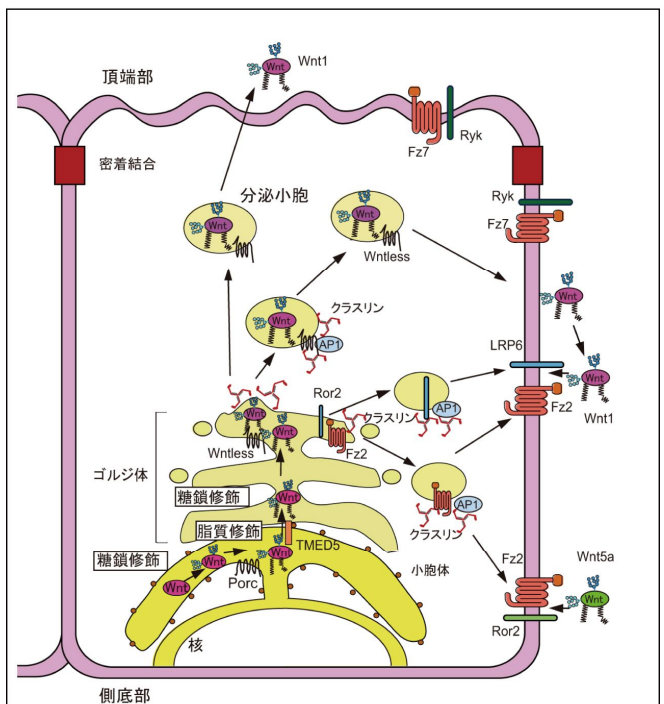


図3 上皮細胞における Wnt とそれらの受容体の極性輸送
極性化された MDCK 細胞において Wnt5a は主に側底部、Wnt1 は頂端部と側底部の両者に分泌される。Wnt 受容体の LRP6 や Ror2、Fz2 は側底側、Ryk や Fz7 は頂端部と側底部の両者に輸送される。

(5) Wnt シグナルによる上皮形態形成

上皮細胞のシストの内腔形成における Wnt5a シグナルの生理的役割を解析した。MDCK1 細胞を 3D マトリゲル内で培養すると 4 日目から内腔形成が始まり、6-7 日目にかけて細胞が辺縁で一層に並びと共に内腔が大

きくなり、8-9 日でシストが完成する。Porcupine 阻害剤の IWP2 や Wnt5a のノックダウンによって Wnt5a の分泌を抑制すると細胞-ECM 接着が抑制され、6-7 日目において細胞が内腔側に重層し、内腔形成が遅延することから、MDCK I 細胞シストの内腔形成に Wnt5a シグナルが関与することが示唆された(図 4A)。さらに、Wnt5a の発現抑制による内腔形成の遅延に対して頂端側に分泌される Wnt5aL68N では影響しないが、側底側に分泌される野生型の Wnt5a によってレスキューされた。したがって、側底側から Wnt5a シグナルを活性化することがシストの内腔形成に重要であると考えられた(図 4B)。

私共は Wnt5a シグナルが Rac1 の活性化を介して IEC6 細胞の頂底極性の決定に関与すること、がん細胞株において Wnt5a シグナルが細胞-ECM 接着を促進することを報告している。そこで、MDCK I 細胞において Wnt5a シグナルが細胞-ECM 接着や Rac1 の活性化に対する影響を解析した。その結果、Wnt5a の発現や分泌を抑制すると FAK や Paxillin のリン酸化、Rac1 活性が抑制され、それらの表現型は頂端側に分泌される Wnt5aL68N では影響しないが、側底側に分泌される野生型の Wnt5a によってレスキューされた。したがって、極性化された MDCK I 細胞において側底側から Wnt5a シグナルが活性化されることにより、細胞-ECM 接着や Rac1 の活性が促進されることが示唆された。これまでに、細胞接着が抑制された MDCK 細胞におけるシストの内腔形成(cavitation)においてアポトーシスが重要であることが知られている。そこで、Wnt5a シグナルが抑制された MDCK I 細胞におけるシストの内腔形成にアポトーシスが関与するかを解析した。その結果、コントロール細胞ではアポトーシス細胞は見られませんが、IWP2 やノックダウンによって Wnt5a の分泌を抑制した MDCK I 細胞の内腔ではアポトーシス細胞が検出された。さらに、アポトーシス阻害剤の QVD-Oph を野生型の MDCK I 細胞に作用させてもシストの内腔形成に影響しないが、Wnt5a の発現や分泌を抑制した MDCK I 細胞に作用させると内腔形成が抑制された。これらの結果から、Wnt5a シグナルが抑制されると

細胞-ECM 接着や Rac1 の活性が抑制され、その結果、アポトーシスによって内腔形成が進行すると考えられる。

以上の結果から、極性化された MDCK 細胞において Wnt5a とその受容体の Fz2 と Ror2 受容体が側底側に輸送され、Wnt5a シグナルを活性化し、細胞-ECM 接着を促進することにより、シストの内腔形成を促進すると考えられた。

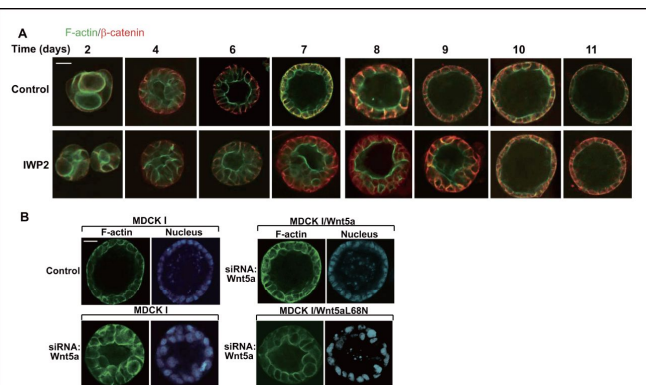


図4 MDCK細胞のシスト形成においてWnt5aシグナルが必要である。
A. MDCKI細胞におけるシスト形成において IWP2によってWnt5aの分泌を抑制すると、シスト形成が遅延する。
B. MDCKI細胞においてWnt5aをノックダウンするとシスト形成が抑制される。側底側に分泌されるWnt5a野生型の発現によってシスト形成遅延がレスキューされるが、N末端側に糖鎖修飾部位を挿入し、頂端側に分泌されるWnt5aL68N 変異体においてはレスキューされない。

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 6件)

(原著:4編)

1. Harada, T., Yamamoto, H., Kishida, S., Kishida, M., Awada, C., Takao, T., and Kikuchi, A. Wnt5b-associated Exosomes promote cell proliferation and migration in a cancer cell context. *Cancer Sci.* 108, 42-52, 2017, 2016
2. Mihara, E., Hirai, H., Yamamoto, H., Tamura-Kawakami, K., Matano, M., Kikuchi, A., Sato, T., and Takagi, J. Active and water-soluble form of lipidated Wnt protein is maintained by a

serum glycoprotein
afamin/ α -albumin. *eLife* e1162
1, 2016 (査読:有)

3. Yamamoto, H., Awada, C.,
Matsumoto, S., Kaneiwa, T.,
Sugimoto, T., Takao, T., and
Kikuchi, A. Basolateral
secretion of Wnt5a in polarized
epithelial cells is required
for apical lumen formation. *J.
Cell Sci.* 128, 1051-1063, 2015
4. Shojima, K., Sato, A., Hanaki,
H., Tsujimoto, I., Nakamura, M.,
Hattori, K., Sato, Y., Dohi, K.,
Hirata, M., Yamamoto, H.,
and Kikuchi, A. Wnt5a promotes
cancer cell invasion and
proliferation by
receptor-mediated
endocytosis-dependent and
-independent mechanisms,
respectively. *Sci. Rep.* 5, 8042,
2015

(和文総説:2編)

1. 山本英樹, 菊池 章: Wnt シグナルにお
ける Frizzled 受容体の活性化機構: **医学
のあゆみ** GPCR 研究の最前線 2016 256,
421-429, 2016
2. 山本英樹, 菊池章: Wnt の脂質修飾を標
的にしたがん創薬: **The Lipid** 25 巻 4 号,
443-450, 2014

[学会発表](計 3件)

1. 山本 英樹、梅田 大介、松本 真司、菊池
章 肝細胞における LDL による LRP6 の異
なるエンドサイトーシス経路の制御機構
第 89 回日本生化学会大会 仙台 2016
年 9 月
2. 山本 英樹、粟田 ちひろ、高尾 敏文、菊
池 章 Wnt5a の極性分泌による上皮
細胞の内腔形成制御機構 第 88 回日
本生化学会大会 神戸 2015 年 12 月
3. 山本 英樹、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 とその受容体の輸送制御
機構 第 87 回日本生化学会大会 京都
2014 年 10 月

[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

(4)研究協力者

()

研究者番号: