

研究テーマ

Wnt3a のシグナル伝達に関するコンドロイチン硫酸鎖の機能の解明

1. はじめに

Wnt シグナル伝達経路には、 β -カテニンを介して遺伝子発現を制御する β -カテニン経路をはじめ少なくとも 3 種類の経路が知られているが、経路によって生体に与える影響も異なる。3 種の経路のうち、古くから解析が進められてきた β -カテニン経路は細胞の増殖や分化、体軸形成、器官形成に関与することが明らかになっている。 β -カテニン経路は、細胞質の β -カテニンのタンパク量を調節することにより、T-cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) を介する遺伝子発現を制御している。通常、Wnt の刺激がない場合、細胞質に存在する β -カテニンは低いレベルで保たれている。これは β -カテニンが glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) によってリン酸化された後、ユビキチン化を受け、最終的にプロテアソームにより分解されるからである。一方、Wnt の存在下では、Wnt が細胞膜上の Frizzled と補受容体である low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6 に結合することで細胞内にシグナルが入力され、 β -カテニン経路が活性化される。Wnt シグナルが細胞内に伝達されると、細胞内シグナル仲介分子である Dishevelled が GSK-3 β 依存性の β -カテニンのリン酸化を抑制し、細胞質に β -カテニンが蓄積する。その後、 β -カテニンは核内に移行して転写因子である TCF/LEF と複合体を形成して標的遺伝子の発現を誘導する。標的遺伝子の発現制御により細胞の運命が決定されるので、Wnt シグナル系を調節する機構の解明は非常に重要である。

これまで、細胞外で Wnt シグナル系を制御する分子の 1 つとしてヘパラン硫酸プロテオグリカン (HS-PG) が広く知られていた。しかし最近の研究結果から、軟骨においては HS-PG だけでなくコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CS-PG) も Wnt シグナルを調節する可能性が示唆されている。軟骨形成に Wnt シグナルが関与しており、また、変形性関節症の初期病変として細胞外マトリックスの CS 量の減少が認められている。さらに、軟骨細胞の CS 量を実験的に操作すると β -カテニン経路のシグナルの流れが調節されることも示されている。このように CS-PG の関与が示唆されているものの、Wnt シグナルに影響を与える CS 合成酵素は同定されていなかった。そこで我々は、GAG 合成酵素の欠損変異株を用いて、CS 合成酵素の 1 つ、コンドロイチン 4-硫酸基転移酵素 (C4ST-1) が Wnt シグナルを調節することを明らかにした。また、C4ST-1 によって合成される特異的な糖鎖構造が Wnt-3a シグナルを制御していることを明らかにした。さらに、C4ST-1 によって合成される糖鎖構造が、Wnt-3a に対する応答にどのように関与しているのかを明らかにした¹⁾。

2. 方法

Wnt-3a に対する応答性の比較、および Wnt-3a シグナルに関与する糖鎖構造の解析は、Wnt-3a シグナルに応答して蓄積する β -catenin をウエスタンブロッティング法によって検出し、比較することで行った。細胞を溶解し、細胞質タンパク質を回収した。そして、ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE によって分子サイズにより分画した後、抗 β -catenin 抗体を用いて検出し、ウエスタンブロッティング

の結果を NIH Image ソフトウェアを用いて定量した。細胞表面に結合した Wnt-3a は、Wnt-3a と抗 Wnt-3a 抗体の複合体を細胞に添加し、蛍光標識した抗体を用いることにより可視化した。その後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

3. 結果と考察

今回、我々はグリコサミノグリカン (GAG) 合成酵素欠損細胞を用いることにより、Wnt-3a シグナルに必要な遺伝子の同定に成功した。マウス線維芽細胞 L 細胞の変異株で HS 合成酵素の *EXT1* および CS 合成酵素の *C4ST1* が欠損している *sog9* 細胞において、Wnt-3a に対する応答性が低下していることを明らかにした (図 1)。そこで、2 つの欠損遺伝子 (*EXT1* および *C4ST1*) のうち、Wnt-3a に対する応答性に影響を与えた原因遺伝子を同定するため、*sog9* 細胞に *EXT1* あるいは *C4ST1* をそれぞれ安定に導入した細胞を作成した。その結果、*EXT1* を導入しても *sog9* 細胞の Wnt-3a に対する応答性を回復させることはできなかった (図 1A)。しかし、*C4ST1* を導入すると、応答性は L 細胞と同程度まで回復され、さらに回復の程度は *C4ST1* の発現レベルに正の相関性を示した (図 1B)。これらの結果から、Wnt-3a に対する応答性の強弱は *C4ST1* の発現レベルによって微細調節されることが示唆された。

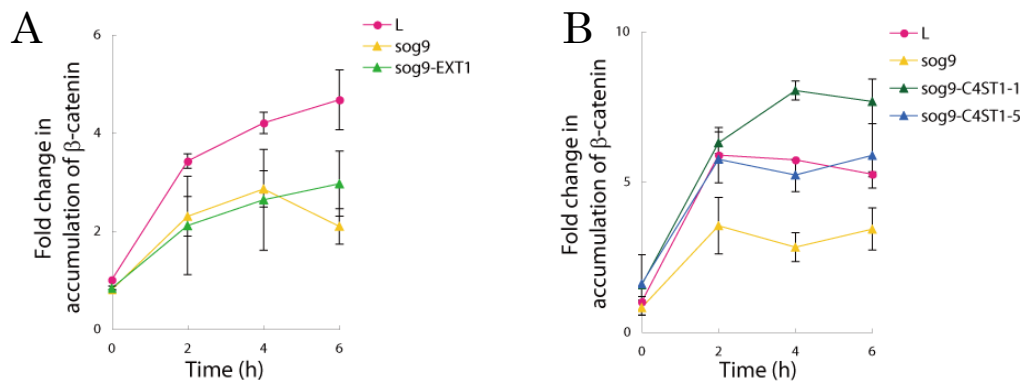


図 1. *EXT1* または *C4ST1* の過剰発現が *sog9* 細胞の Wnt-3a シグナル伝達に与える影響

A では *EXT1*、B では *C4ST1* の過剰発現が Wnt-3a 応答に与える影響を調べた。ウェスタンブロッティング法によって細胞内に蓄積した β -catenin を検出し、NIH Image ソフトウェアを用いて定量した。独立した 2 回の実験から得られた平均値±標準偏差をグラフにプロットした。

さらに、我々は Wnt-3a シグナルを調節する CS の構造上の特徴を明らかにした。図 1 で Wnt-3a に対する応答性は *C4ST1* が微細調節することを示した。*C4ST1* は GalNAc の 4 位を硫酸化する硫酸基転移酵素であり、CS-A 構造 (GlcA β 1-3GalNAc(4-*O*-sulfate)) あるいは CS-E 構造 (GlcA β 1-3GalNAc(4,6-*O*-sulfate)) の合成に関わる。*C4ST1* を過剰発現する *sog9* 細胞においても上記の 2 種類の糖鎖構造の発現量が増加していた。また、BIACORE を用いた相互作用解析から、Wnt-3a は CS-A 構造にはほとんど結合性を示さず、CS-E 構造に高い親和性を示すことが明らかとなった。このことから、*C4ST1* によって合成される CS-E 構造が Wnt-3a シグナルの微細調節を行っている可能性が示唆された。そこで、CS-E 構造を持つ糖鎖を外来的に添加することにより、Wnt-3a に対する応答性に影響があるかを調べた (図 2)。その結果、予想通り、Wnt-3a と親和性の高い CS-E を添加したときのみ応答性が変化した。このことから、*C4ST1* によって合成される CS-E 構造が特異的に Wnt-3a シグナルを調節していることが明らかになった。また、CS-E を添加すると Wnt-3a に対する応答性が低下した。この結果は、遊離の GAG 鎖に結合した Wnt-3a は、Wnt 受容体に提示されないことを示している。塩基

性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) の場合、外来的に添加したヘパリンや HS 鎖は細胞表面の HS-PG と同じように機能して、FGF シグナルを活性化することが報告されている。FGF シグナルの活性化には、糖鎖部分の HS 鎖のみが重要であり、必ずしも HS-PG として細胞表面に発現していなくてもよいと考えられる。しかし、Wnt-3a シグナルの場合、外来的に添加した CS-E 鎖は Wnt-3a シグナルを活性化しないので、コアタンパク質に結合した CS-PG がシグナルの調節に働くことが示唆された。

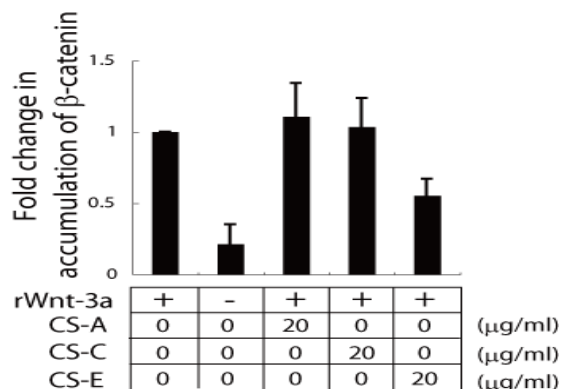


図 2. 外来的に添加した CS-E の Wnt-3a シグナルに与える影響

様々な構造を持つ糖鎖を外来的に添加することにより、Wnt-3a シグナルに関与する糖鎖構造を調べた。細胞内に蓄積した β -catenin をウエスタンブロッティング法によって調べ、NIH Image ソフトウェアを用いて定量した。独立した 2 回の実験から得られた平均値±標準偏差をグラフにプロットした。

さらに、*C4ST-1*によって合成される CS-E 構造がどのような役割を担っているのか調べた。その結果、*C4ST-1*の発現レベルの高い細胞ほど細胞表面に存在する Wnt-3a 量が増加していることが明らかになった。つまり、Wnt-3a が CS-E 構造をもつ PG によって細胞表面に捕捉され、Wnt-3a の細胞表面濃度を増加させた結果、Wnt-3a のシグナル伝達が促進されることが示唆された。

以上の結果をまとめると、*C4ST-1*によって合成される CS-E 構造が細胞表面の Wnt-3a 濃度を厳密に制御することによって Wnt-3a に対する細胞の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。Wnt シグナル伝達経路の異常が、ある種の癌の原因であることはよく知られている。最近では、アルツハイマー病、糖尿病、肥満や骨粗鬆症などの生活習慣病にも関与することも報告されている。本研究をさらに発展させ、細胞が *C4ST-1* の発現をどのように制御して Wnt に対する細胞応答を調節するのかについて深く理解することができれば、これらの疾患の原因の解明や新しい治療法の開発につながるかもしれない。

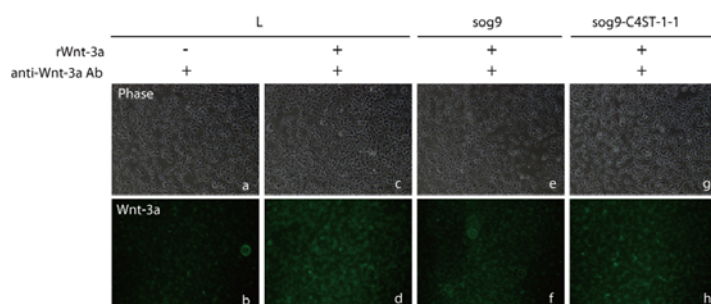


図 3. 細胞の表面に結合している rmWnt-3a 量の比較

細胞表面に結合している Wnt-3a を抗 Wnt-3a 抗体を用いた抗体免疫染色法によって可視化した。

4. 発表論文、

1) Satomi Nadanaka, Miho Ishida, Masami Ikegami, and Hiroshi Kitagawa.

Chondroitin 4-*O*-sulfotransferase-1 modulates Wnt-3a signaling through control of E disaccharide expression of chondroitin sulfate.

J. Biol. Chem. 283, 27333-27343 (2008)