

(様式 3)

平成 24 年度学融合推進センター学融合研究事業 研究成果報告書

研究テーマ名称	ヘパラン硫酸微小構造(HSNS)による Wnt シグナルの制御
応募事業区分	若手研究者研究支援事業
申請代表者氏名	三井 優輔

○ 研究状況報告

1. モルフォゲンである Wnt の基本的性質を明らかにするため、蛍光相関分光法 (FCS) を用いて、アフリカツメガエル (以下 *Xenopus*) 胚における組織中での Wnt 蛋白質の動態を計測した。得られた結果は従来認識されていたモルフォゲンの概念に修正をせまるものであった。このため、当初は計画していなかったが、観察結果を一般化すべく、モルフォゲンの濃度形成過程の数理モデルを構築した。これらの結果を含むこれまでの研究成果をまとめ、現在投稿中である (Mii et al)。

2. *Xenopus* の初期発生における *in vivo* (生体内) での Wnt 蛋白質の分布を可視化することは、その作用機序を考えるうえで重要である。しかし *in vivo* での Wnt 蛋白質の可視化はこれまで困難であると考えられてきた。これを克服するためには良質な抗体を作成することが重要だと考えられる。所属研究室の高田律子博士らは抗 Wnt 抗体の作成に実績があり、高田博士らと共同で Wnt8 および Wnt11 の組替え蛋白質を作成した。現在それらの組替え蛋白質をウサギに免疫中である。

○ 当該事業年度において達成された研究成果

Xenopus 胚を用いた解析から、分泌性蛋白質 Wnt は細胞外空間において大部分が HSNS を含む細胞表面に「結合している」一方で、微量ながら自由拡散成分が存在していることが示唆された。このことは従来、単一成分として考えられてきた「拡散する」モルフォゲンの概念の見直しを迫る知見である。

この結果を受けて、細胞間隙での分泌蛋白質の分布および挙動を統合的・包括的に理解する為に、数理モデルの構築を試みた。このモデルは、分泌性蛋白質の結合成分および自由拡散成分を考慮し、それらの間の状態遷移 (結合、解離、細胞内への取込み等) の時間的変化を記述している。コンピュータを用いて、数値的に蛋白質の分布の時間変化の解析を行った結果、Wnt を含む既知のモルフォゲンの分布をよく説明できることが示された。

また予備的な結果として、(i) 免疫電顕法の為の *Xenopus* 胚の固定条件の検討を行い、抗原性を保持できる固定条件を得た、(ii) アクチンのライブイメージング条件の検討を行い、アクチン結合性ペプチドの lifeact を用いることで良好な結果を得た。

○ 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト (論文があれば添付)

該当無し

(様式 3)

平成 25 年度学融合推進センター学融合研究事業 研究成果報告書

研究テーマ名称	ヘパラン硫酸微小構造(HSNS)による Wnt シグナルの制御
応募事業区分	若手研究者研究支援事業
申請代表者氏名	三井 優輔

○ 研究状況報告

ヘパラン硫酸微小構造(HSNS)の分子的性状を明らかにするため、当初計画通り、アフリカツメガエル胚においてヘパラン硫酸鎖の修飾酵素である

N-deacetylase/N-sulfotransferase (NDST)の過剰発現、およびアンチセンスモルフォリノオリゴ (MO) による発現阻害実験を行った。

この結果、NDST1 の過剰発現により、これまでに同定してきた N-sulfo HSNS は増加する一方、N-acetyl HSNS は減少した。また MO 注入細胞では過剰発現とは逆に N-sulfo HSNS は減少する一方、N-acetyl HSNS は増加した。このことから、NDST1 は内在性の N-sulfo HSNS の形成に必要であるとともに N-acetyl HSNS が N-sulfo HSNS へと転換された可能性が示唆される。

更に NDST1 が細胞外空間で Wnt リガンドに与える影響を検討するために過剰発現実験を行ったところ、NDST1 発現細胞の表面に EGFP-Wnt8 が集積することが明らかになった。このことは Wnt8 が N-sulfo HSNS と共局在を示すという以前のデータと一致するものである。またこれまで HSNS の大きさは細胞間隙の幅からナノメートル単位ではないかと推測してきたが、通常の光学顕微鏡の分解能以下である可能性が高く、実際の大きさは不明であった。そこで生理学研究所の深田教授らの協力を得て、超解像顕微鏡 STED を用いて、HeLa 細胞に見られる HSNS を高解像度(分解能 70 nm 程度)にて撮影した。その結果およそ N-sulfo HSNS、N-acetyl HSNS ともに 150 nm 程度の直径(半値幅)であることが示唆された。

○ 当該事業年度において達成された研究成果・今後の展望等

NDST は生化学的にはヘパラン硫酸鎖の N-acetyl glucosamine を N-sulfo 化する酵素として知られており、本研究から示唆される N-acetyl HSNS の N-sulfo HSNS への転換は、生化学的知見と合致するものである。またこのことからそれぞれの HSNS が光学顕微鏡で識別可能な別構造を形成しているという新たな概念が支持される。従来 N-acetyl HS (GluAGlcNAc)と N-sulfo HS (GluAGlcNS)は同一糖鎖上でそれぞれが連続するドメイン構造を形成しているという知見があるものの、それらが独立に構造化しているという報告はこれまでなく、Wnt シグナルの調節における機能と併せて新たな概念を提示しうると考えている。

○ 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト (論文があれば添付) 該当なし。