



## 硫酸化糖鎖による形態形成因子 Wnt のシグナル伝達と拡散の調節機構

### 1. はじめに

Wnt シグナル伝達経路は、胚発生時期の形態形成や成体の種々の代謝経路の恒常性の維持に重要な役割を果たすとともに、がん化に関連した情報伝達経路としても知られている。Wnt シグナルの強さやその持続性、Wnt 分子の空間分布などの調節は正常な細胞機能の維持に重要であるが、これらを制御する因子の一つとして硫酸化糖鎖による修飾を受けたプロテオグリカンがある。本稿では、細胞表面や細胞外マトリクスの硫酸化糖鎖による Wnt のシグナル伝達や拡散の制御機構について紹介する。プロテオグリカンは細胞表面や細胞外マトリクスに存在し、様々なシグナル分子と相互作用する。この相互作用によって、シグナル分子の受容体への提示、受容体の二量体化、シグナル分子の濃縮や安定化、シグナル分子の濃度勾配形成などが引き起こされ、シグナル伝達が調節されると考えられている。プロテオグリカンの糖鎖修飾部分であるグリコサミノグリカン鎖は、様々なパターンで硫酸化修飾を受けることを構造上の特徴とし、特定の硫酸化修飾構造がタンパク質との結合を規定すると考えられている。そのため、著者らは、シグナル分子との結合の情報が硫酸化のパターンによって糖鎖上書き込まれていると考えており、これを「糖鎖暗号」と呼んでいる。本稿では、Wnt シグナルの調節に関する硫酸化構造について言及するため、まず、グリコサミノグリカンの構造と生合成機構について概説する。

### 2. グリコサミノグリカンの構造と生合成

グリコサミノグリカン鎖は、コアタンパク質に結合したプロテオグリカンとして、細胞表面や細胞外マトリクスに存在する。小胞体でコアタンパク質が合成された後、特定

のセリン残基に、キシロース残基、二つのガラクトース残基、グルクロン酸残基が次々と転移して「四糖結合領域」が合成される。その後、ゴルジ体で糖鎖の伸長反応が起こり、直鎖状の長い「二糖繰り返し領域」が合成される(図1)<sup>1,2)</sup>。グリコサミノグリカン鎖は、二糖繰り返し領域を構成する二糖の種類によって、コンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸あるいはヘパラン硫酸/ヘパリンに大別される。それぞれの糖残基の転移反応は、対応する糖転移酵素によって触媒されており、ほぼすべての糖転移酵素がクローニングされている。基本骨格の合成とともに、ウロン酸のエピメリ化や硫酸基転移酵素による硫酸化修飾が起こり、構造に多様性がもたらされる(図1)。Wnt シグナルの調節に関与する構造は、コンドロイチン硫酸の二糖構造 GlcA $\beta$ 1-3GalNAc にコンドロイチン 4-O-硫酸基転移酵素(C4ST-1)が作用した後、コンドロイチン 4 硫酸 6-O-硫酸基転移酵素が働いた結果生じる特殊な構造であり、以下 CS-E 構造と呼ぶ(図1)。

### 3. Wnt シグナル伝達を調節する硫酸化糖鎖

Wnt シグナルが硫酸化グリコサミノグリカン鎖によって調節されることを示す例は既に報告されている。例えば、Wingless/Wnt-1 が細胞表面のグリコサミノグリカン鎖に強く結合することから、プロテオグリカンが補助受容体やリガンド分子のリザーバーとして機能する可能性が示されており<sup>3)</sup>、実際に *Drosophila* に遺伝学的手法を用いてヘパラン硫酸の合成不全を起こすと、Wingless のシグナル伝達や Wingless 分子の空間的分布が影響を受けることが示されている<sup>4)</sup>。また、変形性関節症の初期にグリコサミノグリカンの減少が認められ、その結果、関節軟骨細胞の Wnt シグナルが影響を受ける可能性が示されている<sup>5)</sup>。このように、硫酸化グリコサミノグリカンによって Wnt シグナルが制御されることは報告されていたが、グリコサミノグリカンのうち、ヘパラン硫酸とコンドロイチン硫酸のどちらが重要なのか、あるいはどのような硫酸化構造によって Wnt シグナルが制御されるのかについては明らかではなかった。

Wnt シグナル伝達に関連する糖鎖構造を同定するために、グリコサミノグリカン合成酵素遺伝子を欠損したマウス線維芽細胞(L細胞)の変異株を用いて実験を行った。Wnt シグナル経路には、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路、Wnt/PCP 経路、Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の3種類が知られているが<sup>6)</sup>、著者らはまず Wnt/ $\beta$ -catenin 経路について調べた。Wnt が存在しない場合、細胞質の $\beta$ -カテニンはグリコーゲン合成酵素キ

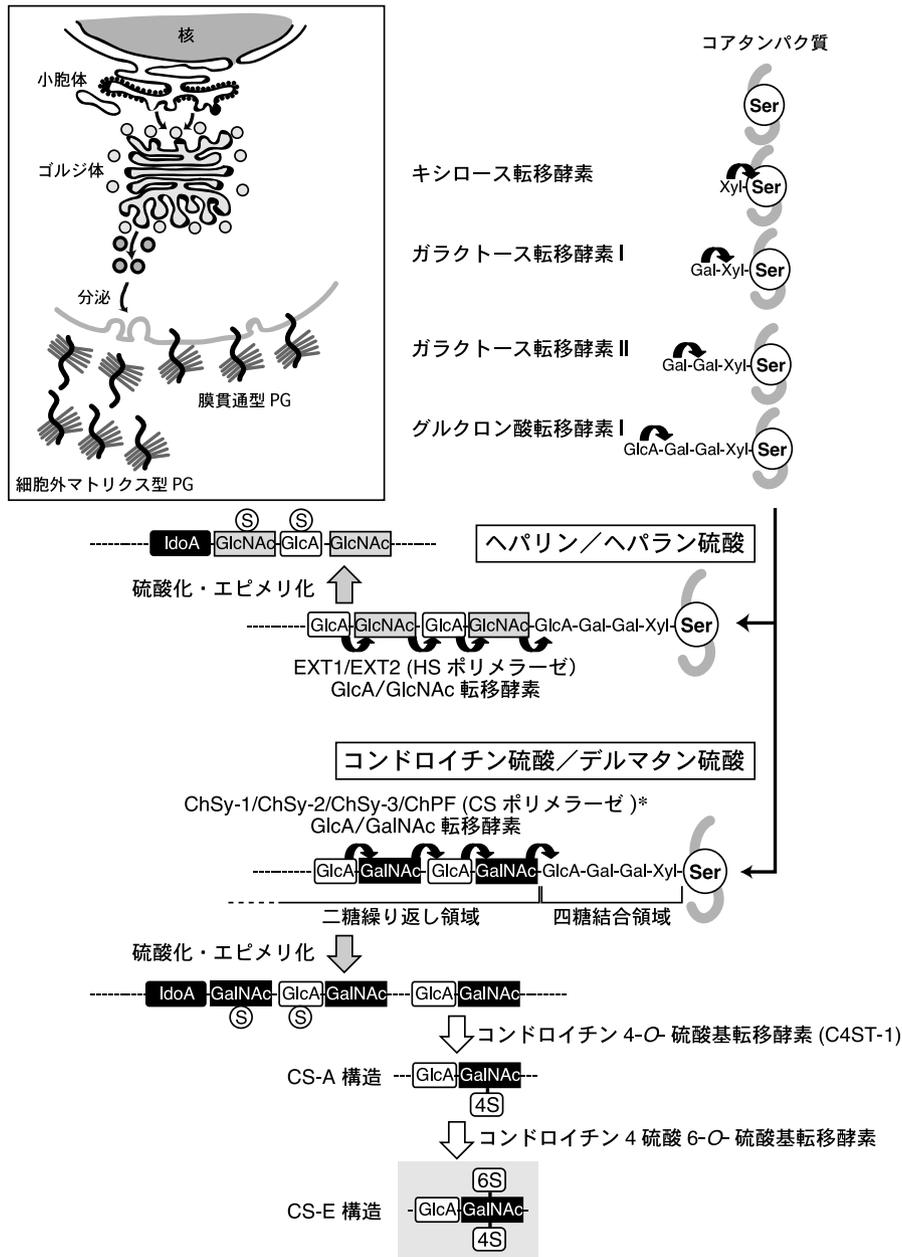


図 1 グリコサミノグリカン鎖の生合成

小胞体で合成されたコアタンパク質のセリン残基に Xyl が転移されることでグリコサミノグリカンの修飾反応が開始する。二つの Gal, GlcA が順次転移して結合領域が合成された後、GlcNAc と GlcA が EXT1/EXT2 (ヘパリン硫酸ポリメラーゼ) によって交互に連続して転移され、ヘパリン硫酸鎖が合成される。GalNAc と GlcA が転移されれば、コンドロイチン硫酸鎖が合成される。二糖繰り返し領域は硫酸化 (図では S と示す) による修飾を受けたり、一部の GlcA が IdoA (イズロン酸) に変換されて、糖鎖の構造多様性が生み出される。グリコサミノグリカンの修飾反応は主にゴルジ体で起こり、その後、細胞表面や細胞外マトリクスへ輸送される。\*、コンドロイチン硫酸ポリメラーゼは Chondroitin synthase-1 (ChSy-1), ChSy-2, ChSy-3, Chondroitin polymerizing factor (ChPF) のいずれか二つの複合体よりなる。Xyl: キシロース, Gal: ガラクトース, GlcNAc: N-アセチルグルコサミン, GalNAc: N-アセチルガラクトサミン, GlcA: グルクロン酸, PG: プロテオグリカン。

ナーゼ 3β (GSK3β) によってリン酸化され、ユビキチン化されてプロテアソームで分解される。一方、Wnt シグナルが入力されると、GSK3β の活性化が阻害され、β-カテニンの安定性が増した結果、細胞質で β-カテニンが蓄積する。したがって、細胞質における β-カテニンの蓄積を指標に Wnt/β-catenin 経路の活性化状態を調べた。また、ほ乳類では、19 種類の Wnt が知られており、Wnt-3a はそのうちのひとつで、Wnt/β-catenin 経路を活性化させる。本研究では、Wnt/β-catenin 経路を活性化させるためのリガンドとして Wnt-3a を用いた。ヘパラン硫酸合成に関与する *EXT1* 遺伝子 (図 1) を欠損した細胞ではヘパラン硫酸

が顕著に減少しているが、この変異株の Wnt-3a に対する応答性は親株と変わらなかった。コンドロイチン硫酸の 4 位の硫酸化に関与する硫酸基転移酵素 *C4ST-1* 遺伝子 (図 1) と *EXT1* 遺伝子を欠損した細胞 (*sog9*) では、Wnt-3a による β-カテニンの蓄積が顕著に抑制されることがわかった (図 2A)。また、コンドロイチン硫酸分解酵素で細胞を処理することによっても、Wnt-3a シグナル伝達が顕著に抑制された。これらの結果、Wnt-3a によるシグナル伝達には、コンドロイチン硫酸が重要であることが示された。また、*C4ST-1* によって合成されるコンドロイチン硫酸の構造が、シグナル伝達に密接に関与する可能性が示唆

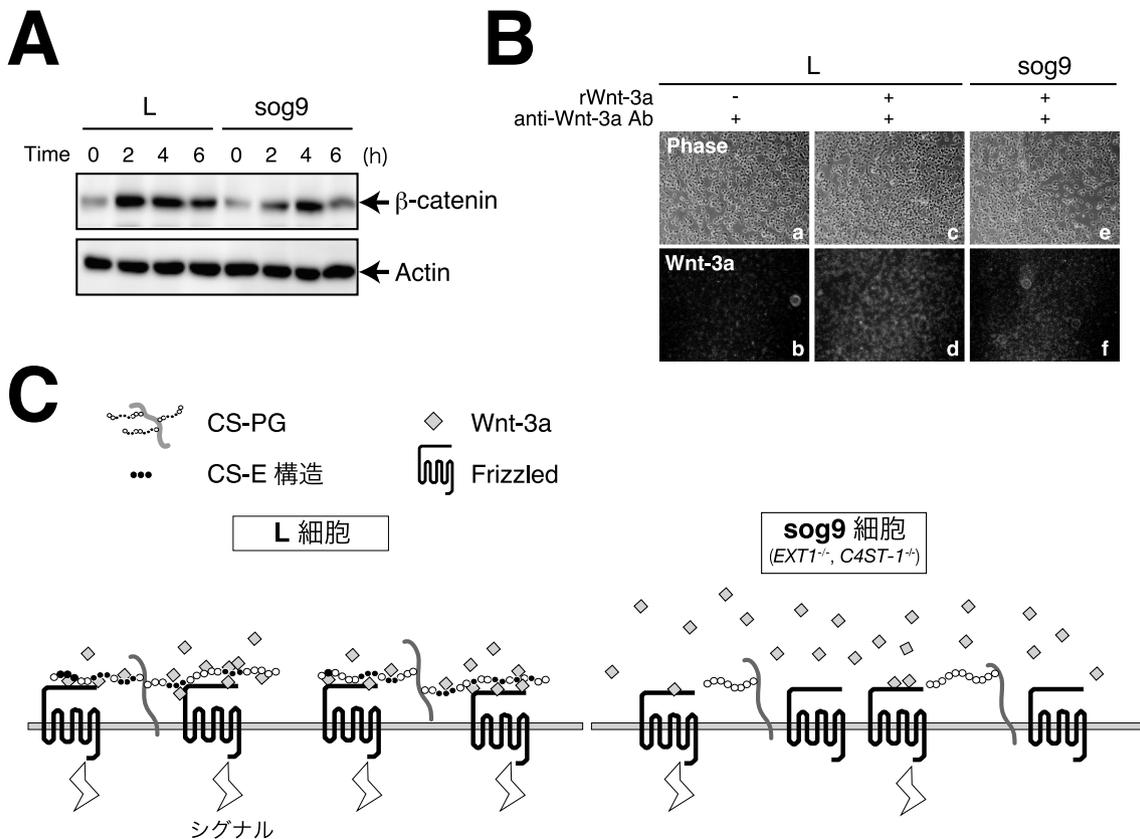


図 2 C4ST-1 による Wnt-3a シグナルの調節

(A) マウス線維芽細胞 (L 細胞) とその変異株 *sog9* 細胞の Wnt-3a に対する応答性を調べた。各細胞を Wnt-3a で示された時間処理後、細胞内に蓄積する β-カテニンの量を比較した。Sog9 細胞では、ヘパラン硫酸の合成に関与する糖転移酵素 *EXT1* とコンドロイチン硫酸の硫酸化に関わる *C4ST-1* 遺伝子に変異があり、コンドロイチン硫酸の硫酸化構造が変化した結果、Wnt-3a に対する応答が抑制されていると考えられる。

(B) L 細胞と *sog9* 細胞にリコンビナント Wnt-3a タンパクを添加し、抗 Wnt-3a 抗体を用いて、細胞表面に結合した Wnt-3a タンパクを可視化した。L 細胞に比べ、*sog9* 細胞の細胞表面は Wnt-3a に対する親和性が低い状態にあることが示された。

(C) L 細胞の細胞表面は、Wnt-3a に高い親和性を示す CS-E 構造を含むコンドロイチン硫酸で覆われているため、Wnt-3a リガンド分子が濃縮され、効率的にシグナルが伝達される。一方、*C4ST-1* の欠損によって CS-E 構造が合成できない *sog9* 細胞では、Wnt-3a の細胞表面濃度が低下するためシグナル伝達は減弱する。

された。C4ST-1 遺伝子の欠損によって、4位が硫酸化された二糖構造 -GlcA $\beta$ 1-3GalNAc(4-O-sulfate)- (CS-A 構造) と4位と6位が硫酸化された二糖構造 -GlcA $\beta$ 1-3GalNAc(4,6-O-sulfate)- (CS-E 構造) の減少を認めたが、Wnt-3a タンパクは CS-A 構造にはほとんど結合せず、CS-E 構造に高い親和性を示したので、後者が Wnt-3a シグナルの調節に関与すると考えられる。Wnt-3a 分子の細胞表面への結合を調べたところ、CS-E 構造の発現が高い細胞に多数の Wnt-3a 分子が結合することがわかった (図 2B, C)。また、CS-E 構造の含量が高いコンドロイチン硫酸の添加により Wnt-3a シグナル伝達は抑制された。これらの結果から、CS-E 構造を含むプロテオグリカンが Wnt-3a の低親和性の受容体として機能するというよりは、Wnt-3a 分子を細胞表面に濃縮することによってシグナル伝達を促進していると考えられた (図 2C)<sup>7)</sup>。

1本のコンドロイチン硫酸鎖の構造は均一ではなく、したがって、たった1本の糖鎖上にも膨大な量の情報をコードすることができると考えられる。本実験に用いたマウス

線維芽細胞 (L細胞) は CS-A 構造を主成分とし、CS-E 構造を約 10% 含むコンドロイチン硫酸を合成する。本研究から、CS-E 構造が Wnt-3a シグナルの調節に関与することが明らかになったが、この構造は BMP4 シグナルの制御にも関連することが報告されている<sup>8)</sup>。また、CS-A 構造は Indian Hedgehog シグナルの調節に関与する<sup>9)</sup>。1本のコンドロイチン硫酸鎖の中に、複数のシグナル伝達の調節に関わる配列を内包する利点は、同時に複数のシグナル伝達経路を調節できる点にあると考えられる。細胞内では複数のシグナル伝達経路がネットワークを形成し、経路間でクロストークしながら、複雑な生命現象を進行させている。「糖鎖暗号」の概念は、このようなシグナル伝達ネットワークの複雑な制御機構を理解する一つの切り口となるのではないかと考えている。

#### 4. Wnt 分子の拡散に果たす硫酸化糖鎖の役割

形態形成因子は産生細胞から分泌された後、濃度勾配を形成しながら標的細胞へ拡散する。産生細胞からの距離に

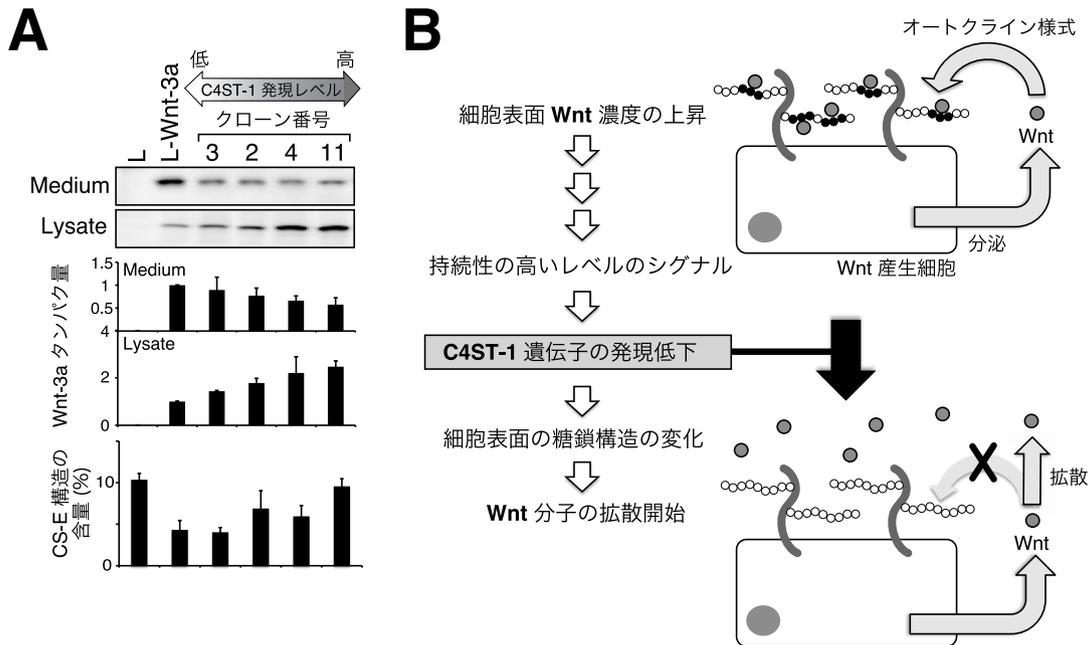


図3 C4ST-1によるWnt-3aの拡散の調節

(A) Wnt-3aを発現するL細胞(L-Wnt-3a)にC4ST-1遺伝子を導入した細胞をつくり、C4ST-1の発現レベルによってWnt-3aタンパクの拡散が調節されていることを調べた。C4ST-1の発現が上昇するとCS-E構造の含量が増え、それにともなって、培地へ拡散されたWnt-3aタンパクの量は減少し、細胞画分に回収される量は増加した。

(B) Wnt-3a産生細胞では、分泌されたWnt-3a分子がオートクライン様式で作用することで比較的高いレベルのシグナルが入力され続ける。これにより、C4ST-1遺伝子の発現が低下して細胞表面の糖鎖構造の変化を引き起こし、Wnt-3aタンパクとの親和性が低下した結果、Wnt-3a分子の拡散が開始される。

したがって濃度が変化するため、空間的な情報を与えることができ、場に応じて細胞の運命が決定される。形態形成因子の濃度勾配の形成にプロテオグリカンが関与することは既に示されている。例えば、Hedgehog分子は細胞表面でヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合し、オリゴマー化して細胞膜の局所に集積する。このオリゴマーは、細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンに受け渡されながら近接する細胞へ拡散（近距離拡散）、あるいはヘパラン硫酸プロテオグリカンごとリポタンパク顆粒に取り込まれて拡散（遠距離拡散）するモデルが提唱されている<sup>10)</sup>。ヘパラン硫酸プロテオグリカンと相互作用できない変異体Hedgehogでは、産生細胞からの拡散が顕著に抑制される。そこで、著者らはWnt-3a分子の拡散がプロテオグリカンによって調節される可能性についても検討することにした。

Wnt-3a分子を安定に発現するマウスの線維芽細胞（L-Wnt-3a細胞）をWnt-3a産生細胞として利用しようと考え、この細胞が合成するグリコサミノグリカン鎖を分析したところ、驚いたことに、親株と比較してコンドロイチン硫酸の硫酸化構造（CS-A構造とCS-E構造）が顕著に減少していた。コンドロイチン硫酸の硫酸化に関わる硫酸基転移酵素の発現量を調べた結果、*C4ST-1*遺伝子の発現が著しく低下していた。このような糖鎖の構造変化は、Wntシグナルによって引き起こされたと考えられるため、この生物学的な意味について考えた。前述したように、CS-E構造はWnt-3aに強い親和性をもつ。したがって、この構造の減少により細胞表面糖鎖とWnt-3a分子との親和性が低下し、Wnt-3a分子の拡散を促進しているのではないかという考えに至った。これを証明するために、L-Wnt-3a細胞に*C4ST-1*遺伝子を導入しCS-E構造を増やすと、Wnt-3a分子は細胞に保持され、拡散するWnt-3aが減少するという予想通りの結果を得た（図3A）。Wntシグナルは*C4ST-1*遺伝子の発現を調節することによって硫酸化糖鎖の構造を変化させ、Wntタンパクの細胞表面からの拡散を開始させることがわかった（図3B）<sup>11)</sup>。換言すると、Wntシグナルは糖鎖の生合成経路に作用して糖鎖暗号を書き換えることによってWnt分子の拡散を制御しているといえる。以上は、Wnt産生細胞でのモデル仮説であるが、これは産生細胞周囲の細胞群についても当てはまる。細胞表面や細胞外マトリクスに存在する硫酸化糖鎖は、Wnt分子の足場として機能し、Wnt分子は足場と結合・解離を繰り返しながら二次元的に拡散し濃度勾配を形成していることが想像される。今後、CS-E構造、あるいは*C4ST-1*の発現に

よって、Wnt分子の濃度勾配が調節されることを個体レベルで証明することが必要である。

## 5. おわりに

糖鎖は「第三の生命鎖」とも呼ばれている。それは、糖鎖のもつ構造多様性によって莫大な量の情報をコードすることができるからである。現状では、糖鎖構造と結合する相手タンパク質の特異性に関する統一的な見解は得られておらず、糖鎖暗号を解読するには至っていない。シグナル伝達の調節に関わる意味のある糖鎖構造を明らかにしていくとともに、その糖鎖構造の発現がどのように調節されるのかを理解することができれば、「微妙・曖昧・不可解」な糖鎖の印象が一新され、糖鎖の担う機能の本質が明らかになるかもしれない。

- 1) Nadanaka, S. & Kitagawa, H. (2008) *J. Biochem.*, 144, 7-14.
- 2) 北川裕之 (2004) 生化学, 76, 1175-1190.
- 3) Reichsman, F., Smith, L., & Cumberledge, S. (1996) *J. Cell Biol.*, 135, 819-827.
- 4) Wodarz, A. & Nusse, R. (1998) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 14, 59-88.
- 5) Shortkroff, S. & Yates, K.E. (2007) *Osteoarthritis Cartilage*, 15, 147-154.
- 6) Huelsken, J. & Behrens, J. (2002) *J. Cell Sci.*, 115, 3977-3978.
- 7) Nadanaka, S., Ishida, M., Ikegami, M., & Kitagawa, H. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 27333-27343.
- 8) Miyazaki, T., Miyauchi, S., Tawada, A., Anada, T., Matsuzaka, S., & Suzuki, O. (2008) *J. Cell Physiol.*, 217, 769-777.
- 9) Cortes, M., Baria, A.T., & Schwartz, N.B. (2009) *Development*, 136, 1697-1706.
- 10) Vyas, N., Goswami, D., Manonmani, A., Sharma, P., Ranganath, H.A., VijayRaghavan, K., Shashidhara, L.S., Sowdhamini, R., & Mayor, S. (2008) *Cell*, 133, 1214-1227.
- 11) Nadanaka, S., Kinouchi, H., Taniguchi-Morita, K., Tamura, J., & Kitagawa, H. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 4199-4208.

灘中 里美, 北川 裕之  
(神戸薬科大学学生化学研究室)

Regulation of Wnt-3a signaling and diffusion by sulfated glycosaminoglycans  
Satomi Nadanaka and Hiroshi Kitagawa (Department of Biochemistry, Kobe Pharmaceutical University, 4-19-1 Motoyamakita-machi, Higashinada-ku, Kobe 658-8558, Japan)