

論文審査の結果の要旨

氏名 三井 優輔

本論文は二部構成で、要旨、全体の序論、第一部と第二部、方法、全体の考察、結論、文献からなり、第一部と第二部については、それぞれ序論、結果、考察、図表からなっており、Wnt モルフォゲンの細胞外分布とシグナル受容の制御について解析した結果を述べている。

多細胞生物の発生において、細胞運命決定やパターン形成を適切に制御するためには、位置情報が必要と考えられ、「モルフォゲン説」は有力なモデルである。分泌性シグナル蛋白質の Wnt はその代表例であり、特に脊椎動物の初期発生では後方化のパターニングに関わる。一方、分泌性の Wnt 結合蛋白質の sFRP (secreted Frizzled-related protein) は前方の予定頭部領域で発現する。これまで Wnt と sFRP は互いに逆方向の濃度勾配を作ることで前後軸パターンニングを制御すると考えられてきたが、それらの蛋白質の分布はほとんど知られていなかった。本論文の第一部では、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 初期胚を用いて検討することで、sFRP の分布が広い一方、Wnt の分布は狭いことを明らかにし、さらに sFRP には Wnt の分布及びシグナル範囲を拡大する活性があることを初めて示した。これらの内容は既に国際誌上で公表されており、国際的に高く評価されている。第二部では分泌性蛋白質の細胞外分布の条件を明らかにし、その基礎となるヘパラン硫酸 (HS) の微小構造を発見した。これが Wnt の細胞外分布を制御することを示すと同時に、同時にシグナル受容の制御にも関わることを初めて示した。これらの研究成果は極めて高く評価できる。詳細は以下の通りである。

第一部ではまず、sFRP ファミリーの Frzb、Crescent (Cres)、および Wnt8 と Wnt11 について、蛍光蛋白質 Venus との融合コンストラクトにより、*Xenopus* 胚でのそれらの蛋白質の分布を検討した。その結果、Frzb と Cres は分布が広い一方、Wnt8 と Wnt11 は分布が非常に狭いことを見いだした。sFRP は Wnt と細胞外で結合することが知られているので、sFRP を共発現させて、Wnt の分布を検討したところ、相互の結合特異性に応じて Wnt の分布が広がることを発見した。これが本研究の発端となっている。さらに、これまで Wnt の阻害因子と考えられていた sFRP が、Wnt のシグナル範囲を広げ得ることを Luciferase レポーターアッセイや内在性の *otx2* の発現で明らかにした。さらに、内在性の Frzb と Cres の発現を antisense morpholino oligo (MO) を用いて阻害したときに、内在性の Wnt のシグナル勾配が、MO 注入胚ではコントロール胚よりも急になる

ことから、実際に sFRP が Wnt のシグナル範囲拡大に寄与していることが示唆された。sFRP のような分泌因子による Wnt の分布やシグナル範囲の制御はこれまでに無い、全く新しい知見である。

第二部では、Wnt8 と Frzb の細胞外分布の様式に着目した解析を行った。まず、光変換型蛍光蛋白質 mKikGR を用いた fluorescence decay after photoconversion (FDAP) 法を応用することで脊椎動物胚では初めて、細胞外蛋白質の「見かけの拡散係数」を計測することに成功した。重要なことに、得られた Wnt8 と Frzb の見かけの拡散係数は、分子量から予想される値よりも著しく小さく、これらの分泌性蛋白質の大部分が細胞表面や細胞外基質に結合していることが示唆された。また蛍光相関分光 (FCS) 法でも mVenus-Wnt8 の細胞外での挙動を解析し、これまでその整合性が十分理解されていなかった FDAP 法と FCS 法の特徴が明らかになった。この知見に加え、内在性の物質と相互作用しないと考えられる人工の分泌性蛋白質 SP-mVenus は細胞間隙には検出されないが、ヘパリン結合ペプチドを融合することで、細胞間隙に分布することを見いだした。さらに抗体を人工レセプターとして用いる「抗体トラップ法」を開発し、これにより分泌性蛋白質が細胞間隙に分布することは細胞に結合することに他ならない、という一般原理が初めて示された。次に結合の分子実体を探った。mVenus-Wnt8 と mVenus-Frzb は、*Xenopus* 胚の細胞間隙にドット状あるいは不均一な分布を示した。そこで、ヘパラン硫酸 (HS) 分解酵素を用い、内在の HS を分解した条件下で、Wnt8 や Frzb の分布を検討し、また内在の HS の分布を免疫染色で検討した。その結果、N-acetyl HS 及び N-sulpho HS が細胞間隙にドット状の微小構造を形成していることを見だし、HS nanostructure (HSNS) と名付けた。この構造はヒト由来の HeLa 細胞にも見いだされた。さらに Wnt8 は主として N-sulpho HS に、Frzb は主として N-acetyl HS の微小構造に結合することを明らかにした。Wnt は細胞内に取り込まれて、いわゆる「シグナロソーム」を形成するが、これに N-sulpho HS が含まれていることを示したことで、Wnt のシグナル受容は N-sulpho HS の微小構造が「シグナロソーム」の核となることを初めて明らかにした。

以上のように種々の手法を考案しつつ、また FDAP のような定量的手法と数理的解析を取り入れた上で、分子レベルで Wnt モルフォゲンの細胞外での制御を解明した本研究は高く評価できる。

なお、印刷公表予定の論文中の FDAP 法及び FCS 法の解析の一部は共著者の望月敦史博士や佐甲靖志博士らによるものであるが、本論文に記載されている解析は全て論文提出者が主体となって分析および検証を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。