

氏 名	こめ 米 かど 門 ひで 秀 ゆき 行
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3120 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a (Wnt-3a 蛋白質の糖鎖修飾とパルミチン酸修飾が共役することにより活性型の Wnt-3a 蛋白質が合成される)
論文調査委員	(主 査) 教 授 武 藤 誠 教 授 松 田 道 行 教 授 永 田 和 宏

論 文 内 容 の 要 旨

Wnt-3a 蛋白質は Wnt シグナル伝達経路において、細胞膜表面の受容体である Frizzled や LRP5/6 と結合し、 β -カテニン経路を活性化する代表的なリガンドであり、糖鎖およびパルミチン酸により修飾される。本研究では、Wnt-3a の糖鎖修飾とパルミチン酸修飾の連関について解析を行った。Wnt-3a が糖鎖を付加されるのは87番目および298番目のアスパラギンであり、両部位をグルタミンに置換した変異体 (Wnt-3a NQ) は細胞からの分泌が抑制されていた。また、精製 Wnt-3a 蛋白質の糖鎖を *in vitro* にて除去した場合、Frizzled8 との結合や β -カテニン経路の活性化能が減少した。一方、パルミチン酸を付加される77番目のシステインをアラニンに置換した変異体 (Wnt-3a C77A) は野生型の Wnt-3a と同程度の効率で分泌された。しかし、Wnt-3a C77A は野生型 Wnt-3a で見られる LRP6 の細胞内への移行を引き起こさず、また精製 Wnt-3a 蛋白質を *in vitro* にて脱パルミチン酸化した場合も、Frizzled8 や LRP6 との結合が抑制され、 β -カテニン経路の活性化能が失われた。Wnt-3a C77A は野生型と同様の糖鎖修飾を受けていたが、Wnt-3a NQ は脂質修飾を受けていないと考えられた。また、Wnt 蛋白質を基質とするアシルトランスフェラーゼと推定される Porcupine 蛋白質の共発現により、野生型 Wnt-3a のパルミチン酸化が増強されたが、Wnt-3a NQ ではこの効果はわずかであった。野生型 Wnt-3a は細胞内において小胞体およびゴルジ体の両方に局在したが、Wnt-3a NQ の局在は小胞体に限局されており、糖鎖修飾は Wnt-3a の小胞体からゴルジ体への輸送に必要である事が示された。さらに、小胞体からゴルジ体への小胞輸送の阻害物質である Brefeldin A にて細胞を処理したところ、Wnt-3a のパルミチン酸修飾は阻害されたが、糖鎖修飾は殆ど影響されず、糖鎖修飾とパルミチン酸修飾が細胞内の別の区画で行われる可能性が示唆された。以上の結果から、細胞内において Wnt-3a の糖鎖修飾はパルミチン酸修飾より先に行われ、活性型の Wnt-3a を合成するためには両修飾が共役して行われる事が必要である事が明らかになった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では申請者は、 β -カテニン経路を活性化する代表的な Wnt リガンドである Wnt-3a 蛋白質の翻訳後修飾について解析を行っている。Wnt-3a の糖鎖修飾は同蛋白質が合成される過程で細胞から分泌されるのに必須であり、また、精製 Wnt-3a から糖鎖を切断した実験から、糖鎖修飾がリガンドとして β -カテニン経路を活性化することにも寄与していることを示した。一方、77番目のシステインのパルミチン酸修飾は Wnt-3a の分泌には必須ではなかったが、Wnt-3a が受容体と結合し β -カテニン経路を活性化するのに必要であった。糖鎖修飾を受けない Wnt-3a の変異体は疎水性が失われ、アシルトランスフェラーゼと推定される Porcupine 蛋白質の共発現によるアシル化の増強効果が野生型に比べわずかであった。また、同変異体は小胞体からゴルジ体への移行が阻害された。これらの結果から、Wnt-3a の合成の過程で糖鎖修飾はパルミチン酸修飾より先に行われ、活性型の Wnt-3a を合成するためには両修飾が共役して行われる事が必要である事が明らかになった。

以上の研究は Wnt-3a 蛋白質の翻訳後修飾の意義の解明に貢献し、Wnt 蛋白質の分泌と作用の分子機構の解明に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものとみとめる。

なお、本学位授与申請者は、平成19年2月16日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。