

フコース修飾による Notch 情報伝達の制御機構



松野 健治

東京理科大学基礎工学部 助教授

1. 私が知りたかったこと

Notch 情報伝達系は、発生プロセスで重要な機能をはたしている。私は、Notch 情報伝達に不可欠な新規遺伝子を検索し、*O*-フコース転移酵素をコードする *O-fut1* を同定した。*O-fut1* は、Notch 受容体の細胞外ドメインにある EGF リピートに *O* 結合でフコースを付加する。単一種の糖鎖修飾が、膜貫通型受容体の機能に必須である事実は、たいへん興味深い。私は、Notch の *O*-フコシル化が、なぜ Notch 情報伝達に必要なのかを明らかにしたいと考えた。

2. 結果

(1) *O-fut1* は、Notch が、細胞膜からエンドソームに小胞輸送されるのに必要である

O-fut1 突然変異細胞では、Notch が細胞内の小胞に蓄積する。最近、Irvine (ラトガース大学) らは、*O-fut1* が、Notch に対するシャペロンとして機能し、*O-fut1* 突然変異細胞では、Notch の折りたたみが異常になって小胞体に蓄積しているとするモデルを提唱した (Science, 2005)。しかし、我々の結果は、*O-fut1* は、小胞体におけるクオリティーコントロールではなく、Notch のエンドサイトーシスに必須であることを示している。

まず、我々は、*O-fut1* 突然変異細胞における Notch の細胞内分布を、共焦点レーザー顕微鏡とデコンボリューション法を用いて詳しく解析した。その結果、Notch は、小胞体と近接して存在するが、小胞体マーカー陰性の細胞内小胞に蓄積していることが明らかになった。この結果から、Notch は、小胞体に蓄積しているのではないことがわかった。

次に、*O-fut1* 突然変異細胞において、小胞体から細胞膜への Notch の輸送が遅滞し

ている可能性について検討した。タグを付加した Notch を *in vivo* で発現させ、新規に合成された Notch のエキソサイトーシスによる輸送を経時的に調べた。その結果、野生型細胞と *0-fut1* 突然変異細胞のあいだで、Notch のエキソサイトーシスによる輸送に差異は観察されなかった。この知見は、*0-fut1* 突然変異細胞では、Notch が、クォリティーコントロールの機構によって小胞体に蓄積しているとする仮説と矛盾した。

これらの結果から、*0-fut1* 突然変異細胞で Notch が蓄積しているのは、小胞体からの輸送の異常によるものではないと考えられた。そこで、*0-fut1* 突然変異細胞において Notch が異常に蓄積するのは、その輸送経路のどこなのかを調べることにした。前述の結果から、*0-fut1* 突然変異細胞において、Notch の細胞膜への小胞輸送は正常であると考えられたので、Notch のエンドサイトーシス経路の異常について調べることにした。ショウジョウバエ 3 齢幼虫の翅成虫原基を、抗 Notch 抗体を含む培養液中で短期間培養することで、エンドサイトーシスによって取り込まれた Notch を検出した。その結果、Notch は、*0-fut1* 突然変異細胞においても、細胞膜表面に到達していることがわかった。さらに、*0-fut1* 突然変異細胞においても、エンドサイトーシスによる Notch の取り込みは起こるが、Notch は、初期エンドソームまで輸送されないことが明らかになった。一方、*0*-フコシル化も含めて、すべてのフコシル化が起こらないと考えられる *gmd* 遺伝子突然変異体（以下の（3）参照）では、Notch の初期エンドソームへの輸送は正常であった。これらの結果は、*0-fut1* は、その *0*-フコース転移酵素の活性に依存せず、細胞膜から初期エンドソームまでの Notch の輸送に機能していることを示唆している。これらの結果と、これまでの知見を総合すると、*0-fut1* は、Notch の細胞外ドメインに結合し、その酵素活性非依存的に、Notch のエンドサイトーシスによる輸送に必要であると考えられた。

（2）上皮細胞における Notch の *0*-フコシル化は、Notch が subapical complex と adherens junction に局在化するのに必要である

ショウジョウバエの上皮細胞の Notch が、頂端部付近に局在していることは、すでに知られていた。しかし、Notch の頂端部への局在化機能や、その機能的な意義については、まったく研究されていない。我々は、ショウジョウバエ上皮細胞において、Notch が、adherens junctions (AJ) と subapical complex (SAC) に局在化していることを明らかにした（以下、SAC/AJ とする）。Notch のリガンドである Delta と Serrate も、SAC/AJ に局在した。興味深いことに、Notch の SAC/AJ 局在化は、Notch の *0*-フコシル化には依存しておこった。しかし、Delta と Serrate の SAC/AJ 局在化は、*0-fut1* に依

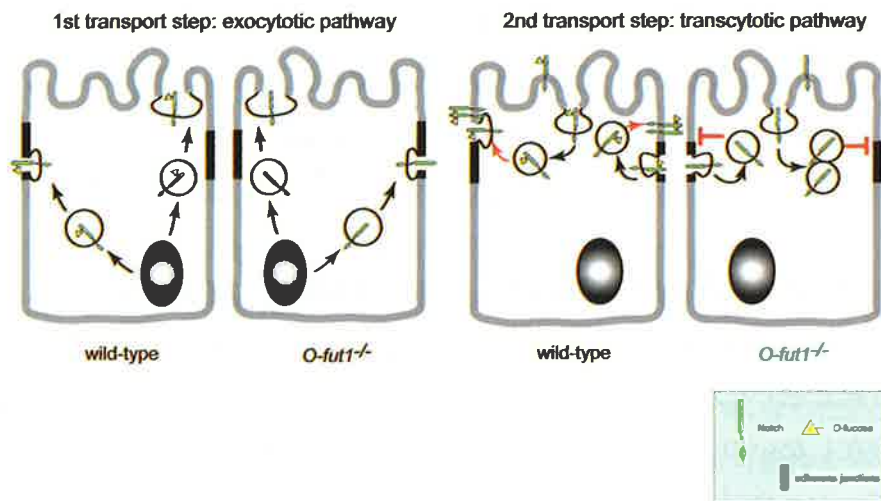


図1 Notch の SAC/AJ への輸送は、エキソサイトーシスとトランスサイトーシスの二段階のステップをへて起こる。第一ステップは、*O-fut1* 非依存的、第二ステップは、*O-fut1* 依存的である。

存していなかった。

Notch が AJ/SC に輸送される経路を解析した。ショウジョウバエ翅成虫原基で新しく合成された Notch は、まず、エキソサイトーシスによって、AJ や、頂端面の細胞膜に特異的に輸送された。この過程は、Notch が新規に合成された後、30 分間持続した。しかし、ほとんどの Notch が局在化する SAC には、新生 Notch がほとんど輸送されないことから、エキソサイトーシスによる輸送では、Notch の SAC への局在化は説明できないと考えられた。また、*O-fut1* は、Notch の SAC/AJ 局在化に必須であるにもかかわらず、新生 Notch のエキソサイトーシスには影響しなかった。そこで、新生 Notch の SAC/AJ 局在化には、*O-FUT1* に依存しない、第二のステップが必要であると予測した。これらの結果に加えて、新しく合生された Notch は、45 分後において、*O-fut1* 突然変異細胞では、SAC/AJ に小胞輸送されないのに対して、野生型細胞では、効率的に輸送された。この時間的ずれから、第二のステップには、トランスサイトーシスが関与しているのではないかと考えた。そこで、温度感受性のダイナミン突然変異体を用いて、ダイナミンの機能を抑制すると、Notch の SAC/AJ への局在化が起こらなくなった。これらの結果から、ダイナミン依存的なトランスサイトーシスによって、細胞膜上の Notch が AJ/SC に再輸送されて、安定に局在化するようになると考えられた。この過程には、Notch の *O*-フコシル化に依存して起こる (図1)。

ショウジョウバエ E-カドヘリン (DE-カドヘリン) を、翅成虫原基の上皮でノックダウンすると、SAC が正常に形成されず、Notch とそのリガンドの局在が異常になる。こ

のとき、Notch 情報伝達の低下が観察された。しかし、細胞膜貫通型の受容体とリガンドによるもう一つの細胞情報伝達系である、Fat 情報伝達系は正常であった。これらの結果から、Notch やそのリガンドの SAC/AJ への局在化は、上皮細胞における Notch 情報伝達に必須であると考えられた。これらの成果については、現在、論文投稿中である。

(3) GDP-マンノース脱水酵素遺伝子は、Notch 情報伝達に必要である

哺乳類における GDP-フコースの合成は、*de novo* 合成経路と、サルベージ経路の二つを介して起こる。しかし、ショウジョウバエでは、サルベージ経路で機能する酵素の遺伝子が存在しないので、GDP-フコースは、*de novo* 合成経路のみによって供給される。したがって、ショウジョウバエの *de novo* 合成経路で機能する遺伝子の突然変異体について解析すれば、フコシル化がまったく起こらない場合の発生過程への影響を調べることができる。*de novo* 合成は、細胞質に存在する Gmd (GDP-マンノース脱水酵) を介して起こる。我々は、これまでの研究で、*gmd* 遺伝子突然変異体の作出に成功している。また、*gmd* 突然変異体では、GDP-フコースの含有量が検出限界以下であること(阪大医・谷口)や、Notch 情報伝達系が機能しないことを明らかにしている。興味深いことに、*gmd* は、細胞非自立的に機能することが明らかになった。今回、ハネ成虫原基のごく一部の細胞で発現した *gmd* が、*gmd* の致死性や、ハネ成虫原基全体の Notch 情報伝達の欠如を救済することを明らかにした。この結果は、GDP-フコースが、細胞-細胞間で移動することを示唆している。現在、GDP-フコースの移動機構に関する研究を進めている。

(4) GDP-フコース輸送体は、Notch 情報伝達に必要である

*O-fut1*による Notch の *O*-フコシル化には、フコースのドナーとして GDP-フコースが必要である。GDP-フコースは、細胞質で合成された後、ゴルジ体や小胞体の内腔に輸送され、*N*-グリカンのフコシル化と、*O*-フコシル化に利用される。我々は、*O*-フコシル化の過程で特異的に機能する GDP-フコース輸送体が存在すると予測し、その同定を試みた。ヒトですでに同定されていた *O*-フコース輸送体のショウジョウバエ相同遺伝子 *Gfr* (Golgi GDP-フコース輸送体) を同定した (図 2)。

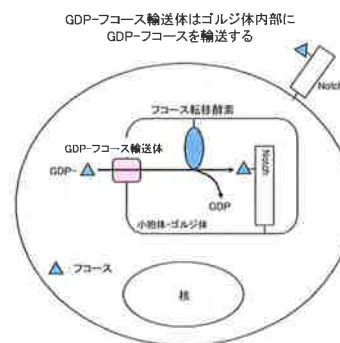


図 2 GDP-フコース輸送体 (*Gfr*) は、GDP-フコースをゴルジ体内腔へ輸送する。*Gfr* 突然変異体では、Notch の *O*-フコシル化が部分的に低下する。

Gfr は、Notch や、バルク・タンパク質の *N*-グリカンのフコシル化に必要であった。さらに、*Gfr* 突然変異体では、Notch の *O*-フコシル化も、部分的に低下していると考えられた。しかし、*O*-フコシル化が完全に消失していないことから、ショウジョウバエ・ゲノムには、少なくとももう一つの GDP-フコース輸送体遺伝子が存在すると考えられた (図 2)。*Gfr* は、ヒト免疫不全症 CDGIIc (先天性グリコシル化異常症 IIc) の責任遺伝子である。そこで、哺乳類培養細胞において、ヒト *Gfr* 相同遺伝子 (*HsGfr*) をノックダウンし、Notch 情報伝達系に対する影響を調べた。その結果、*HsGfr* は、リガンド依存的な哺乳類 Notch1 の活性化に必要であることが明らかになった。これらの結果は、CDGIIc の病態の一部が、Notch 情報伝達の低下に起因する可能性を示している。

(5) Notch の *O*-フコシル化やその機能発現に必要な新規遺伝子の同定

我々は、Notch の *O*-フコシル化経路で機能する新規な遺伝子の同定を目的として、遺伝的スクリーンを行った。ショウジョウバエの翅成虫原基で、RNA 干渉法を用いて *O-fut1* のノックダウンを行うと、Notch が機能しない場合と同様の表現型が得られる。このとき、RNA 干渉法と同時に、任意の遺伝子を強制発現させ、RNA 干渉法による表現型を抑制・増悪する遺伝子を検索した。任意遺伝子の強制発現は、Gene Search 系統 (首都大・相垣) を用いて行った。当初の目的どおり、約 11,000 系統のスクリーンを完了した。その結果、*O-fut1* に対して促進的に機能している可能性がある 12 遺伝子と、抑制的に機能している可能性がある 1 遺伝子を同定した。このうち、2 つの遺伝子については 2 回、1 つの遺伝子については 3 回、スクリーニングの過程で独立に繰り返し同定された。これらの遺伝子は、Notch の *O*-フコシル化の過程や、*O*-フコシル化に依存する Notch の機能の発現に機能している可能性がある。現在、得られた遺伝子の機能に関する研究を進めている。

3. 考 察

本研究の成果から、*O-fut1* が、Notch 情報伝達系において、予想外に多様な機能をはたしていることが明らかになり始めた。特に、*O-fut1* が、酵素活性に依存しない機能を持っていることは、新規は概念の創出につながる発見であった。*O-fut1* の酵素活性非依存的な機能は、他のグループによっても、独立に報告されている (Science, 2005)。しかし、このグループの報告した *O-fut1* の酵素活性非依存的な機能は、Notch に対する特異的なシャペロン活性である。一方、我々の結果は、*O-fut1* の酵素活性非依存的な機能は、Notch のエンドサイトーシスに必要であることを示している。今後は、*O-fut1*

が、これら二つの酵素活性非依存的な機能を同時に有しているかどうかを検証する必要がある。

また、Notch の O-フコシル化に関しても、二つ以上の独立した機能があることを明らかにできた。特に、上皮細胞にける Notch の頂端部への局在化に必須な因子として同定されたのは、Notch の O-結合型フコースが最初である。しかし、Notch が上皮細胞の頂端部に局在化する過程で起こるトランスサイトosisが、Notch の O-フコシル化に依存して起こる機構については、まったく不明である。

Notch の O-フコシル化に関与する新規遺伝子の同定に関しては、一次スクリーニングが終了し、その候補を得ることができた時点で、研究期間が終了した。しかし、これらの遺伝子が、Notch の O-フコシル化で実際に機能しているかどうかについては、現時点では不明である。今後、これらの遺伝子の機能を明らかにしていく必要がある。

文 献

Ishikawa, H. O., Higashi, S., Ayukawa, T., Sasamura, T., Aoki, K., Ishida N., Sanai, Y. and Matsuno, K. A *Drosophila* model of congenital disorder of glycosylation IIc implicates the deficiency of Notch signaling in its pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* in press (2005).

Hori, K., Fostier, M., Ito, M., Fuwa, J. T., Go, M., Okano, H., Martin Baron, M. and Matsuno, K. *Drosophila* Deltex mediates Suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling. *Development* 131, 5527-5537 (2004).

Sasamura, T., Sasaki, N., Miyashita, F., Nakao, S., Ishikawa, H. O., Ito, M., Kitagawa, M., Harigaya, K., Spana, E., Bilder, D., Perrimon, N. and Matsuno, K. *neurotic*, a novel maternal neurogenic gene, encodes an O-fucosyltransferase that is essential for Notch-Delta interactions. *Development* 130, 4785-4795 (2003).