

研究課題別評価

1 研究課題名: フコース修飾による Notch 情報伝達の制御機構

2 研究者氏名: 松野 健治

研究員: 笹村 剛司 (研究期間 H.14.10~H.18.3)

3 研究のねらい:

最近になって、細胞シグナル分子の機能における糖鎖修飾の重要性が明らかにされ始めた。しかし、糖鎖修飾が細胞シグナルに影響を与える機構については、多くの場合、あまり理解されていない。細胞シグナルで機能する受容体やリガンドが、多彩な糖鎖修飾を受けていることを考えると、糖鎖修飾が、これらタンパク質の機能発現における多様な段階で必要とされることが予測できる。我々の研究は、発生プロセスで重要な機能をはたす Notch 受容体(Notch)の *O*-フコシル化に注目し、Notch を介する情報伝達系(Notch 情報伝達系)におけるその多面的機能を明らかにすることを目的としている。我々の研究から得られる知見は、特定の糖付加による細胞機能への多様な影響を理解していくうえでのパラダイムになると考えている。

4 研究成果:

a) 研究の背景

Notch は、一回膜貫通型の受容体であり、ショウジョウバエからヒトにいたるまで、細胞間の直接的接触を介する細胞間情報伝達で機能している。Notch 情報伝達系による局所的な細胞間相互作用によって、細胞運命の決定やパターン形成などの多様な生命現象が制御されていることが示されている。また、Notch 情報伝達系の異常と、細胞のガン化や遺伝病との関連が明らかになっている。最近、Notch 情報伝達系構成因子のうちいくつかは、アルツハイマー病の発症の鍵をにぎる因子と共通であることが明らかになり、医学的応用研究への展開が期待されている。我々は、ショウジョウバエ Notch 情報伝達系に必須な遺伝子として、*neurotic* を同定した。*neurotic* 遺伝子座をゲノム上で同定したところ、Notch の細胞外ドメインに存在する EGF-様リピートに、*O*-結合でフコースを付加する、*O*-フコース転移酵素

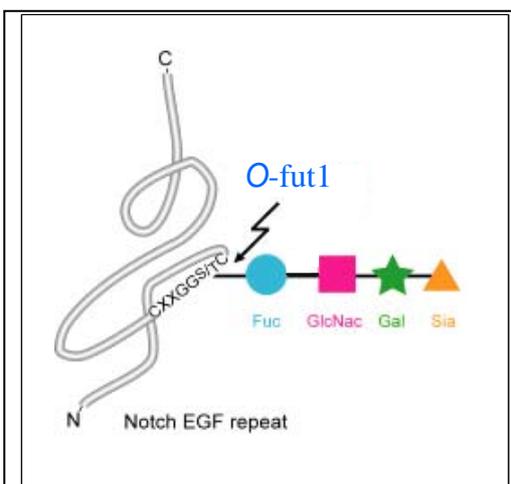


図1 Notch の細胞外ドメインに存在する EGF-リピートのうち、CXXGGS/TC のコンセンサス配列を持つものは、*O*-fut1 によって

(O-FUT1)をコードしていることがわかった。Notch の細胞外ドメインの EGF-様リピートのいくつかには、O-結合で四糖体(Sia- \cdot 2,3-Gal- \cdot 1,4-GlcNAc- \cdot 1,3-Fuc)が付加されている。すなわち、O-FUT1 は、この四糖体の最初の O-フコースを付加する酵素である。以下では、この遺伝子を、*O-fut1* と呼ぶ。我々を含むいくつかのグループは、*O-fut1* が、Notch 情報伝達に普遍的に必要な遺伝子であることを明らかにした。さらに、*O-fut1* の機能は、Notch 情報伝達系に特異的であると考えられた。我々を含む複数のグループが、O-FUT1 による Notch の O-フコシル化が、Notch と Delta リガンドの結合に必須であることを示した。

b) 研究の目的

本研究では、(i)Notch の O-フコシル化の機能的意義、(ii)Notch の O-フコシル化の経路とその Notch 情報伝達における機能、を理解することを目的とした。哺乳類を用いたこれまでの研究から、O-フコシル化に必要ないくつかのプロセスが明らかにされている。これらの各プロセスの、Notch 情報伝達系における機能を明らかにしたいと考えた。O-フコシル化には、フコース転移反応の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、フコース転移酵素が小胞体やゴルジ体の内腔に、GDP-フコース輸送体を介して搬入される。そこで、本研究では、Notch の O-フコシル化におけるこれらの過程の機能を調べるために、GDP-フコースの合成に必要な酵素の遺伝子、GDP-フコースをゴルジ体内腔に輸送する遺伝子の突然変異体を作成した。さらに、一歩進んで、Notch の O-フコシル化で機能する新規な遺伝子の同定を試みた。具体的には、ショウジョウバエを用いた遺伝的スクリーニングによって、*O-fut1* と機能的相互作用を示す遺伝子を網羅的に検索した。

c) 研究の成果

(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 *O-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、*O-fut1* 突然変異細胞では、Notch が、クオ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、*O-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、*O-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、*O-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、*O-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、*O-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。

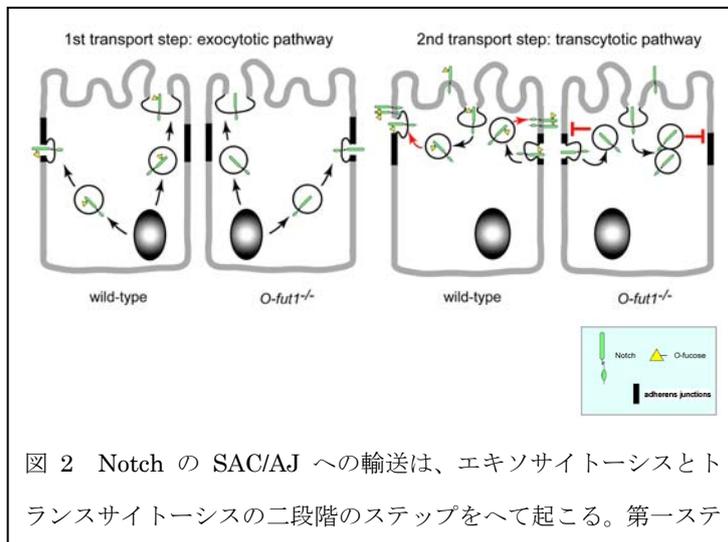
これらの結果と、これまでの知見を総合すると、O-FUT1 は、Notch の細胞外ドメインに結合し、その酵素活性非依存的に、Notch のエンドサイトーシスによる輸送を制御していると考えられた。*O-fut1* 突然変異細胞において、Notch は、初期のエンドサイトーシス小胞に蓄積している可能性が高い。これらの成果については、現在、論文投稿準備中である。

(2) 上皮細胞における Notch の *O*-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 *O*-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、*O-fut1* に依存していなかった。

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。

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。

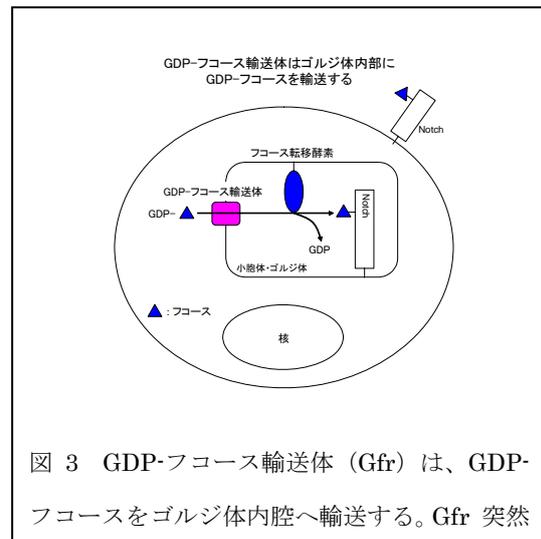
哺乳類における GDP-フコースの合成は、*de novo* 合成経路と、サルベージ経路の二つを介して起こる。しかし、ショウジョウバエでは、サルベージ経路で機能する酵素の遺伝子が存在しないので、GDP-フコースは、*de novo* 合成経路のみによって供給される。したがって、ショウジョウバエの *de novo* 合成経路で機能する遺伝子の突然変異体について解析すれば、フコシル化がまったく起こらない場合の発生過程への影響を調べることができる。*de novo* 合成は、細胞質に存在する Gmd (GDP-マンノース脱水酵) を介して起こる。我々は、これまでの研究で、*gmd* 遺伝子突然変異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。*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。*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・増悪する遺伝子を探索した。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。

5 自己評価:

本研究計画のうち、*O*-フコシル化に関与することが予測されていた遺伝子の、Notch 情報伝達系における機能の解明については、十分な進展があった。これらのうち、*gmd* と *Gfr* については、ショウジョウバエ突然変異体を作成することに成功し、その機能を明らかにできた。*gfr* の突然変異体の解析から、ヒト遺伝病である CDGIIc 患者における発生異常や精神遅延の原因が、Notch 情報伝達の低下である可能性を示唆できた。しかし、もう一つの目標であった、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。

本研究で最も残念であった点は、二度にわたって、米国のグループに、研究成果の論文発表で先行されてしまったことである。我々の結果が、米国のグループの発表と一致していないにもかかわらず、研究成果を同時に発表することができなかった。この経験を、今後の研究のかたみにしていきたい。

6 研究総括の見解:

蛋白質の糖質化の重要性がポストゲノム解読期に入った現在、注目を浴びつつある。本研究者はこの分野において、細胞シグナル伝達、発生・分化に重点的な役割を演ずるシグナル伝達受容体蛋白質の機能に、糖鎖化が必須で極めて重要な役割を果たしているという予期しない新知見をショウジョウバエを使って見出した。このブレークスルー的発見によって国際舞台におどりと出たといつてよい。米国では競争者が居り、現在互いに激しくせりあっている。発生・再生、癌、免疫、脳等において、糖鎖の重要性が以前から示唆され、その役割の解明が期待されている現在、糖鎖関連遺伝子クローンの60%を有する我が国において、当該研究者に期待するところは大きい。

7 主な論文等:

論文

1. 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).
2. Fuwa, T. J., Hori, K., Sasamura, T., Higgs, J., Baron, M., and Matsuno K. The first *deltex* null mutant indicates tissue-specific *deltex*-dependent Notch signaling in *Drosophila*. *Mol. Genet. and Genom.* in press (2005).
3. Hori, K., Fuwa, J. T., Seki, T. and Matsuno, K. Genetic regions interacting with loss- and gain-of-function phenotypes of *deltex* implicate novel genes involved in *Drosophila* Notch signaling. *Mol. Genet. and Genom.* 272, 627-638 (2005).
4. 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).
5. 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).

招待講演

1. The 12th CDB meeting, “Diversity of developmental mechanisms in invertebrates”
平成 17 年 2 月 2 日(神戸)