

## 論文の内容の要旨

論文題目     Delayed trans-endocytosis and signal-less downregulation of Notch2 by intracellular domain-deleted Delta1: relevance to the dominant-negative effect on Notch signaling

和訳           細胞内領域欠失型 Delta 1 により、Notch2 は trans-endocytosis が遅延し、シグナル伝達することなく減少する：Notch シグナルへの dominant-negative 効果との関連

指導教官     平井 久丸 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名  山口  智之

Notch は広範囲の発生段階において、様々な役割を担っている。造血の過程でも重要な役割を担っており、造血幹細胞を維持・増殖し、B 細胞か T 細胞になるかの運命決定づきに関わる。また、発癌にも関わっており、Notch signal の異常が T-ALL で認められる。

Notch は未熟型の大きな蛋白として作られ、切断され細胞外領域と膜貫通・細胞内領域からなるヘテロ二量体となる。リガンドと結合すると、Notch は一連の切断を受け、切断された細胞内領域が核内へ移行して DNA 結合蛋白 RBP-J と共に転写活性を上げる。

哺乳類では Notch リガンドは Delta1,3, 4 と Jagged1,2 がある。これらの蛋白は一回

膜貫通型で短い細胞内領域を持つ。細胞外領域には保存された Delta/Serrate/Lag-2(DSL) 領域や複数の EGF 様繰り返し配列を持つが、細胞内領域に関しては特徴的な配列はない。

細胞内領域を欠失した Delta がハエでは存在することが知られている。細胞内領域を欠失した Notch リガンドは Notch シグナルに対して dominant-negative に作用する。このことは実験材料として使われているにも関わらず、そのメカニズムは不明である。

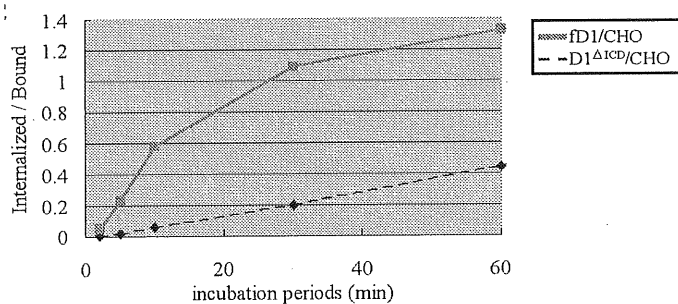
最近、Notch リガンドが Notch の細胞外領域を伴って endocytosis すること(Notch の細胞外領域の trans-endocytosis)が Notch シグナルを伝える上で重要であることが示された。Dynamin や Neuralized といった分子がこの現象に関わっていることが示されたが、そのメカニズムについては不明な点も多い。

## 結果

細胞内領域を欠失した Delta1(D1<sup>ΔICD</sup>)は完全長の Delta1(fD1)と比較して、Notch シグナルを伝える活性が非常に弱い。どの過程で障害を受けているのか不明である。まず、Notch2 (N2)との結合能を、Fc をつけた可溶化型の N2 (sN2-Fc)を用いて比較した。D1<sup>ΔICD</sup> 発現 CHO では fD1 発現 CHO に比べて、細胞表面上の D1 の量は 3.4 倍程度多く、N2 との親和性はほぼ同程度である事がわかった。

次に Notch 細胞外領域の trans-endocytosis がシグナル伝達に必須との報告がある事から、この過程に差がないかを調べた。sN2-Fc に PE 標識抗 Fc-Fab 断片を混合して、D1 発現 CHO 細胞に加え、培養後トリプシンと EDTA 処理により細胞表面に残存する sN2-Fc を除き、FACS による解析を行う事で、細胞内に取り込まれた sN2-Fc 量を PE 蛍光強度により知ることができる。これは N2 細胞外領域の trans-endocytosis を反映していると考えられる。

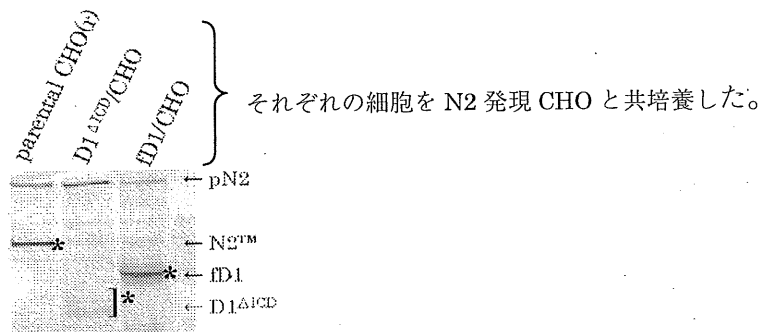
fD1 発現 CHO 細胞と D1<sup>ΔICD</sup> 発現 CHO 細胞で sN2-Fc の取り込みを比較した。時間経過を追うと fD1 発現 CHO 細胞と比較して、D1<sup>ΔICD</sup> 発現 CHO 細胞では取り込みの効率が悪かった。



D1 細胞内領域のうちの責任領域を更に限定することを試みた。D1 細胞内領域の一部を欠失した様々な変異体を作成し、これを発現する CHO 細胞を作った。RBP-J 反応性のレポーターによって N2 発現 CHO 細胞での転写活性を見る系で、これらの変異型 D1 発現 CHO 細胞を刺激細胞とした場合の N2 シグナル伝達の活性を調べた。結果は単一の一次構

造にシグナル伝達のために十分な領域を限定することは出来ず、細胞内領域の高次構造が重要な意義を持つことが示唆された。一方で、これらの変異型 D1 発現 CHO 細胞を用いて、sN2-Fc の取り込みを調べたところ、その効率とシグナル伝達との間に相関があることが確かめられた。

以前の研究で、D1<sup>ΔICD</sup> は膜貫通型 Notch2(N2<sup>TM</sup>)を切断することは出来るが、fD1 の場合と違って、数時間後の Notch2 細胞内領域(N2<sup>ICD</sup>)の核内蓄積が見られないことが示されている。N2 発現 CHO 細胞を fD1 発現 CHO 細胞や D1<sup>ΔICD</sup> 発現 CHO 細胞と共培養し、Western blotting 法による解析を行なった。結果、未成熟型の N2(pN2)の発現量には変化がないが、成熟型である N2<sup>TM</sup>の量は fD1 発現 CHO 細胞と共培養した場合に減少していた。D1<sup>ΔICD</sup> 発現 CHO 細胞と共培養した場合にも、fD1 と共培養した場合も同様に N2<sup>TM</sup>の量は減少していた。



この N2<sup>TM</sup>の減少は N2 と D1<sup>ΔICD</sup>が同一細胞上で発現した場合にも観察できた。

N2<sup>TM</sup>の減少によって、Notch シグナル伝達が抑制されるのではないかと考えた。そこで、N2 と D1<sup>ΔICD</sup>を共発現した CHO 細胞を反応細胞として、転写活性のレポーター解析を行なった。D1<sup>ΔICD</sup>を共発現した CHO 細胞では転写活性の低下を認めた。さらに、N2 発現 CHO 細胞と D1<sup>ΔICD</sup> 発現 CHO 細胞と fD1 発現 CHO 細胞を共培養した場合の転写活性を調べたところ、D1<sup>ΔICD</sup>が量依存性に抑制効果を示した。

以上から、D1<sup>ΔICD</sup>がシグナルを入れることなく、N2<sup>TM</sup>を減少させることが示され、このことが D1<sup>ΔICD</sup>の dominant-negative 効果と関連している可能性が示唆された。

この考えが正しければ、D1<sup>ΔICD</sup>は fD1 以外の Notch リガンドに対しても Notch シグナルを抑制する効果を示すはずである。そこで、完全長の Delta4 を発現した CHO 細胞をつくり、更に D1<sup>ΔICD</sup>を共発現した細胞を作った。N2 発現 CHO 細胞における RBP-J 反応性の転写活性を見るレポーター解析で、Notch シグナル伝達の活性を調べたところ、D1<sup>ΔICD</sup>の共発現により、Delta4 の活性は抑制された。別のグループに属する Notch リガンドである、Jagged1 と Jagged2 に対する抑制効果も調べたが、D1<sup>ΔICD</sup>の共発現により Notch シグナル伝達活性は抑制された。また、Jagged1 の細胞表面上の発現量は D1<sup>ΔICD</sup>の共発現によって低下はしていない事が FACS 解析により確かめられた。このことは、D1<sup>ΔICD</sup>がシグナルを

入れることなく、N2<sup>TM</sup>を減少させることが、D1<sup>ΔICD</sup>の dominant-negative 効果を説明するとの仮説に合致する。

#### 考察

今回、sN2-Fcの内在化を定量することで、N2細胞外領域のD1による trans-endocytosisにはD1の細胞内領域が関わっていることを示した。

fD1とD1<sup>ΔICD</sup>の差を定量的に比較するため、sN2-Fcの内在化を測定した。完全長のN2でも、細胞外での切断がリガンド作用後15分で起こる時間経過から、sN2-Fcと同様の trans-endocytosis が起こると考えている。

D1<sup>ΔICD</sup>はfD1と比べて、Western blotting法ではバンドが薄いにも関わらず、細胞表面上の量は多い。この事はNotchとの相互作用の有無に関わらず、細胞内の蛋白移送にD1の細胞内領域が関わっている事を示唆する。この細胞内での分布の差がNotchシグナル伝達活性の有無を決めている可能性も否定はできない。ただし、D1<sup>ΔICD</sup>もNotchと結合できる事から、その後の過程でシグナル伝達に必要なものがあるはずで、それが trans-endocytosis ではないかと推察した。

可溶化型のD1も固相化や多量体化すれば、Notchシグナル伝達活性を持つ事が知られている。しかし、その活性はfD1/CHOを介したものより弱い傾向がある。生理的なfD1は、多量体化し、Notch細胞外領域を切断し、それを trans-endocytosis する事が一連の過程として起こっており、この過程がNotchシグナルを入れるために必要であろうと推察している。そして、この過程にD1の細胞内領域が必要であることを示した。

Trans-endocytosisの遷延化とN2シグナル伝達活性には相関があることは、D1の細胞内領域の様々な欠失変異体を用いた実験でも確かめられた。細胞内領域の高次構造が大事ではないかと推察された。

D1<sup>ΔICD</sup>はNotchシグナルに関して、dominant negative作用をもつことが報告されていて、実験上の手段としても使用されている。D1<sup>ΔICD</sup>では、fD1と異なりN2シグナルを伝達できないにも関わらず、成熟型のN2が、おそらく壊されて、減少する。D1<sup>ΔICD</sup>のこの性質と細胞表面上のD1<sup>ΔICD</sup>が多い事で、dominant-negative効果を持つ事の機序を説明することができる。

今回の研究では、D1<sup>ΔICD</sup>はfD1に比較してNotch2の細胞外領域(N2<sup>ECD</sup>)の trans-endocytosis が遅れることを見出した。更に、D1<sup>ΔICD</sup>はN2蛋白に対して、Notchシグナルを伝えることなく減少させることを示した。この事がD1<sup>ΔICD</sup>の dominant negative作用機序を説明するものと考えられる。