

審査の結果の要旨

氏名 一色隼人

γ -Secretase は、presenilin (Psn) を活性中心サブユニットとし、Nicastrin、Aph-1、Pen-2 の 4 者からなる膜タンパク質複合体を分子の実体とする、膜内配列切断アスパラギン酸プロテアーゼである。 γ -secretase による切断の結果、基質の一つである APP (amyloid precursor protein) からは $A\beta$ が産生・分泌される。脳における $A\beta$ 蓄積はアルツハイマー病 (AD) の主な発症原因とされており、 γ -secretase は重要な創薬標的分子と考えられる。一方、他の基質である Notch からは、 γ -secretase による切断の結果、細胞質内領域 (NICD) が産生・放出され、発生・分化に必須とされる Notch シグナルを伝達する。そのため AD の治療にあたって γ -secretase を単純に阻害するだけでは、Notch シグナルの異常による副作用が懸念されている。そこで Notch シグナルを保ったまま、 $A\beta$ 産生を抑制する『基質特異的』な γ -secretase 活性の制御が求められている。申請者は、ショウジョウバエ細胞系を用いて γ -secretase による Notch 切断を特異的に制御する分子として Surf4 を同定し、Surf4 が Notch 特異的な細胞内小胞輸送に関わる詳細な分子機構を検討した。

1. Surf4 は ER-Golgi 間に局在し ER-Golgi 間輸送において Notch のカーゴ受容体として機能する

Surf4 の酵母オルソログである Erv29p は、ER-Golgi 間輸送において COP II 輸送ベジクルに取り込まれる可溶性タンパク質の選別を行う受容体であると報告されている。そこで Surf4 に特異的なポリクローナル抗体を作製し、その細胞内局在を、免疫細胞化学により検討した。その結果、ショウジョウバエ S2 細胞において、Surf4 は ER から cis-Golgi にかけて局在し、特に COP II ベジクルマーカーと局在が一致することが確認された。そこで、Surf4 RNAi 時における APP、Notch の細胞内局在について、細胞表面膜ビオチン化および免疫染色により検討したところ、APP は Surf4 RNAi に関わらず細胞表面まで達しているのに対し、Notch は細胞表面への輸送が止まり、細胞表面分子種の著減と ER への蓄積が確認された。一方、 γ -secretase の局在に大きな影響は見られなかった。これらの結果から、Surf4 が Notch の細胞内小胞輸送に選択的に関与しており、その結果 Notch の切断が特異的に制御を受けている可能性が示唆された。そこで各分子と Surf4 との結合について検討を行ったところ、Surf4 は Notch とは結合しているが、APP や γ -secretase とは結合していないことが明らかとなった。以上の結果より、ER から Golgi 間における輸送過程において、Surf4 が Notch

のカーゴ受容体として COP II 輸送ベジクルへの選択的取り込みを行い、Notch の細胞表面への輸送を規定し、最終的に Notch 切断を制御しているということが示された。

2. Surf4 は Notch の細胞質ドメインを認識することにより、その細胞内輸送を制御する

これまでにいくつかの可溶性タンパク質が Surf4 の基質（カーゴ）として知られている。その認識様式としては、Surf4 のループ領域が結合部位として機能していることが示唆されている。一方、Notch は初めて Surf4 のカーゴとして見出された膜貫通タンパク質であり、その結合様式に関しては明らかではない。そこで Surf4 が Notch のどのドメインを認識しているかについて、各種コンストラクトを作成し検討を行った。まず APP と Notch の膜貫通ドメイン (TMD) をスワップさせたコンストラクトを用い、細胞表面膜への輸送をビオチン化実験により検討した結果、TMD の有無に関わらず Notch は Surf4 により制御を受けることが明らかとなり、TMD は Surf4 による認識部位ではないことが明らかとなった。一方、Notch の細胞質ドメインを欠損させたコンストラクトを作製し、同様の検討を行ったところ、Surf4 による輸送制御を受けなくなった。以上の結果より、Surf4 はアンキリン (ANK) リピートを含む Notch 細胞質ドメインを認識し、その選択的細胞内輸送に関与していることが分かった。

3. Surf4 はショウジョウバエ内因性 Notch の輸送を制御することにより、そのシグナルを制御する

内因性に Notch を発現しているショウジョウバエ Kc167 細胞を用いて、Surf4 の機能について解析を行った。Surf4 RNAi により、やはり Notch シグナルの有意な低下が観察され、細胞表面膜上の Notch タンパク質の消失が確認された。さらに内因性 Notch と Surf4 タンパク質の相互作用も確認されたことから、Surf4 がショウジョウバエ内因性 Notch の輸送も制御していることが分かった。

4. 哺乳類 Surf4 も Notch シグナルを特異的に制御する

Surf4 は哺乳類においても保存されており、ERGIC53 などと協調して ER-Golgi 間輸送に関与していることが示唆されている。そこで、哺乳類 Surf4 オルソログである SURF4 の機能を解析するために、マウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞

において内因性 SURF4 を RNAi により発現抑制したところ、S2 細胞と同様に、A β 産生に影響を与えずに Notch 切断のみが特異的に低下することが分かった。すなわち、Surf4 の機能はショウジョウバエのみではなく、哺乳類においても保存されていることが明らかとなった。

Notch シグナルの活性化は細胞表面膜上でのリガンドの結合により開始される。しかしその細胞表面膜までの輸送経路に関わる分子機構についてはほとんど明らかになっていない。ER から Golgi への順行輸送過程においては、ER から COP II 輸送ベジクルが出芽する部位である ER Exit Site (ERES) と、その後 COP II 輸送ベジクルを仕分けする ERGIC (ER Golgi Intermediate Compartment) というオルガネラがタンパク質の選択的輸送に重要な役割を果たしていることが知られている。本研究は、Surf4 がこの ER-Golgi 間輸送において Notch のカargo受容体として機能し、選択的に Notch の細胞内輸送を制御することを示すものであり、発生生物学、細胞生物学に新知見を与えた。よって本研究は博士(薬学)の学位に値するものと考えられる。