

氏名	み 三 かみ 上 ただ 雅 ひさ 久
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 678 号
学位授与の日付	平 成 14 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	糖転移酵素と構造類似性を示すシグナル分子, Fringe, の発現とその作用機構に関する研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 伊 藤 信 行 教 授 市 川 厚 教 授 藤 井 信 孝

論 文 内 容 の 要 旨

Fringe はショウジョウバエの翅の形態形成に関与する細胞間シグナル分子として同定された。脊椎動物においても、アフリカツメガエルやニワトリで Radical fringe (R-fng), Lunatic fringe (L-fng) と命名された 2 種類のホモログが単離された。Fringe は遺伝学的解析から, Notch シグナル伝達経路を制御する新しい調節因子として重要な役割を果たしていることが明らかにされている。また, Fringe は N 末端にシグナル配列を有し, そのコア領域は糖転移酵素と構造上の類似性を示す。最近, Fringe がゴルジに局在し, Notch の O-結合型糖鎖修飾に関与することが示された。しかし, Fringe は主に分泌タンパクとして細胞外で機能する可能性も指摘されている。

申請者は哺乳動物における Fringe の活性発現の作用メカニズムの解明を目的として, ラットより R-fng, L-fng 遺伝子を単離し, 組換え Fringe タンパクを作製した。その結果, これら 2 種の Fringe の生物活性を明らかにすると共に, Fringe は細胞間シグナル分子として Notch のシグナルを制御していることを明らかにした。以下, これらの新たな知見について二章にわたって論述する。

第一章 脳における Radical fringe の発現と作用機構

申請者はラットより R-fng, L-fng 遺伝子を単離し, 成体組織における発現を調べた。これらのうち, R-fng は脳で最も強く発現し, 脳の広範な領域のニューロンに発現し, グリア細胞には発現していなかった。さらに, 脳における R-fng の役割を明らかにするため, バキュロウイルス発現系により, 組換え R-fng タンパクを作製した。R-fng は細胞外には分泌されず, 細胞膜表面上に存在し, II 型膜タンパクとしての挙動を示した。Notch の活性化により大脳皮質ニューロンの神経突起伸長が抑制されていることが報告されている。さらに, R-fng のニューロンに対する作用を調べる目的で, ラットの脳皮質初代培養系を用いて, 精製した組換え R-fng タンパクを大脳皮質ニューロンに添加した。その結果, R-fng により Notch シグナルの下流転写因子である HES1 の発現が減少した。また, ニューロンの神経突起が有意に伸長していることが明らかとなった。従って, R-fng がニューロンの Notch シグナル伝達系に対し抑制的に作用し, 神経突起を伸長させることが明らかとなった。また, R-fng による Notch の O-結合型糖鎖修飾に関わる糖転移活性は非常に微弱であった。しかし, R-fng は Notch の細胞外ドメインの EGF リピートと強い結合親和性を示した。従って, R-fng は Notch の細胞外ドメインと結合し, Notch シグナルを制御しているものと考えられた。また, 申請者はデータベース検索により, O-結合型糖鎖の生合成開始を担うと予想される新規糖転移酵素をクローニングし, 本遺伝子が脳特異的な発現パターンを示すことを見出した。

第二章 Lunatic fringe の発現と Notch シグナル伝達系に対する作用

L-fng の生理的役割を明らかにするために, 発生段階における L-fng の発現組織を調べた。L-fng は胎児肺において内胚葉性の上皮組織に特異的に発現し, 肺胞形成に関与することが考えられた。一方, 歯の形成過程において, L-fng と Notch は上皮組織に発現していた。しかし, L-fng と Notch の発現領域は異なっていた。このことは, L-fng が Notch 発現細胞で共発現せず, ゴルジで Notch の糖鎖付加に関与しているのではないことを示唆した。また, L-fng はその構造か

ら分泌タンパクであることが示唆された。L-fng の細胞間シグナル分子としての役割を明らかにするために、L-fng の組換えタンパクを作製した。精製した L-fng をマウス胎児肺の *in vitro* 培養系に添加したところ、L-fng は肺芽の形成を促進した。また、歯芽上皮組織に L-fng をしみ込ませたビーズを作用させたところ、HES1 の発現がビーズ周囲で特異的に誘導された。L-fng は R-fng と同様に非常に弱い糖転移活性しか示さなかったが、Notch の細胞外ドメインの EGF リピートと強く相互作用することが明らかとなった。以上の結果から、L-fng は分泌タンパクとして細胞外から Notch シグナルを制御し、その機能を果たすことが強く示唆された。

以上、本研究は 2 種類のラット Fringe 遺伝子を単離し、その生物活性と作用メカニズムを明らかにしたもので、Notch シグナルとの関連性を細胞間調節因子としての観点から初めて明らかにしたものである。従って、本研究の成果は Notch シグナルを介する細胞の分化メカニズム解明に有益な知見を提供するものである。

論文審査の結果の要旨

Fringe はショウジョウバエの翅の形態形成に関与する細胞間シグナル分子として同定された。脊椎動物においても、アフリカツメガエルやニワトリで Radical fringe (R-fng), Lunatic fringe (L-fng) と命名された 2 種類のホモログが単離されている。Fringe は遺伝学的解析から、Notch シグナル伝達経路を制御する新しい調節因子として重要な役割を果たしていることが明らかにされている。

申請者は哺乳動物における Fringe の活性発現の作用メカニズムの解明を目的として、ラットより R-fng, L-fng 遺伝子を単離し、組換え Fringe タンパクを作製した。その結果、これら 2 種の Fringe の生物活性を明らかにすると共に、Fringe は細胞間シグナル分子として Notch のシグナルを制御していることを明らかにした。

申請者はラットより R-fng, L-fng 遺伝子を単離し、成体組織における発現を調べた。これらのうち、R-fng は脳で最も強く発現し、脳の広範な領域のニューロンに発現し、グリア細胞には発現していなかった。さらに、脳における R-fng の役割を明らかにするため、バキュロウイルス発現系により、組換え R-fng タンパクを作製した。R-fng は細胞外には分泌されず、II 型膜タンパクとしての挙動を示した。さらに、R-fng のニューロンに対する作用を調べる目的で、ラットの大脳皮質初代培養系を用いて、精製した組換え R-fng タンパクを大脳皮質ニューロンに添加した。その結果、R-fng により Notch シグナルの下流転写因子である HES1 の発現が減少した。またニューロンの神経突起が有意に伸長していることが明らかとなった。また、R-fng による Notch の O-結合型糖鎖修飾に関わる糖転移活性は非常に微弱で、R-fng は Notch の細胞外ドメインの EGF リピートと強い結合親和性を示した。従って、申請者は R-fng がニューロンの Notch シグナル伝達系に対し抑制的に作用し、神経突起を伸長させることが明らかになった。さらに、申請者は R-fng は Notch の細胞外ドメインと結合し、Notch シグナルを制御していることを明らかにした。

さらに、申請者は L-fng の生理的役割を明らかにするために、発生段階における L-fng の発現組織を調べた。歯の形成過程において、L-fng と Notch は上皮組織に発現していた。しかし、L-fng と Notch の発現領域は異なっていた。このことは、L-fng が Notch 発現細胞で共発現せず、ゴルジで Notch の糖鎖付加に関与しているのではないことを示唆した。また、L-fng はその構造から分泌タンパクであることが示唆された。L-fng の細胞間シグナル分子としての役割を明らかにするために、L-fng の組換えタンパクを作製した。歯芽上皮組織に L-fng をしみ込ませたビーズを作用させたところ、HES1 の発現がビーズ周囲で特異的に誘導された。一方、L-fng は R-fng と同様に非常に弱い糖転移活性しか示さなかったが、Notch の細胞外ドメインの EGF リピートと強く相互作用することが明らかとなった。従って、申請者は L-fng も分泌タンパクとして細胞外から Notch シグナルを制御し、その機能を果たすことを明らかにした。

以上、本研究は 2 種類のラット Fringe 遺伝子を単離し、その生物活性と作用メカニズムを明らかにしたもので、Notch シグナルを介する細胞の分化メカニズム解明に有用な知見を得たものである。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成14年8月28日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。