

財団法人 山田科学振興財団 2006 年度長期間派遣援助 研究成果報告

ショウジョウバエをモデル系とした癌細胞の悪性化に関わる

O-結合型糖鎖の機能解明

Role of *O*-glycosylation in cancer metastasis

東京理科大学 ゲノム創薬研究センター 構造ゲノム科学部門

石川 裕之

Genome and Drug Research Center, Tokyo University of Science

Hiroyuki O. ISHIKAWA

派遣期間：2006 年 4 月 1 日～2008 年 12 月 23 日

April 1, 2006 – December 23, 2008

研究機関：Howard Hughes Medical Institute, Waksman Institute, Rutgers, The State University of New Jersey, 190 Frelinghuysen Rd, Piscataway, NJ 08854-8020, USA

研究指導者：Dr. Kenneth D. Irvine

Summary

The atypical cadherin Fat acts as a receptor for a signaling pathway that regulates growth and planar cell polarity. Dachsous is also a transmembrane protein with multiple cadherin domains and is a Fat ligand. Genetic studies in *Drosophila* identified the *four-jointed* gene as a regulator of Fat signaling. However, Fj is a type II transmembrane protein that functions in the Golgi. This suggested that Fj might influence Fat signaling by posttranslationally modifying a component of the Fat pathway, as a glycosyltransferase, Fringe, does in Notch signaling. To investigate this possibility, I tried to characterize the biochemical activity of Fj, and showed that *four-jointed* encodes a protein kinase that phosphorylates serine or threonine residues within extracellular cadherin domains of Fat and Dachsous. Four-jointed functions in the Golgi and is the first molecularly defined kinase that phosphorylates protein domains destined to be extracellular. An acidic sequence motif (Asp-Asn-Glu) within Four-jointed was essential for its kinase activity *in vitro* and for its biological activity *in vivo*. Our results indicate that Four-jointed regulates Fat signaling by phosphorylating cadherin domains of Fat and Dachsous as they transit through the Golgi.

細胞表面の糖鎖修飾の変化は、癌細胞の悪性化と対応関係を示し、特定の糖鎖構造が腫瘍の進行度を示すマーカーになることが知られている。例えば、転移性の癌細胞においては、O-結合型糖鎖の1つであるムチン型糖鎖のコア1構造が増加している^{[1][2]}。一方で、近年の研究により、非定型カドヘリン Fat を受容体とした、組織の成長と細胞の極性を制御する新規のシグナル伝達経路 (Fat シグナル) の存在があきらかにされた^{[3][4][5]}。Fat シグナルの構成因子は、おもにショウジョウバエを用いた遺伝学的解析によりあきらかにされているが、その構成因子のほとんどはショウジョウバエと哺乳類において保存されている。Fat シグナル構成因子のショウジョウバエ突然変異体において組織の過剰増殖を示すものが存在することから、Fat シグナルはショウジョウバエ組織の成長に重要な役割をはたしていると考えられている。さらに、哺乳類を用いた研究により、Fat シグナルと癌の関連性が指摘されている^{[4][5]}。*four-jointed (fj)*は、*fat*の上流で機能し、Fat シグナルを調節することがショウジョウバエを用いた解析により示されていた^{[3][6][7]}。しかし、その調節の分子機構は不明であった。また、Fat とそのリガンドである非定型カドヘリン Dachsous (Ds) は、細胞膜を貫通する膜タンパク質であるのに対して、Fj はゴルジ体に局在する II 型の膜タンパク質である[8]。ところで、これまでに被派遣者の所属する研究グループでは、細胞膜貫通型の膜タンパク質 Notch を受

容体とするシグナル伝達経路 (Notch シグナル) を調節する遺伝子 *fringe* の分子機能をあきらかにしていた。Fringe はゴルジ体に局在する II 型の膜タンパク質であるが、被派遣者の所属する研究グループは、Fringe は糖転移酵素であり、Fringe がゴルジ体において Notch の細胞外ドメインに糖を付加することで Notch シグナルを調節することをあきらかにした^[9]。これらのことから被派遣者は、Fj はゴルジ体において、Fat と Ds のカドヘリンドメインに糖を付加することで Fat シグナルを調節する、Notch シグナルにおける Fringe のような糖転移酵素である、と予測し Fj の生化学的機能の解明を試みた^[10]。

ショウジョウバエ由来の培養細胞に、Fat あるいは Ds のカドヘリンドメインを Fj と共発現させると、いくつかの Fat と Ds のカドヘリンドメインのバンドは電気泳動上でシフトした^[10]。Fj において、酸性アミノ酸配列 Asp-Asn-Glu (DNE) がショウジョウバエからヒトにいたるまで保存されている。この配列は糖転移酵素の活性に必要であることが知られる Asp-Xaa-Asp (DXD) モチーフに類似している。この DNE 配列を Gly-Gly-Gly に置換した変異型 Fj (Fj^{GGG}) の共発現では、これらカドヘリンドメインのバンドはシフトしなかった^[10]。次に、このカドヘリンドメインのバンドのシフトを指標としてマッピングを試みたところ、各カドヘリンドメインの間のリンカー配列直後の特定の Ser 残基を Ala に置換すると、電気泳動上でのシフトが起こらなくなることが分かった。これらの結果から、Fj 共発現によるカドヘリンドメインのシフトの要因は、カドヘリンドメイン上の特定の Ser に付加される O-結合型糖鎖である可能性が考えられた。そこで、このカドヘリンドメインの翻訳後修飾の実体をあきらかにするために、レクチン染色、グリコシダーゼ処理、糖組成分析など種々の生化学的解析を試みたが、Fj 共発現によりカドヘリンドメインの糖鎖修飾が変化することを示す結果は得られなかった。そこで、この Fj 共発現によるカドヘリンドメインの翻訳後修飾の手がかりを得るために、シフトが顕著に見られた、Ds の 2 番目から 3 番目のカドヘリンドメインをトリプシン処理し、LC-MS/MS 分析をおこなった。その結果、予想外な事に、Fj を発現させた培養細胞から調製した Ds カドヘリンドメインにおいて、翻訳後修飾サイトであると予測された Ser 残基を含むペプチドに、80 Da の分子量増加が検出された^[10]。80 Da は、これまでに知られる糖鎖構造の分子量とは一致しないが、リン酸基ひとつの分子量に一致する。そこでフォスファターゼ処理をおこなったところ、Fj 共発現によるカドヘリンドメインの電気泳動上のシフトは消失した^[10]。これらの結果から、培養細胞において、Fat と Ds のカドヘリンドメインは、Fj 共発現によりリン酸化されることがわかった^[10]。そこで、Fj と既知のキナーゼのアミノ酸配列を詳細に比較したところ、Fj はいくつかの既知のキナーゼと低い相同性を示すことがわかった。このことから Fj は、これまで分子として同定されていない、ゴルジ体のキナーゼであると予測し、精製タンパク質を

用いた *in vitro* キナーゼアッセイをおこなった。その結果、Fj の自己リン酸化と、Fat と Ds のカドヘリンドメインのリン酸化が検出された。Fj^{GGG} を用いた場合には、Fj の自己リン酸化とカドヘリンドメインのリン酸化は検出されなかった。また、これまでの実験から翻訳後修飾サイトであると予測された Ser を Ala に置換したカドヘリンドメインにおいては、カドヘリンドメインのリン酸化は検出されなかった。これらの結果から、Fj は、Fat と Ds のカドヘリンドメインのうち、特定の Ser 残基をリン酸化するゴルジ体キナーゼであることがわかった^[10]。Fj のキナーゼ活性に必要な DNE 配列は、既知のキナーゼにおいて 2 価の金属イオンの結合配列として知られる Asp-Phe-Gly (DFG) 配列に相当すると考えられる。また、Fj によりリン酸化されるカドヘリンドメインの Ser 周辺のアミノ酸配列は、既知のキナーゼの認識配列と一致しない。実際に、多くのキナーゼの基質となるカゼインやミエリン塩基性タンパク質において、Fj によるリン酸化は検出されなかった。これらの結果は Fj の基質特異性のユニークさを示している^[10]。ショウジョウバエにおいて、*ff* を恒常的に全身に強制発現させると、組織の縮小化と平面細胞極性の異常が観察される^{[6][7]}。一方で、キナーゼ活性をもたない *ff*^{GGG} の強制発現では、これらの表現型は観察されなかった^[10]。この結果は、Fj のキナーゼ活性は生体内においても Fat シグナルに必要であることを示唆している。

今回得られた結果は、Fj がゴルジ体において、Fat と Ds のカドヘリンドメインをリン酸化することで Fat シグナルを調節することを示している。これまでに、細胞質内でおこるタンパク質のリン酸化によるシグナル伝達の調節機構についてはよく研究されてきた。例えば細胞質において Fat シグナルは、キナーゼ Hippo が別のキナーゼ Warts をリン酸化し、Warts が転写の補助活性化因子 Yorkie をリン酸化するというタンパク質のリン酸化カスケードにより調節を受けることが知られている^{[4][5]}。一方でゴルジ体においては、ゴルジ体キナーゼ Fj が Fat と Ds のカドヘリンドメインをリン酸化することで Fat シグナルを調節している。本研究により、タンパク質の細胞外領域のリン酸化もまた、シグナル伝達の調節に重要な役割をはたすことが示された。また、Fj は分子として初めて同定されたゴルジ体キナーゼである。

今後の展望として、カドヘリンドメインのリン酸化の生理的機能の解明、新規ゴルジ体キナーゼの探索・機能の解明が挙げられる。本研究は予想外な展開を示し、ゴルジ体キナーゼ分子の発見と、タンパク質細胞外領域のリン酸化による生体調節という新しい研究領域を開拓することにつながった。

参考文献

[1] Brockhausen I (2006) Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer:

glycodynamics and functions. *EMBO Rep* 7: 599-604.

[2] Kannagi R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N (2004) Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci* 95: 377-384.

[3] Cho E, Irvine KD (2004) Action of fat, four-jointed, dachsous and dachs in distal-to-proximal wing signaling. *Development* 131: 4489-4500.

[4] Reddy BV, Irvine KD (2008) The Fat and Warts signaling pathways: new insights into their regulation, mechanism and conservation. *Development* 135: 2827-2838.

[5] Saucedo LJ, Edgar BA (2007) Filling out the Hippo pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 613-621.

[6] Yang CH, Axelrod JD, Simon MA (2002) Regulation of Frizzled by fat-like cadherins during planar polarity signaling in the *Drosophila* compound eye. *Cell* 108: 675-688.

[7] Casal J, Struhl G, Lawrence PA (2002) Developmental compartments and planar polarity in *Drosophila*. *Curr Biol* 12: 1189-1198.

[8] Strutt H, Mundy J, Hofstra K, Strutt D (2004) Cleavage and secretion is not required for Four-jointed function in *Drosophila* patterning. *Development*.131: 881-890.

[9] Haines N, Irvine KD (2003) Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 786-797.

[10] Ishikawa HO, Takeuchi H, Haltiwanger RS, Irvine KD (2008) Four-jointed is a Golgi kinase that phosphorylates a subset of cadherin domains. *Science* 321: 401-404.