

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08577

研究課題名(和文) Notchシグナルの調節因子almondex/TM2D3の機能

研究課題名(英文) Functions of regulators for Notch signaling, almondex/TM2D3

研究代表者

北川 元生 (Motoo, Kitagawa)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：40262026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスTm2d3およびその相同体であるショウジョウバエalmondex (amx) の機能について、それぞれの欠失変異体を用いて検討した。

マウスTm2d3欠失培養細胞では野生型細胞にくらべ細胞表面におけるNotch1およびNotch2の発現が低下していた。ショウジョウバエ初期胚腹部予定内胚葉細胞では、NotchとそのリガンドDeltaは相互作用にひき続いて生じるエンドサイトーシスによって細胞内小胞に共局在するが、amxの欠失突然変異体ではこうした小胞はほとんど観察されなかった。

これらの結果から、Tm2d3/amxはNotchが細胞表面に発現してリガンドとの相互作用するために必要であると結論づけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで不明であったTM2D3とalmondexの生化学的、細胞生物学的な機能を初めて明らかにしたものである。Notchシグナルの異常は各種悪性腫瘍、遺伝性疾患の原因であることが知られているが、本研究の成果によって今後こうした問題の理解が深まり、さらに解決の手がかりが得られることを期待する。またヒトにおいて、TM2D3のある遺伝子多型が晩期発症型アルツハイマー病の発症危険率を約7.5倍上昇させ、さらに発症年齢を約10年早めることが知られているが、本研究の成果が今後この機構を解明するために役立つことも期待する。

研究成果の概要(英文)：We have examined mouse Tm2d3 and its Drosophila homolog almondex (amx) by using their respective deficient mutant animals.

Murine Tm2d3-deficient cultured cells were found to have decreased surface expression of both Notch1 and Notch2 as compared with the wild type cells. In the ventral presumptive mesodermal cells of early Drosophila embryos, Notch and its ligand Delta interact, are endocytosed, and co-localize in intracellular vesicles. In contrast, such vesicles were scarcely observed in the amx-deficient mutants.

Based on these results, it is concluded that TM2D3/amx positively regulates surface expression of Notch receptors to interact with their ligands.

研究分野：細胞シグナル伝達機構の生化学

キーワード：Notchシグナル TM2D3 almondex

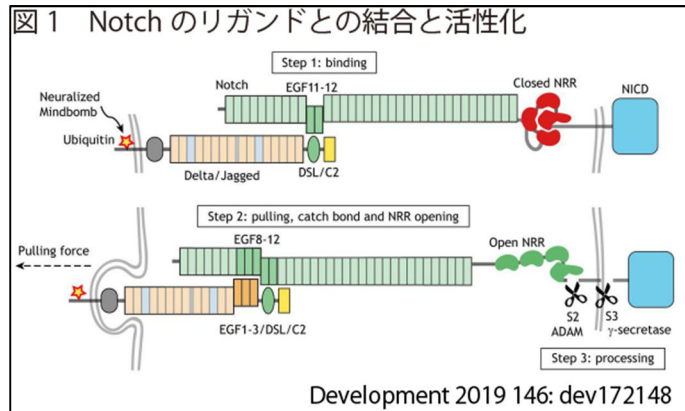
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Notch シグナルは分化制御をはじめとする様々な細胞の運命決定に関与することが知られている。このシステムは線虫からショウジョウバエ、ヒトにいたる動物間でよく保存されており、重要かつ多彩な役割を果たすことが示されている(文献)。

Notch は膜一回貫通型受容体分子である(図1)。そのリガンドとなる Delta および Jagged もまた膜一回貫通型タンパク質であり、

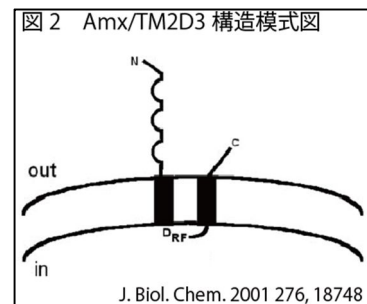
これらが結合するためには、それぞれを発現する細胞の接触が必要である(図1)。Notch とリガンドが結合すると、これに同期してリガンドを発現する細胞にエンドサイトーシスが生じる(図1)。その際発生する張力によって Notch の膜貫通ドメイン近傍に存在する Negative regulatory region (NRR) のコンフォメーションが変化して S2 と呼ばれる部位が露出し、ADAM10 プロテアーゼがこの部位で Notch を切断する



(図1)。切断された Notch はさらに別のプロテアーゼである γ -secretase の基質となって膜貫通ドメイン内の S3 と呼ばれる部位で切断され、Notch の細胞内ドメイン (NICD) が膜から遊離する(図1)。この一連の機構が Notch の活性化であるが、活性化型 Notch である NICD はさらに核に輸送され、DNA 結合タンパク質である RBP-J および共役因子である Mastermind と複合体を形成し *Hes*、*Hey* などの標的遺伝子の転写を活性化する(文献)。

almondex (amx) 遺伝子を欠失したショウジョウバエ胚は、神経系の過形成と表皮の欠失 (neurogenic phenotype) という Notch シグナルの欠失に特徴的な表現型を示す。さらにこの *amx* の欠失突然変異体の表現型が活性化型 Notch の強制発現によってレスキューされるという遺伝学的解析結果等から、*amx* は Notch シグナルを正に制御することが示唆されていた(文献)。

TM2D3 (TM2 domain containing 3) はショウジョウバエ *Amx* タンパク質と構造上の相同性(34%)をもつヒトタンパク質である。*Amx*、TM2D3 とともに N 端に signal peptide を持ち、さらに C 端部に膜貫通ドメインを 2 つ持つことから膜タンパク質であると考えられる(図2)。TM2D3 は当初、Amyloid タンパク質の結合タンパク質として同定された TM2D1 (TM2 domain containing 1) と構造上の相同性(19%)を持つタンパク質として同定された。しかし TM2D1 とは異なり、TM2D3 は Amyloid とは結合せず、その機能は不明であった(文献)。



研究開始当初、我々は 293T 細胞に Notch1 とともに TM2D3 を過剰発現させると、Notch1 が活性化することを活性化型 Notch1 特異抗体を用いた Western blot 法によって見出していた。また Notch1 の各種欠失変異体を用いて、リガンド結合部である細胞外ドメイン中の EGF repeat 11 と 12 がこの活性化に必要であるという結果を得ていた。この結果は、TM2D3 過剰発現による Notch1 の活性化には、Notch1 が隣接する細胞に発現するリガンド (Jagged1 など) と結合することが必要であることを示唆する。そこで膜非透過性タンパク質ピオチン化試薬を用いた実験で検討したところ、TM2D3 の過剰発現は細胞表面の Notch1 発現量を増加させるという結果が得られた。

さらに、TM2D3 が Notch1 と物理的に会合すること、この会合には Notch1 の NRR が必要であるという結果を得ていた。また、TM2D3 過剰発現による Notch1 の活性化は、293T とは別の細胞を用いた luciferase assay によっても検出された。

以上より TM2D3 は Notch1 の細胞表面での発現を増加させる機能を持つことが示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエ *Amx* タンパク質、およびこれと構造上の相同性を有する哺乳動物 TM2D3 タンパク質の Notch シグナルにおける機能を、特に機能欠失変異体を用いて追究した。この研究を通じて、細胞表面における Notch の制御機構の解明を目指し、将来の応用に資することが目的である。

3. 研究の方法

(1) Tm2d3 ノックアウトマウス系統を作製するため、この遺伝子の exon 5 をはさむ intron 4 および intron 5 中の塩基配列を標的として選択した。これらの配列を有する合成オリゴヌクレオチドをそれぞれ発現ベクター pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 に組み込んでクローン化し、混合してマウス受精卵に注入することによって、受精卵ゲノム DNA 中の両標的配列付近の CRISPR-Cas9 システムによる二重鎖切断と、続いて生じる non-homologous end joining による exon 5 を含む配列の除去を期待した。注入後の受精卵は偽妊娠マウスの子宮に移植し、生まれ

たマウスについて PCR 法によって検索したところ、exon 5 を欠失するアレルを有するマウス 1 匹が得られた。これを野生型マウスと交配することによってノックアウトマウス系統を樹立した。PCR 産物をシーケンシングすることによって、このアレルは exon 5 全体が欠失していることを確認した。

初代培養線維芽細胞は、ヘテロ接合体同士の交配後、13.5 日胎仔から単離・培養し、PCR 法によってホモ接合体細胞 (*Tm2d3* 欠失細胞) と野生型細胞を選択して、その後の解析に供した。

膜非透過型タンパク質ビオチン化試薬によるビオチン化は市販のキットを用い、細胞溶解後ビオチン化タンパク質をアビジン-アガロースを用いて回収し、Western blot 法によって各タンパク質の回収量を評価した。

生細胞の免疫染色による検討は、細胞を Notch1 または Notch2 の細胞外ドメインに対する抗体と室温にて 30 分間インキュベートし、洗浄後細胞を固定し、さらに蛍光標識された二次抗体と反応後、共焦点顕微鏡を用いることにより行った。

(2) FLAG tag を付加した TM2D3 (FLAG-TM2D3) をテトラサイクリン誘導性に発現する細胞株は、293 細胞をベースとする市販の Flp-In 293 T-REx 細胞とそれに付随するシステムを用いて樹立した。免疫染色とその解析は、抗 FLAG 抗体と共焦点顕微鏡を用いた。

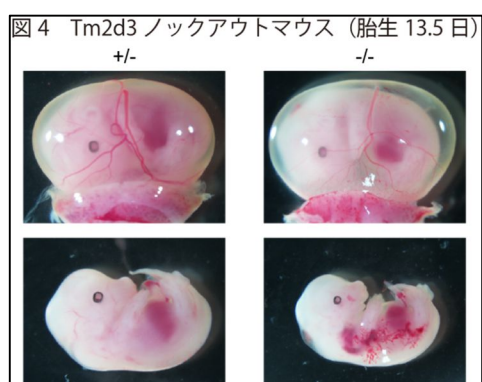
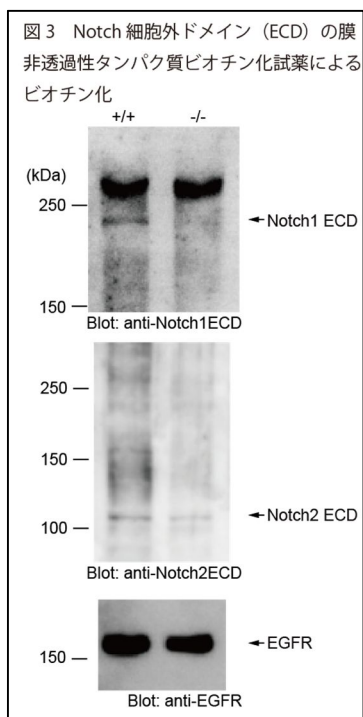
(3) ショウジョウバエ *amx* 欠失突然変異体は、長年唯一の *amx* 欠失突然変異体アレルとして研究されてきた *amx¹* を用いた (文献)。 *amx* は母性効果遺伝を示すので、母体と接合体がいずれも *amx¹* を有する個体を *amx* 欠失突然変異体とした。遺伝学的レスキューは、野生型 *amx* 遺伝子を含む約 3.3kb のゲノム領域が第 2 染色体に挿入されたショウジョウバエと交配することで試みた (文献)。 ショウジョウバエ胚は常法により固定、免疫染色後、共焦点顕微鏡で解析した。

4. 研究成果

(1) *Tm2d3* のノックアウトマウス系統を樹立した。TM2D3 の過剰発現による Notch1 活性化には TM2D3 の膜貫通ドメインが必要であるというデータを得ていたため、標的としてマウス *Tm2d3* 遺伝子においてこのドメインの N 端をコードする exon 5 を選んだ。また exon 5 は塩基数が 76 であり 3 の倍数ではないので、たとえこれを欠失したアレルから exon 4 と exon 6 が結合した mRNA が産生されても、活性のあるタンパク質は発現しないと考えられた。CRISPR-Cas9 法を用いて exon 5 を欠失させ、この allele を germline に有するマウス系統を作製することに成功した。

この系統のマウスから初代培養胎仔線維芽細胞を培養した。細胞全溶解液における Notch1 と Notch2 の発現量は *Tm2d3* 欠失細胞と野生型細胞の間で明らかな差が見られなかったが、細胞表面におけるこれらの発現を膜非透過性タンパク質ビオチン化試薬によるビオチン化によって検討したところ、Notch1 と Notch2 いずれもが *Tm2d3* 欠失細胞 (-/-) では野生型細胞 (+/+) より低下していた (図 3)。他の膜タンパク質である EGFR のビオチン化には明らかな差が見られなかったことから (図 3)、Notch1 と Notch2 の変化は特異的なものであると考えられた。また、Notch1 あるいは Notch2 細胞外ドメインに対する抗体を生細胞と反応させ、その後細胞を固定してこれらの抗体を可視化したところ、Notch1、Notch2 抗体いずれもが *Tm2d3* 欠失細胞では野生型細胞より結合量が低下していた。これらの結果から、*Tm2d3* の欠失は細胞表面における Notch1 および Notch2 の発現を特異的に低下させると考えられた。これは、TM2D3 の過剰発現によって Notch1 の細胞表面の発現が増加するという以前の結果と合致するものであり、TM2D3 は Notch 受容体の細胞表面における発現を正に制御すると結論された。

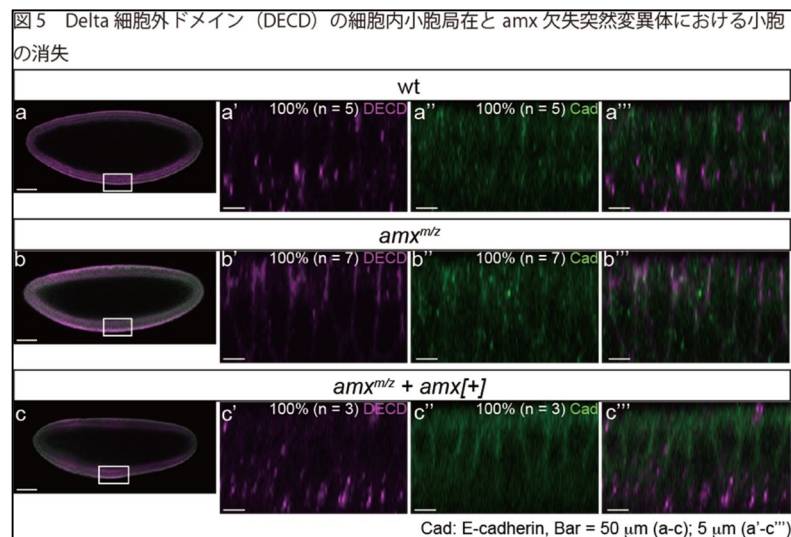
Tm2d3 ノックアウトマウス (-/-) は、器官形成期である胎生 9.5-14.5 日において卵黄囊血管が低形成であり、胎仔本体においては全身のうっ血と出血、さらに浮腫を示した (図 4)。これらの表現型は、*Jagged1* ノックアウトマウスなどの Notch シグナル系の他のいくつかのノックアウトマウスで報告されているものと類似している。しかしながら、Notch シグナルが完全に欠失していると考えられる *Rbp-j* ノックアウトマウスなどにみられる心ループの低形成や体節の形成不全は観察されないことから、*Tm2d3* は Notch シグナルのすべてを担っているわけではないことが示唆された。



(2)TM2D3 の細胞内局在を検討するため、FLAG tag を付加した TM2D3 (FLAG-TM2D3) をテトラサイクリン誘導性に発現する細胞株を樹立した。この細胞における誘導時の FLAG-TM2D3 の発現量は、293T 細胞に FLAG-TM2D3 の発現ベクターを一過性に導入した場合の発現量と比べ 1/10 程度であった。免疫染色法によって、FLAG-TM2D3 は誘導時に多数の細胞内小胞様構造に局在することが示された。この結果は、以前の 293T に FLAG-TM2D3 の発現ベクターを一過性に導入した場合の結果 (小胞体に局在) とは異なるが、過剰に発現した膜タンパク質が小胞体に蓄積することはよく知られたアーティファクトであり、今回の結果の方がより内因性 TM2D3 の局在を反映しているものと考えられる。

(3)ショウジョウバエ初期胚において、Notch とリガンド Delta の発現は胚盤葉期の単層上皮細胞表面で開始する。この時期の腹部予定内胚葉細胞では (図 5a 長方形) さらにこれらリガンドと受容体が結合し、引き続いて起こるエンドサイトーシスの結果 Notch と Delta の細胞外ドメインが細胞内小胞に共局在する (図 5a') (文献)。

一方 *amx* 欠失突然変異体 (図 5b-b') では、この Notch と Delta を含む小胞がほとんど観察されず、これらタンパク質が細胞頂端部の形質膜付近に蓄積することを見出した。さらにこの Notch および Delta の細胞外ドメインを含む細胞内小胞は、野生型 *amx* 遺伝子を含むゲノム領域の導入によってレスキューされることを見出した (図 5c-c')。これらの結果は、Amx は Notch が細胞表面に発現してリガンドと相互作用するために必要であるという考えと一致する。



以上より *almondex*/TM2D3 は Notch 受容体の細胞表面での発現を正に制御すると結論づけられた。本研究は *almondex*/TM2D3 の生化学的、細胞生物学的機能を初めて明らかにしたものである。この機構のより詳細な検討は今後の課題である。

Tm2d3 ノックアウトマウスの表現型が Notch シグナル完全欠失体の表現型とは異なる原因として、*Tm2d3* と構造上類似するタンパク質をコードする遺伝子が他に 2 つ (*Tm2d1*, *Tm2d2*) 存在するため、これらが Notch シグナルに対して redundant な役割を果たしている可能性が考えられる。この可能性の検討もまた今後の課題である。

1393 人の晩発性アルツハイマー病患者と、8141 人の対照における exome-wide association analysis の結果として、*TM2D3* 遺伝子に P155L 多型を持つことが、アルツハイマー病発症リスクの増加 (odds ratio = 7.5) と、発症の低年齢化 (約 10 年) に関連することが報告された (文献)。この報告では、ショウジョウバエ *amx*¹ の表現型がヒト TM2D3 の強制発現によってレスキューでき、したがって Amx は TM2D3 の相同体であること、しかし P155L 多型をもつ TM2D3 ではレスキューできないことも報告されており、P155L 多型は TM2D3 に機能欠失をもたらすことが示唆されている。APP、Amyloid などアルツハイマー病関連分子と TM2D3 の生化学的・細胞生物学的・遺伝学的な相互作用を検討することも今後の興味深い研究課題である。

<引用文献>

- Kopan R. ed. Notch Signaling. Amsterdam: Academic Press. 2010
- Henrique D., Schweisguth F. Mechanisms of Notch signaling: a simple logic deployed in time and space. *Development* 2019 146, dev172148
- Michellod, M. A., Randsholt, N. B. mplication of the Drosophila beta-amyloid peptide binding-like protein AMX in Notch signaling during early neurogenesis. *Brain Res. Bull.* 2008 75, 305-309
- Kajkowski, E. M. *et al.* beta-Amyloid peptide-induced apoptosis regulated by a novel protein containing a g protein activation module. *J. Biol. Chem.* 2001 276, 18748-18756
- Lehmann, R., Jimenez, F., Dietrich, U., Campos-Ortega, J. A. On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux*

Arch Dev Biol 1983 192, 62-74

Jakobsdottir, J. *et al.* Rare Functional Variant in TM2D3 is Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease. PLoS Genet 2016 12, e1006327

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hirano K.-i., Suganami A., Tamura Y., Yagita H., Habu S., Kitagawa M., Sato T. Hozumi K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Delta-like 1 and Delta-like 4 differently require their extracellular domains for triggering Notch signaling in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e50979
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.50979	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Das P., Salazar J. L., Li-Kroeger D., Yamamoto S., Nakamura M., Sasamura T., Inaki M., Masuda W., Kitagawa M., Yamakawa T., Matsuno K.	4. 巻 62
2. 論文標題 Maternal almondex, a neurogenic gene, is required for proper subcellular Notch distribution in early Drosophila embryogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 80-93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12639	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 北川元生、増田渉、山川智子、安島理恵子、三宅克也、梅宮敏文、東和彦、田丸淳一、相賀裕美子、松野健治	4. 巻 24
2. 論文標題 TM2 domain containing 3 (TM2D3) はNotch受容体 の細胞表面の発現を制御する	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 国際医療福祉大学学会誌	6. 最初と最後の頁 171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 北川元生、増田渉、山川智子、安島理恵子、梅宮敏文、東和彦、田丸淳一、相賀裕美子、松野健治	4. 巻 23
2. 論文標題 TM2 domain containing 3 (TM2D3) によるNotch1 の活性化	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 国際医療福祉大学学会誌	6. 最初と最後の頁 151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujita T., Terada J., Kitagawa M., Tatsumi K.	4. 巻 55
2. 論文標題 Lipoid pneumonia with partial anomalous pulmonary venous return.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Intern. Med.	6. 最初と最後の頁 1399-1400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.55.6392	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Muroyama Y., Baba A., Kitagawa M., Saito T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Olfactory sensory neurons control dendritic complexity of mitral cells via Notch signaling.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLOS Genet.	6. 最初と最後の頁 e1006514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1006514	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Toritsuka M., Kimoto S., Muraki K., Kitagawa M., Kishimoto T., Sawa A., Tanigaki K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Regulation of striatal dopamine responsiveness by Notch/RBP-J signaling.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Transl. Psychiatry	6. 最初と最後の頁 e1049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/tp.2017.21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Masuda W., Yamakawa T., Ajima R., Miyake K., Umemiya T., Azuma K., Tamaru J.-i., Kiso M., Saga Y., Matsuno K., Kitagawa M.
2. 発表標題 TM2 domain containing 3, a mammalian homologue of Drosophila neurogenic gene product Almondex, regulates surface presentation of Notch receptors.
3. 学会等名 The Notch Meeting XI (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川元生
2. 発表標題 Transmembrane 2 domain-containing 3 (TM2D3) はNotch受容体 の細胞表面の発現を制御する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川元生、増田渉、山川智子、安島理恵子、三宅克也、梅宮敏文、東和彦、田丸淳一、相賀裕美子、松野健治
2. 発表標題 Transmembrane 2 domain containing 3 (TM2D3) はNotch受容体 の細胞表面の発現を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川元生、増田渉、山川智子、安島理恵子、三宅克也、梅宮敏文、東和彦、田丸淳一、相賀裕美子、松野健治
2. 発表標題 TM2 domain containing 3 (TM2D3) はNotch受容体 の細胞表面の発現を制御する
3. 学会等名 第9回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川元生
2. 発表標題 TM2 domain containing 3 (TM2D3) によるNotch1 の活性化
3. 学会等名 第8回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motoo Kitagawa
2. 発表標題 TM2 domain containing 3, a mammalian homologue of Drosophila neurogenic gene product Almondex, activates Notch1.
3. 学会等名 The Notch Meeting X (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masuda W.
2. 発表標題 TM2 domain containing 3, a possible mammalian homologue of Drosophila neurogenic gene product Almondex, activates Notch1
3. 学会等名 Notch研究会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	増田 渉 (Masuda Wataru) (00623464)	埼玉医科大学・大学病院・助教 (32409)	
研究協力者	相賀 裕美子 (Yumiko Saga)	国立遺伝学研究所 (63801)	
研究協力者	安島 理恵子 (Ajima Rieko)	国立遺伝学研究所 (63801)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	木曾 誠 (Kiso Makoto)	国立遺伝学研究所 (63801)	
研究協力者	梅宮 敏文 (Umemiya Toshifumi)	国際医療福祉大学 (32206)	
研究協力者	東 和彦 (Azuma Kazuhiko)	千葉大学 (12501)	
研究協力者	田丸 淳一 (Tamaru Jun-ichi)	埼玉医科大学 (32409)	
研究協力者	三宅 克也 (Miyake Katsuya)	国際医療福祉大学 (32206)	
研究協力者	松野 健治 (Matsuno Kenji)	大阪大学 (14401)	
研究協力者	山川 智子 (Yamakawa Tomoko)	大阪大学 (14401)	
研究協力者	ダス プシュパ (Das Puspa)	大阪大学 (14401)	