

がほとんどわかっていないからである。

脳の構造を見ても、ショウジョウバエとヒトは全く異なるが、ドーパミンという同じ物質を使い同じような行動を取ることから、睡眠行動の原型は哺乳類と同じと考えられる。つまりこの2種類の動物が進化的に分離した数億年前まで睡眠覚醒行動のルーツ、そしてその生物学的意義もさかのぼれる可能性がある。またさらに、睡眠の対称状態である覚醒、それを規定する意識の面でも、ショウジョウバエという遺伝学的ツールが用いやすいモデル動物を使うことでさらなる研究の進展が期待される。

- 1) Kume, K., Kume, S., Park, S.K., Hirsh, J., & Jackson, F.R. (2005) *J. Neurosci.*, 25, 7377-7384.
- 2) Kume, K. (2006) *Sleep Biol. Rhythm*, 4, 263-273.
- 3) 糸 和彦 (2003) 時間の分子生物学, 講談社, 東京.
- 4) 糸 和彦 (2006) 蛋白質核酸酵素, 51, 853-862.
- 5) 糸 和彦 (2006) 医学のあゆみ, 217, 571-575.
- 6) Konopka, R.J. & Benzer, S. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68, 2112-2116.
- 7) Hendricks, J.C., Finn, S.M., Panckeri, K.A., Chavkin, J., Williams, J.A., Sehgal, A., & Pack, A.I. (2000) *Neuron*, 25, 129-138.
- 8) Shaw, P.J., Cirelli, C., Greenspan, R.J., & Tononi, G. (2000) *Science*, 287, 1834-1837.
- 9) Campbell, S.S. & Tobler, I. (1984) *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 8, 269-300.
- 10) Tobler, I.I. & Neuner-Jehle, M. (1992) *J. Sleep. Res.*, 1, 231-239.
- 11) Hendricks, J.C., Lu, S., Kume, K., Yin, J.C., Yang, Z., & Sehgal, A. (2003) *J. Biol. Rhythms*, 18, 12-25.
- 12) Porzgen, P., Park, S.K., Hirsh, J., Sonders, M.S., & Amara, S. G. (2001) *Mol. Pharmacol.*, 59, 83-95.
- 13) Shaw, P.J., Tononi, G., Greenspan, R.J., & Robinson, D.F. (2002) *Nature*, 417, 287-291.
- 14) Cirelli, C., Bushey, D., Hill, S., Huber, R., Kreber, R., Ganetzky, B., & Tononi, G. (2005) *Nature*, 434, 1087-1092.
- 15) van Swinderen, B., & Greenspan, R.J. (2003) *Nat. Neurosci.*, 6, 579-586.
- 16) van Swinderen, B., Nitz, D.A., & Greenspan, R.J. (2004) *Curr. Biol.*, 14, 81-87.
- 17) Pitman, J.L., McGill, J.J., Keegan, K.P., & Allada, R. (2006) *Nature*, 441, 753-756.
- 18) Joiner, W.J., Crocker, A., White, B.H., & Sehgal, A. (2006) *Nature*, 441, 757-760.

糸 和彦

(熊本大学発生医学研究センター)

Regulation of sleep and arousal in *Drosophila*
Kazuhiko Kume (Kumamoto University, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Honjo, Kumamoto, Kumamoto 860-0811, Japan)

ゴルジ体ユニットによる糖鎖多様性の制御

はじめに

細胞外に分泌または細胞膜上に提示されるタンパク質の多くは、糖鎖による翻訳後修飾を受ける。そのような糖鎖の構造は非常に多岐にわたっており、糖鎖付加されるタンパク質内の配列、タンパク質の種類、細胞や組織の種類、個体、生物種によって大きく異なる。そのように多様な糖鎖だが、特定のタンパク質の特定の位置には、ほぼ同じ種類の糖鎖が特異性をもって付加される。このような糖鎖付加の多様性と特異性がどのように制御されているかについては、現在のところ、多くの部分がかかっていない。我々はショウジョウバエを用いた解析より、糖鎖付加の現場であるゴルジ体には異なる糖鎖付加を行う複数の種類があることを見出し、このような機能的に異なるゴルジ体のことを「ゴルジ体ユニット」と名付けた。

1. 生体内での糖鎖付加反応：糖転移酵素、糖ヌクレオチド輸送体

糖鎖とは、単糖がグリコシド結合を介して鎖状につながったものである。単糖間のグリコシド結合は、糖転移酵素によって生成される。糖転移酵素の数は多く、ヒトでは300以上、ショウジョウバエでも100ほどあるといわれている。糖転移酵素は、タンパク質や脂質、またはタンパク質や脂質に結合した糖鎖に対して、さらに単糖を結合させ、糖鎖を伸長させる活性をもつ。糖鎖に利用される単糖にはいくつもの種類があり、さらに単糖間のグリコシド結合にも多様な種類があるため、糖転移酵素には基質および反応特異性がある。糖転移反応には、糖にヌクレオチドが結合した「糖-ヌクレオチド」が利用される。糖-ヌクレオチドは主として細胞質で生成されるが、その生成過程というのは、いくつもの反応から構成される複雑な代謝回路からなる。

ところで、N-結合型糖鎖のコア部分を別として、多くの糖鎖は小胞体やゴルジ体内腔で生成される。したがって、糖-ヌクレオチドは小胞体やゴルジ体の膜を通過する必要がある。その輸送を行っているのが、小胞体やゴルジ体の膜上にある「糖-ヌクレオチド輸送体」である¹⁾。「糖-ヌクレオチド輸送体」はアンチトランスポーターであり、

小胞体やゴルジ体内腔で糖転移反応後に残ったヌクレオチド部分を、新しい糖-ヌクレオチドと入れ替えている。糖-ヌクレオチド輸送体にも、輸送する糖-ヌクレオチドに対する基質特異性がある。ただしその特異性は、ひとつの輸送体が1種類の糖-ヌクレオチドを輸送する場合だけでなく、ひとつの輸送体が複数の糖-ヌクレオチドを輸送する場合もある。したがって、輸送体の基質特異性には重複する場合がある。

さて、複雑で多様な糖鎖が生成される機構として、糖転移酵素の基質特異性が重要な役割を果たしていると考えられるが、それだけで十分なのだろうか。そもそも、数百ある糖転移酵素がひしめくゴルジ体内腔で、正しい糖転移酵素が正しい順番で順序良く反応することは可能なのだろうか？

2. 生体内での糖鎖付加反応：小胞体，ゴルジ体

分泌タンパク質や膜タンパク質は、粗面小胞体で翻訳されたのち、輸送小胞によってゴルジ体へと運ばれる。また、ゴルジ体の層板 (cisterna) 間の輸送も輸送小胞によって行われる。酵母では、GPI 結合型タンパク質は、小胞体からゴルジ体へ輸送されるときに、他のタンパク質とは異なる小胞で輸送されていることが報告されている²⁾。すなわち、輸送されるタンパク質は小胞体内部で選別されてからゴルジ体に運ばれているらしい。

小胞体での糖修飾の主たるものは、*N*-結合型糖鎖のコア部分と一部の *O*-結合型といわれている。したがって、多様な糖鎖構造が生成されるのは、主としてゴルジ体内腔ということができる。ゴルジ体は、層板構造をもつ。小胞体から輸送されたタンパク質は、ERGIC (ER Golgi intermediate compartment) に運ばれ、そこからシス、メディアル、トランス層板、そして TGN (trans Golgi network) を通りながら、糖修飾を含む翻訳後修飾を受けたのち、細胞膜やリソソームなどへ運ばれる。糖鎖のタンパク質に近い側 (還元末端側) は、小胞体やゴルジ体のシス側で生成され、タンパク質から遠い側 (非還元末端側) は、ゴルジ体のトランス側で生成される。それを裏付けるように、還元末端側を生成する糖転移酵素は、小胞体やゴルジ体のシス側に局在し、非還元末端側を生成する糖転移酵素は、ゴルジ体のトランス側に局在する。このように異なる糖転移酵素が異なる層板に局在するメカニズムとして、(1)糖転移酵素の膜貫通領域の長さが、層板によって異なる脂質二重膜の厚さとちょうど適する場合、その層板に留まるという説と、(2)糖転移酵素が他の酵素などと大きな複合体を作るこ

とによって特定の層板に留まるという説がある。しかし、どちらが正しいのか、またはどちらも正しいのか、それ以外のメカニズムがあるのかについては、まだ完全に明らかにはなっていない。

さて、このゴルジ体の立体構造が、電子顕微鏡を用いて明らかにされた。その構造を見ると、今までひとつのゴルジ体と思われていた構造が、実は、小さなゴルジ体の集合体のような形態をしていることがわかった³⁾。さらに、微小管重合を阻害すると、ゴルジ体が小さな単位となって細胞内に分散していくこともわかった⁴⁾。これらのことは、ゴルジ体は一樣な構造ではなく、小さな単位のゴルジ体が微小管によって集合していることを示唆している。ショウジョウバエの場合、ゴルジ体は最初からこのような小さな単位として細胞内に分散している。

3. 糖鎖異常のショウジョウバエ変異体

ショウジョウバエを用いた遺伝学的スクリーニングから、*wingless* (*wg*) 変異体と類似の表現型を示すものとして、*sugarless* という変異体が分離された⁵⁻⁷⁾。この変異体では、UDP-glucose 6-dehydrogenase という糖-ヌクレオチドを生成する酵素遺伝子群のひとつに変異が生じていた。さらに、同様の表現型を示す一連の変異体が分離され、それらがヘパラン硫酸をもつプロテオグリカンの生成に必要な一連の分子であることがわかった。このような研究から *Wg* の情報伝達にプロテオグリカンが必要であることが明らかとなった。

また、ある種の Notch 情報伝達に必要な *fringe* (*fng*) という変異体が知られていたが、それが Notch の糖修飾に関わる糖転移酵素であることが明らかとなった^{8,9)}。Notch のリガンドとして *Delta* と *Serrate* が知られていたが、*Fng* による糖修飾を受けると Notch は *Delta* によって活性化されるが、*Serrate* によっては活性化されないことがわかり、糖鎖によるリガンド選択性の代表的な例となった。

4. ゴルジ体ユニット

私達と他のグループは同時に、*fng* 変異体と良く似た表現型を示す新たな変異体、*fringe-connection* (*frc*)/*ust 74 C* を分離した^{10,11)}。この変異の原因遺伝子を同定したところ、UDP 結合型の糖-ヌクレオチドのすべての種類を輸送する新規の糖-ヌクレオチド輸送体をコードする遺伝子であることがわかった。UDP 結合型の糖-ヌクレオチドはほとんどの糖鎖に用いられる基質なので、この *frc* 変異体ではほとんどの糖鎖に異常が生じると考えられた。しかし実際に

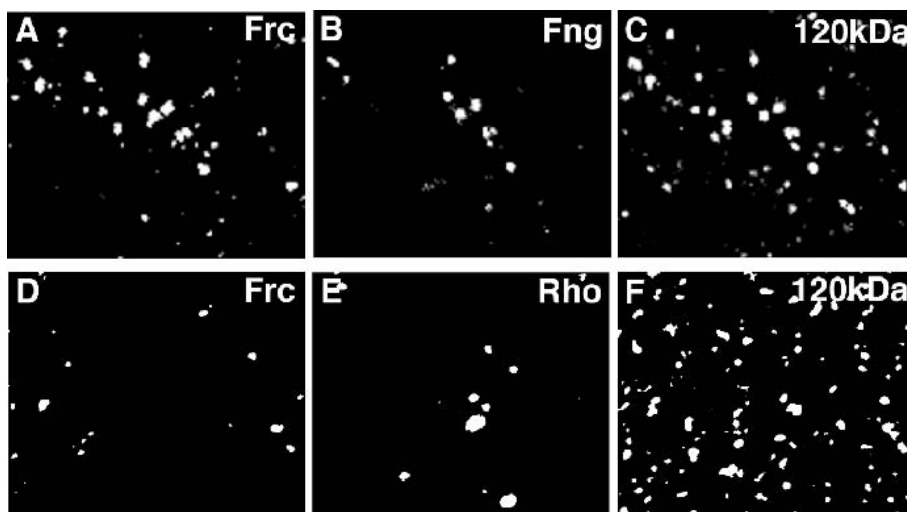


図1 様々な分子の異なるゴルジ体ユニットへの局在
(A-C) Fng (B) は, Frc (A) が局在するゴルジ体 (120kDa, C) の一部に局在する。
(D-F) しかし, Rho (E) は Frc (D) とは異なるゴルジ体 (120kDa, F) に局在する。

は, *frc* 変異体の幼虫では主として Notch の糖修飾が異常になることがわかった。この結果, すなわち糖修飾一般に用いられる分子の変異にもかかわらず, 限られたタンパク質の糖修飾しか異常にならないという結果は, 今までの考え方では説明のつかない現象だった。

そこで, 私達はまず Frc タンパク質の細胞内の局在を調べた。すると驚くことに, Frc タンパク質はすべてのゴルジ体ではなく一部のゴルジ体のみ局在していた (図1)。また, Notch を糖修飾する Fng の局在も調べたところ, Fng も一部のゴルジ体にしか局在しないこと, さらに, Fng は Frc と同じゴルジ体に局在することを見出した (図1)。次に, *frc* 変異体で糖修飾が異常にならない糖タンパク質 Spi (Spi) について検討した。分泌タンパク質である Spi 自体をゴルジ体内で検出するのは難しかったので, Spi の翻訳後修飾に関わる Rhomboid (Rho) の局在に着目した。Frc と Rho の細胞内局在を比較したところ, それぞれ異なるゴルジ体に局在することがわかった (図1)。

そこで, Frc と Rho が局在する異なるゴルジ体を生化学的に分離することを試みた。具体的には, Myc タグした Frc と HA タグした Rho を同時に発現させ, 抗 Myc 抗体または抗 HA 抗体を用いて, それぞれが局在するゴルジ体を分離した。その結果, 抗 Myc 抗体を用いて Frc 局在ゴルジ体を分離した場合には, Rho 局在ゴルジ体は同時に分離されることはなく, 逆に, 抗 HA 抗体を用いて Rho 局在ゴルジ体を分離した場合には, Frc 局在ゴルジ体は同時に分離されることはなかった (図2)。この結果は, 異なる

ゴルジ体は生化学的に分離することができることを示している。

さらに, 異なるゴルジ体を分離したときに, 一方のゴルジ体だけに局在する糖転移酵素も分離されるかを検討した。着目した糖転移酵素は Notch の糖修飾に関わる Fng である。私達は, Fng は Frc と共局在するが Rho とは共局在しないことをまず確認した (図2)。そして, 先ほどと同様の方法で, Frc 局在ゴルジ体を分離したところ, Fng が同時に分離されることがわかった。一方, Rho 局在ゴルジ体を分離した場合には, Fng は同時に分離されることはなかった (図2)。この結果は, 異なるゴルジ体を生化学的に分離すると, 局在する糖転移酵素なども分離することが可能であることを示している。

これらの結果を含めて, 私達は, 少なくともショウジョウバエのゴルジ体には, 複数の種類があり, そこでは異なる翻訳後修飾が行われていることを示し, それぞれ異なるゴルジ体のことを「ゴルジ体ユニット」と名づけた (図3)。

すなわち, 異なるゴルジ体ユニットには, それぞれ異なるセットの糖転移酵素群が局在する。そして, それぞれのゴルジ体ユニットに適した分泌または膜タンパク質が輸送されることによって, それぞれのタンパク質に適した糖鎖が付加されるというモデルである。これは, 糖修飾の多様性を制御する重要なメカニズムであると考えられる¹²⁾。

さらに, 私達は, このゴルジ体ユニットが分泌タンパク質の分泌方向の制御にも重要な役割を果たしていると考えている。ショウジョウバエの眼の発生過程において, ある種類の糖鎖は, 細胞の apical-basal といった極性に沿って異なる局在を示すゴルジ体ユニットで生成される。そして, そうやって生成された糖鎖は視細胞の極性に沿って異なる局在を示す (図3)。例えば, 細胞の apical 側のゴルジ体ユニットで生成された糖鎖は, apical 側に分泌され, そこに局在すると考えている。実際, 様々な種類の糖鎖が, 視細胞の apical-basal の極性にそって異なる局在をする。このことは, 糖修飾と細胞極性の間には深い関連があり, それを結びつけるメカニズムがゴルジ体ユニットであることを示唆しており, 非常に興味深い¹²⁾。

このようなゴルジ体ユニットはショウジョウバエにとど

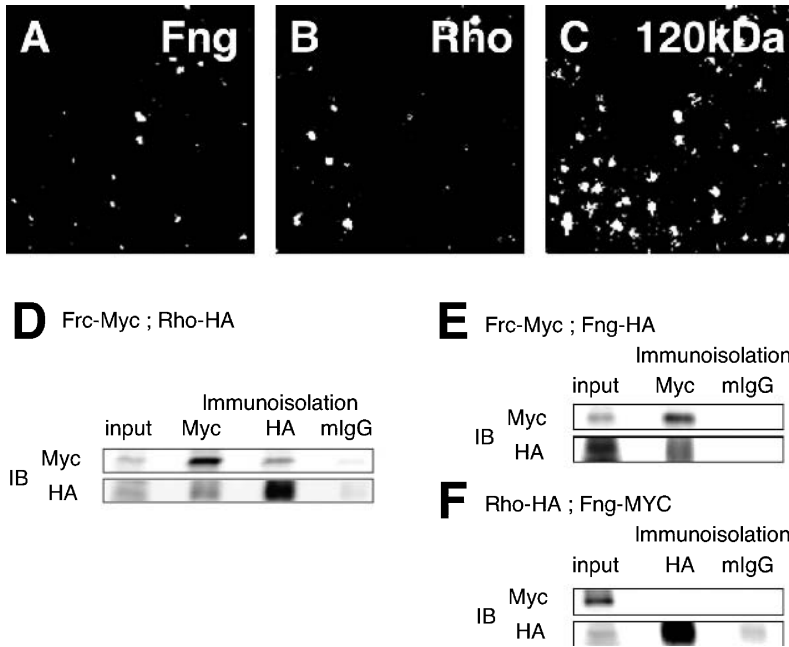


図2 ゴルジ体ユニットの生化学的分離

(A-C) Fng (A) と Rho (B) は異なるゴルジ体 (120kDa, C) に局在する。(D) Myc タグした Frc と HA タグした Rho を同時に発現させ、抗 Myc 抗体または抗 HA 抗体で精製し (Immunoisolation)、抗 Myc 抗体または抗 HA 抗体でプロットした (IB)。その結果、抗 Myc 抗体で精製した場合には Frc-Myc タグされたゴルジ体ユニットが、抗 HA 抗体で精製した場合には Rho-HA タグされたゴルジ体ユニットが主として検出された。(E) Myc タグした Frc と HA タグした Fng を同時に発現させ、抗 Myc 抗体で精製し (Immunoisolation)、抗 Myc 抗体または抗 HA 抗体でプロットした (IB)。その結果、Frc-Myc タグされたゴルジ体ユニットと一緒に、HA タグされた Fng が検出された。(F) 次に、HA タグした Rho と Myc タグした Fng を同時に発現させ、抗 HA 抗体で精製し (Immunoisolation)、抗 Myc 抗体または抗 HA 抗体でプロットした (IB)。その結果、Rho-HA タグされたゴルジ体ユニットは検出されたが、Myc タグされた Fng は検出されなかった。

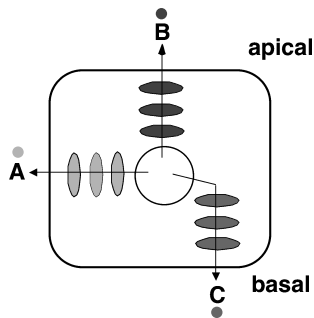


図3 ゴルジ体ユニット

異なる糖修飾を行うゴルジ体が、細胞極性に沿って局在し、さらに分泌方向の制御にも関わっていると考えている。

まらず、哺乳動物にも保存されていると考えている。その理由として、前述したように、哺乳動物のゴルジ体は、

シヨウジョウバエのゴルジ体ユニットが集合しているような形態をしていること、さらには、分裂期や微小管の脱重合によって、それらが分散し、あたかもシヨウジョウバエの細胞のように見えることなどが挙げられる。

今後は、ゴルジ体ユニットの存在を哺乳動物で検討すると共に、その形成メカニズムにも迫っていきたいと考えている。

- 1) Kawakita, M., Ishida, N., Miura, N., Sun-Wada, G. H., & Yoshioka, S. (1998) *J. Biochem.*, **123**, 777-785.
- 2) Muniz, M., Morsomme, P., & Riezman, H. (2001) *Cell*, **104**, 313-320.
- 3) Landinsky, M.S., Mastronarde, D.N., McIntosh, J. R., Howell, K.E., & Staehelin, L.A. (1999) *J. Cell Biol.*, **144**, 1135-1149.
- 4) Shima, D.T., Haldar, K., Pepperkok, R., Watson, R., & Warren, G. (1997) *J. Cell Biol.*, **137**, 1211-1228.
- 5) Binari, R.C., Staveley, B.E., Johnson, W.A., Godavarti, R., Sasisekharan, R., & Manoukian, A.S. (1997) *Development*, **124**, 2623-2632.
- 6) Haerry, T.E., Heslip, T.R., Marsh, J.L., & O'Connor, M.B. (1997) *Development*, **124**, 3055-3064.
- 7) Hacker, U., Lin, X., & Perrimon, N. (1997) *Development*, **124**, 3565-3573.
- 8) Moloney, D.J., Panin, V.M., Johnston, S.H., Chen, J., Shao, L., & Vogt, T.F. (2000) *Nature*, **406**, 369-375.
- 9) Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H., & Cohen, S. (2000) *Nature*, **406**, 411-415.
- 10) Selva, E.M., Hong, K., Baeg, G.H., Beverley, S. M., Turco, S.J., Perrimon, N., & Hacker, U. (2001) *Nature Cell Biol.*, **3**, 809-815.
- 11) Goto, S., Taniguchi, M., Muraoka, M., Toyoda, H., Sado, Y., Kawakita, M., & Hayashi, S. (2001) *Nature Cell Biol.*, **3**, 816-822.
- 12) Yano, H., Yamamoto-Hino, M., Abe, M., Kuwahara, R., Hara-guchi, S., Kusaka, I., Awano, W., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., & Goto, S. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13467-13472.

後藤 聡

(三菱化学生命科学研究所糖鎖制御学グループ)

Golgi units regulating diversity of glycosylation
Satoshi Goto (Mitsubishi-Kagaku Institute of Life Sciences,
11 Minamiooya, Machida, Tokyo, 194-8511, Japan)