

分泌性シグナルタンパク質の脂質修飾と、その意義

1. はじめに

動物の形態形成や、細胞分化、がん化等の様々な過程では、細胞外に分泌され周囲の細胞に情報を伝えるタンパク質、いわゆる分泌性シグナルタンパク質、が鍵となる役割を果たす。分泌性シグナルタンパク質の発現時期や発現部位は正常個体内において厳密にコントロールされており、その結果として、個々の細胞の分化や組織の形態が正常に保たれる。細胞外に分泌されたタンパク質は、移動拡散し、産生細胞の周囲に濃度勾配を形成する。シグナルの受け手となる細胞は、分泌性シグナルタンパク質の濃度に応じて標的遺伝子を発現し、部位特異的な性質を持った細胞や組織に分化していく。従って、個々の細胞の分化や組織の形態が正常に保たれるためには、シグナルタンパク質の分泌や濃度勾配形成の過程もまた厳密に制御されている必要があると予想される。これらのことから、分泌性シグナルタンパク質の分泌ならびに濃度勾配形成の制御機構を解明することは、さまざまな生命現象のしくみを理解する上で重要なことであると考えられる。しかしながら、シグナルタンパク質がどのように分泌されて、その拡散がどのようにに制御され、そして濃度勾配がどのようにして正確に作られるのかについては、未だに多くのことがわかっていない。

近年、Hedgehog (Hh) や Wnt などのいくつかの分泌性シグナルタンパク質が、コレステロールやパルミチン酸といった脂質により修飾を受けることが報告されている。興味深いことに、これらの脂質修飾は分泌性シグナルタンパク質の拡散や分泌に重要であることが明らかにされている。細胞外に分泌され、親水性の環境である細胞外で働く因子であるにもかかわらず、脂質修飾を受けて疎水性の性質が付与されることは、一見矛盾するようである。しかし、そこにこれらの分泌性シグナルタンパク質が濃度勾配を形成する上での秘密が隠されているのかもしれない。本稿では分泌性シグナルタンパク質の脂質修飾とその意義について、我々が昨年明らかにした Wnt タンパク質に対する不飽和脂肪酸（パルミトレイン酸、C16:1）修飾を紹介するとともに、Wnt 以外のシグナルタンパク質で得られている最近の知見をも含めてまとめ、考察したい。

2. タンパク質の脂質修飾

真核生物のタンパク質脂質修飾は複数種ある。脂肪酸修飾はその代表的なものであり、脂質の結合様式によりいくつかに分類される。よく知られているものに、タンパク質の N 末端の Gly にミリスチン酸 (C14:0) がアミド結合した *N*-ミリスチル化と、Cys 残基の SH 基にパルミチン酸 (C16:0) が可逆的にチオエステル結合した *S*-パルミトイル化がある。それ以外の特殊な例として、N 末端の Cys 残基にパルミチン酸がアミド結合した *N*-パルミトイル化や Ser の OH 基に脂肪酸がオキシエステル結合したものの (*O*-アシル化) などが知られている。後述するように、分泌性シグナルタンパク質においてはこのような例外的な脂肪酸修飾がよく見られる。脂肪酸修飾以外の脂質修飾として、分泌性シグナルタンパク質の一つである Hh には、コレステロールが付加することも知られている。

一般的なタンパク質では、その脂質修飾の意義は、膜などの脂質を多く含む細胞内領域へのタンパク質の親和性を高めることであると考えられているが、細胞外で働く分泌性シグナルタンパク質の場合は、どうであろうか？ これまでに脂質修飾を受けることが報告されている分泌性シグナルタンパク質は、Hh 遺伝子ファミリー、Spitz (Spi) と呼ばれるショウジョウバエの EGF 受容体 (EGFR) のリガンド、それに、Wnt 遺伝子ファミリーに属するタンパク質である。興味深いことに、これらのタンパク質における脂質修飾の意義は、その他の多くの場合とは異なっており、しかもその各々のタンパク質ごとにも脂質修飾のあり方とその意義には特有のものがある。以下に順を追って説明したい。

3. Hedgehog における脂質修飾

Hh タンパク質は、脂質修飾が報告された最初の分泌性シグナルタンパク質である。Hh は、昆虫などの無脊椎動物から脊椎動物を含めた動物の胚発生において、表皮や神経管、指芽などの様々な組織を形づくるパターン形成過程で重要な役割を果たす。ショウジョウバエでは 1 種類の Hh タンパク質が知られ、脊椎動物では Sonic Hedgehog (Shh)、Indian Hedgehog 他、複数の Hh タンパク質が知られている。

Hh は、前駆体タンパク質として翻訳されたのち、C 末端側ドメインの自己タンパク質分解活性により、二つのフラグメントに分離される。このうち、細胞外に分泌されてシグナルとしての活性を持つのは N 末端側のフラグメン

トである。この自己分解と同時に、N 末端側フラグメントの C 末端アミノ酸残基に、コレステロールが共有結合的に付加される。コレステロール付加されるタンパク質は、多細胞動物では Hh タンパク質以外に報告がない。さらに、Hh の N 末端側フラグメントには、その N 末端にある Cys 残基にパルミチン酸がアミド結合により付加する (N-パルミトイル化)¹⁻³⁾。このように Hh は、コレステロール付加と N-パルミトイル化という 2 種類の異なる脂質修飾を持つユニークなタンパク質である。

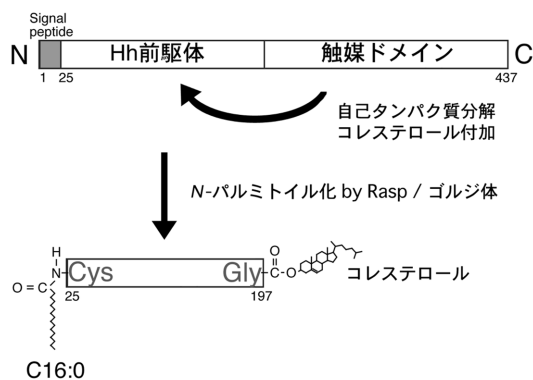
Hh のコレステロールの付加反応は、上述したように Hh 前駆体タンパク質の自己タンパク質分解と同時進行でおこる^{2,3)}。一方、Hh のパルミチン酸修飾は、ゴルジ体に局在する Rasp (別名 Skinny hedgehog, Sightless, Central missing) という特別なアシル基転移酵素が担う (図 1-A)。このことは、ショウジョウバエやマウスの Rasp 変異体胚を用いた実験結果から明らかにされた³⁾。

それでは、Hh タンパク質の脂質修飾の役割は、何だろうか？ コレステロール非修飾型の Shh 変異タンパク質をノックインしたマウスを解析した結果、コレステロール修飾は、Hh タンパク質の活性を高めるとともに Hh タンパク質自身の作用範囲を規定していることがわかった。すなわち、コレステロール非修飾型 Shh 変異体マウスでは、分泌された N 末端側フラグメントは産生細胞の近傍へ分布することはできるものの、遠くまでは拡散することができず、シグナルを離れたところにある細胞まで伝えられない。パルミチン酸非修飾型変異体マウスでも、同様の結果が示されており、これらのことから、Hh タンパク質の脂質修飾の役割は、Hh タンパク質の適切な濃度勾配形成にあると推察される。

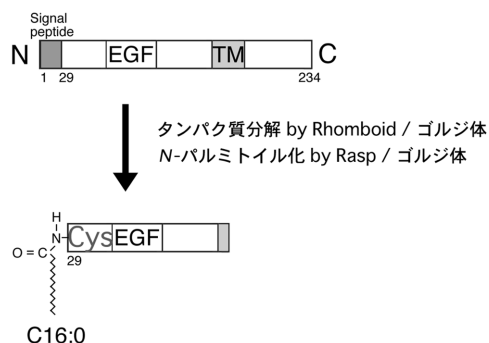
興味深いのは、脂質修飾の有無が分泌後の Hh タンパク質の形 (大きさ) にも影響を与えるという事実である。分泌された Hh タンパク質 (すなわち、N 末端側フラグメント) は、かなりの割合で数分子から成る多量体を形成するが、コレステロール非修飾型は、分泌はされるものの単量体としてのみ存在する。従って、Hh タンパク質のコレステロール修飾は、Hh タンパク質の多量体形成に必須であり、このことは、ショウジョウバエやマウスの Hh タンパク質共通に認められている。

一方、Hh タンパク質の多量体形成に対するパルミチン酸修飾の影響については、マウスの Shh とショウジョウバエの Hh 間で結果に差がある。マウスの Shh はパルミトイル化されることが多量体形成に必須であるのに対し、ショウジョウバエの Hh ではパルミトイル化は必要ないと

(A) Hedgehog



(B) Spitz



(C) Wnt

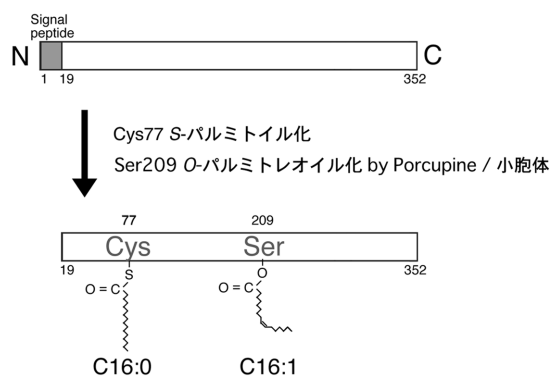


図 1 分泌性シグナルタンパク質の脂質修飾

分泌性シグナルタンパク質のプロセッシングを模式的に示した。なお、図中のアミノ酸番号は、それぞれ、マウス Sonic hh (A)、ショウジョウバエ Spitz (B)、マウス Wnt-3a (C) のものである。

の報告がある。従って、Hh タンパク質の多量体形成におけるパルミチン酸修飾の役割は、Hh タンパク質の種類によって異なるのかもしれない。いずれにせよ、何らかの脂質修飾が Hh タンパク質の多量体形成に重要であることは確かなようである。多量体形成は、Hh タンパク質が遠くの細胞へシグナルを伝える能力を持つために必要なステップであると予想され、それと脂質修飾との関連は興味深い。

4. Spi における脂質修飾

Spi は、ショウジョウバエの EGFR リガンドとして同定されたタンパク質である。Spi は、ほ乳類の TGF α 類似タンパク質で、膜貫通ドメインを一つと、細胞外に EGF ドメインを一つ持つ。Spi のショウジョウバエ生体内での役割は、眼や羽、脚の imaginal disc 等において、EGFR を介して細胞の分化を司ることである。

Spi タンパク質は、膜結合型の前駆体として翻訳されたのち、ゴルジ体において Rhomboid 遺伝子ファミリーに属するプロテアーゼの働きを受けてタンパク質分解される。その際、EGF ドメインを含む細胞外領域は、活性型として細胞外に分泌される。また、活性型 Spi は N 末端の Cys 残基が N-パルミトイル化されている⁴⁾。Spi の N 末端 Cys 残基の N-パルミトイル化は、Hh と同様、Rasp が担っている (図 1-B)。

Spi タンパク質のパルミチン酸修飾の役割を調べるため、パルミチン酸非修飾型の変異タンパク質を作製したところ、このタンパク質は分泌されるものの細胞外へ自由に広がってしまい、細胞膜周辺への局在が失われてしまうことがわかった。このことは、疎水性分子であるパルミトイル基が、Spi タンパク質と膜との親和性を高める上で重要であることを示している。Spi ではパルミトイル化の有無によって活性そのものは変化しないことから、修飾がないと細胞膜付近での Spi 濃度が低下してしまい、その結果として十分量のシグナルを伝えることができなくなるものと解釈できる⁴⁾。

5. Wnt における脂質修飾

Wnt タンパク質は、細胞の増殖、移動、分化を通して、胚発生時における体軸形成、組織形成、臓器形成、或いは、幹細胞の維持などの様々な局面で重要な役割を果たす分泌性シグナルタンパク質である。Wnt タンパク質は、Cys や水溶性アミノ酸に富むタンパク質であるが、全体としては疎水性の性質を示す。その理由は 2 種類の脂質修飾にあると考えられている。2003 年に Nusse らのグループ

はマウスの Wnt-3a タンパク質 77 番目の Cys 残基が S-パルミトイル化 (C16:0) されていることを報告しているが⁵⁾、それに加えて我々は 209 番目の Ser 残基がモノ不飽和脂肪酸であるパルミトレイン酸 (C16:1) により O-パルミトレオイル化されることを新たに見いだした⁶⁾ (図 1-C)。このうち後者の修飾は特殊なものであり、Ser 残基の OH 基を介した脂質修飾はペプチドホルモンの一種 ghrelin でしか報告されていないというばかりでなく、モノ不飽和脂肪酸のみが特定のアミノ酸残基に付加される例は他に報告がない。

Wnt の脂肪酸修飾には、小胞体に局在し Rasp と類似の構造を持つ Porcupine (Porc) が関与することがショウジョウバエ等を用いた遺伝学的研究から示唆されていた^{7,8)}。我々は、上記の二つの脂肪酸修飾のうち、209 番目の Ser の O-パルミトレオイル化が Porc によって行われていることを、siRNA 法で Porc をノックダウンすることにより示した⁶⁾。77 番目の Cys 残基のパルミトイル化を Porc が担っているか否かについては、現時点でははっきりしない。膜結合型 O-アシル基転移酵素に共通のドメイン構造を持つ Rasp や Porc が、共に分泌性シグナルタンパク質の脂質修飾に関わるという事実は興味深い。ただ、Rasp は、飽和脂肪酸であればパルミチン酸、ミリスチン酸、ステアリン酸のどれでも触媒するのに対し、Porc は、不飽和脂肪酸の中でもパルミトレイン酸 (C16:1) のみを好んで触媒すること、Wnt タンパク質以外のタンパク質は基質としないなど基質特異性が高いこと、標的官能基が OH であるなど⁶⁾、その酵素の性質には差もあり、それらの反応機構の詳細の解析が待たれるところである。

では、Wnt の脂質修飾の役割とはどのようなものであろうか？ Wnt の O-パルミトレオイル化の役割を調べるため、マウス Wnt-3a タンパク質のパルミトレオイル化部位の Ser209 を Ala に変換した Wnt-3a 変異タンパク質 (S209A Wnt-3a) を作製し、L 細胞に発現させたところ、S209A Wnt-3a タンパク質は、パルミトレオイル化されなくなると同時に、細胞外にも分泌されなくなった。このことから、Wnt タンパク質のパルミトレイン酸修飾は、Wnt タンパク質が細胞外へ分泌されるのに必須であることが明らかである。また、Wnt-3a 産生 L 細胞の内在性 Porc を siRNA 法でノックダウンすると、やはり、Wnt-3a タンパク質がパルミトレオイル化されなくなると同時に、Wnt-3a の分泌が抑制された。詳しく観ると、どちらの場合も Wnt-3a タンパク質が細胞内の小胞体に貯留している像が観察され、Wnt-3a タンパク質がパルミトレオイル化されないと、

小胞体から出ることができなくなって、本来の分泌経路に乗りなくなっていることが予想された。このことは、*Xenopus* 胚を用いた解析でも同様で、野生型の Wnt-3a タンパク質は、上皮細胞層の apical 側細胞境界領域に局在するのに対して、S209A Wnt-3a タンパク質は、細胞内に留まってしまう像が認められている⁶⁾。さらにショウジョウバエの Porc 変異体では、Wg タンパク質（ショウジョウバエの Wnt タンパク質の一つ）が、Wg 発現細胞領域から広がっていかず、産生細胞付近に留まっている像も観察される^{7,8)}。従って *in vivo* においても、Wnt タンパク質がパルミトレイル化されることが、Wnt タンパク質の分泌に必須であると考えられる。

Wnt タンパク質の場合、分泌型 Wnt タンパク質が高分子構造を形成していることを示唆する vesicle 様の構造体 (argosome) が、顕微鏡下で実際に観察されている。ショウジョウバエでは、Wg 産生細胞から数細胞分離した場所に、Wg タンパク質を含んだ比較的大きなドットが観察され、このドットは、脂質と親和性のある FM4-64 という色素でも染色される⁹⁾。さらに、分泌された Wg タンパク質は、lipophorin というリポタンパク質と結合して小胞 (lipoprotein particle) を形成することから¹⁰⁾、Wnt タンパク質は何らかの脂質や脂質結合タンパク質と複合体を作った状態で分泌されるのではないかと想像される。そのことを念頭におくと、このような高分子複合体構造に取り込まれるために、Wnt タンパク質がパルミトレイル化されることが重要であるとも考えられる。その際、不飽和脂肪酸という折れ曲がった構造を持つ脂肪酸が付加されていることが、Wnt タンパク質がかさ張らずに脂質を含む高分子複合体 (particle) の中にうまく取り込まれる上で利点となるかもしれない。

或いは、別の捉え方として、Wnt タンパク質の脂質修飾が細胞内での Wnt タンパク質の細胞内輸送に関わることも考えられる。すなわち、Wnt-3a タンパク質は、パルミトレイル化されないと、何らかの理由で輸送小胞によって運ばれることができなくなり、小胞体に留まってしまうのかもしれない。Wnt タンパク質の細胞内輸送に関しては不明な点が多いものの、最近の知見からそこには特殊なプロセスが存在しているようにも思われる。例えば、retromer 複合体と呼ばれる酵母の液胞輸送に関わるタンパク質の構成成分である Vps35 タンパク質が、Wnt タンパク質が遠くの細胞へシグナルを伝える能力を持つために必須であることが報告されている^{11,12)}。また、ゴルジ体などに局在する Wntless (別名 Evi, Sprinter) と呼ばれる 7 回

膜貫通型の膜タンパク質が Wnt タンパク質の分泌に関わることも明らかにされてきている^{13~16)}。これら特殊な因子が関わる Wnt タンパク質の分泌の仕組みはこれから多くのことが明らかになってくるものと思われるが、Wnt タンパク質が、細胞内輸送の過程で特殊な形（例えば、前述の高分子複合体構造）に封入されることが、Wnt タンパク質が分泌されるために必要であるという可能性も考えられる。

一方、Wnt-3a のもう一つの脂肪酸修飾部位の Cys77 を Ala に変換した変異タンパク質 (C77A Wnt-3a) は、野生型 Wnt-3a と同様に細胞外に分泌されることから、Cys77 のパルミチン酸修飾は少なくとも分泌には関係しないと考えられる。Cys 残基のパルミトイル化の役割については、Wnt タンパク質の高次構造に影響を与えている可能性などが考えられるが、詳しいことはまだわかっていない。

6. お わ り に

以上、シグナルタンパク質とその脂質修飾の役割について、現在までにわかっていることをまとめてみた。胚発生時に、分泌性のシグナルタンパク質が濃度勾配をつくるとき、濃度をコントロールすることがいかに重要であるかを体感している発生学者にとって、そのためにシグナルタンパク質が特別に獲得したと思われる特殊な脂質修飾とその役割を知り、濃度勾配を制御する分子メカニズムを明らかにしていくことがなぜ面白いと思っているのかを、少しでも伝えることができたなら幸いである。発生学の分野では、タンパク質の詳しい生化学的解析が行われないことも多い。しかしながら、今回の Wnt タンパク質の解析のように、生化学的解析が新たな局面を見せてくれることがあるということを述べて終わりにしたい。

本総説内のうち、Wnt タンパク質の不飽和脂肪酸修飾に関する研究は、自然科学研究機構・統合バイオサイエンスセンターの高田慎治教授の元で、倉田智子、上野直人（基礎生物学研究所）、近藤寿人（科学技術振興機構）および、高尾敏文、里見佳典（大阪大学蛋白質研究所）各氏との共同研究で行われたものです。

- 1) Bumcrot, D.A., Takada, R., & McMahon, A.P. (1995) *Mol. Cell. Biol.*, 15, 2294-2303.
- 2) Porter, J.A., Ekker, S.C., Park, W.J., von Kessler, D.P., Young, K.E., Chen, C.H., Ma, Y., Woods, A.S., Cotter, R.J., Koonin, E.V., & Beachy, P.A. (1996) *Cell*, 86, 21-34.
- 3) Wendler, F., Franch-Marro, X., & Vincent, J.-P. (2006) *Devel-*

- opment, 133, 3055–3061.
- 4) Miura, G.I., Buglino, J., Alvarado, D., Lemmon, M.A., Resh, M.D., & Treisman, J.E. (2006) *Dev. Cell*, 10, 167–176.
 - 5) Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., 3rd, & Nusse, R. (2003) *Nature*, 423, 448–452.
 - 6) Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., & Takada, S. (2006) *Dev. Cell*, 11, 791–801.
 - 7) van den Heuvel, M., Harryman-Samos, C., Klingensmith, J., Perrimon, N., & Nusse, R. (1993) *EMBO J.*, 12, 5293–5302.
 - 8) Kadowaki, T., Wilder, E., Klingensmith, J., Zachary, K., & Perrimon, N. (1996) *Genes Dev.*, 10, 3116–3128.
 - 9) Greco, V., Hannus, M., & Eaton, S. (2001) *Cell*, 106, 633–645.
 - 10) Panakova, D., Sprong, H., Marois, E., Thiele, C., & Eaton, S. (2005) *Nature*, 435, 58–65.
 - 11) Coudreuse, D.Y., Roel, G., Betist, M.C., Destree, O., & Korswagen, H.C. (2006) *Science*, 312, 921–924.
 - 12) Prasad, B.C. & Clark, S.G. (2006) *Development*, 133, 1757–1766.
 - 13) Banziger, C., Soldini, D., Shutt, C., Zipperlen, P., Hausmann, G., & Basler, K. (2006) *Cell*, 125, 509–522.
 - 14) Bartscherer, K., Pelte, N., Ingelfinger, D., & Boutros, M. (2006) *Cell*, 125, 523–533.
 - 15) Goodman, R.M., Thombre, S., Firtina, Z., Gray, D., Betts, D., Roebuck, J., Spana, E.P., & Selva, E.M. (2006) *Development*, 133, 4901–4911.
 - 16) Coudreuse, D.Y. & Korswagen, H.C. (2007) *Development*, 134, 3–12.

高田 律子

(自然科学研究機構

岡崎統合バイオサイエンスセンター)

Functional significance of lipid modification of secreted signaling proteins

Ritsuko Takada (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences, 5-1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan)