

Fringe : A Glycosyltransferase That Modulates Notch Signaling

Fringe は Notch シグナルを調節する糖転移酵素である

Haltiwanger, Robert S.

Department of Biochemistry and Cell Biology, Institute for Cell and Developmental Biology, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, NY 11794-5215, USA, FAX : 1-631-632-8575, E-mail: Robert.Haltiwanger@SUNYSB.EDU

Key Words : *fringe, glycosyltransferase, notch, O-fucose, signal transduction*

Abstract

The Notch protein is a cell surface receptor that plays a key role in a number of developmental cascades. Its extracellular domain is composed of 36 tandem epidermal growth factor-like repeats, and recent work has demonstrated that many of these repeats are modified with two unusual forms of glycosylation: *O*-fucose and *O*-glucose. The large number of consensus sites for these types of glycosylation and the conservation of those sites across species suggest that the sugars play an important role in Notch function. A clue to the function of the *O*-fucose modifications was provided by the demonstration that the Fringe protein is a β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase that modifies the *O*-fucose residues on Notch. Fringe is a known modifier of Notch function, altering the response of the receptor to its ligands. These results provide a clear example of how alteration of a specific carbohydrate structure on a specific protein mediates a specific biological event.

A. Introduction

Cell surfaces display an extremely diverse array of complex carbohydrate structures linked to proteins and lipids. Since structural diversity provides biological information, many workers have proposed that cell surface carbohydrates are likely to play key roles in communication between cells and in signal transduction events. In recent years, several examples of how specific carbohydrate structures mediate specific biological events have been reported. One of the earliest examples was that of targeting lysosomal enzymes to lysosomes by mannose 6-phosphate (1). Other examples include modulation of interactions between molecules of NCAM by polysialic acid (2) and the recruitment of leukocytes to sites of inflammation by the carbohydrate-binding selectins (3). The generation of mice lacking specific glycosyltransferases or carbohydrate binding proteins is providing further clues to the function of specific carbohydrate modifications, as is analysis of diseases involving defects in glycosylation. Together these findings provide support for the earlier predictions that complex carbohydrates are involved in information transfer.

要約

Notchは、数々の発生過程で重要な役割を果たす細胞表面にある受容体タンパク質である。細胞外ドメインは、36個のEGF (epidermal growth factor) 様リピートから成り、各リピートは*O*-fucose と*O*-glucoseの糖修飾を受けていることが最近の研究で証明されている。このタイプの糖修飾を受けるコンセンサス配列が数多く認められること、及び、種を越えてコンセンサス配列が保存されることから、糖付加がNotchの機能において重要な役割を果たしていることが示唆されていた。Fringe タンパク質が、Notch の*O*-fucose 残基を修飾する 1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素であることが示され、*O*-fucose 修飾の機能解明への手がかりがもたらされた。Fringe はNotch 機能の修飾因子であり、リガンドに対する受容体の応答を変化させることが知られており、これらの結果は、特定のタンパク質上の糖鎖構造の変化が生物学的現象を司る明らかな実例となった。

A. はじめに

細胞表面は、タンパク質や脂質に結合した複合糖質の非常に多様な配列を呈示している。構造の多様性が生物学的情報を提供しているので、細胞表面の糖鎖が細胞間伝達や情報伝達において重要な役割を果たすだろうと多くの研究者達が提唱していた。近年、特異的な糖鎖構造が特異的生物学的現象を仲介するいくつかの例が報告された。最も最近の一例に、マンノースが6-リン酸化されたことにより、リゾゾームに選択的に輸送されるリゾゾームの酵素がある(1)。他にはポリシアル酸によるNCAMの分子間相互作用の変化(2)や、糖鎖-結合セレクトインによる炎症部位への白血球の浸潤など(3)がある。糖転移酵素や糖鎖結合タンパク質を欠損したマウスの産生は、糖鎖合成不全の病気の解析と同様に、さらなる特異的な糖鎖修飾の機能解析への手がかりを与えている。これらの事実は、複合糖質が情報伝達に關与しているという初期の予測を支持するものである。

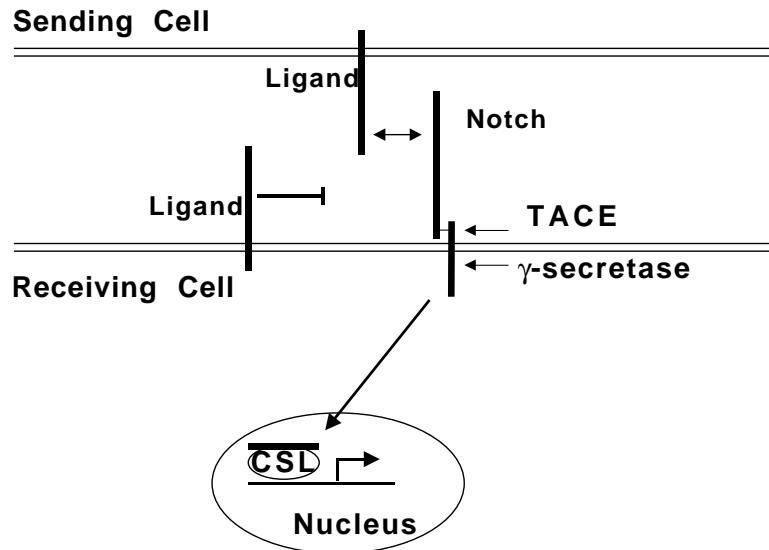


Fig. 1. Model of Notch activation. Ligand (Delta/Serrate/Jagged family) on the sending cell binds to and activates Notch on the receiving cell. Ligand binding activates the extracellular protease TACE (7, 8), followed by activation of the intracellular protease γ -secretase (9). The released cytoplasmic domain of Notch then translocates to the nucleus where it interacts with members of the CSL-family of transcriptional regulators (6). Ligand expressed in the same cell as Notch can exert an inhibitory effect on Notch activation known as cell autonomous inhibition (10).

B. Notch Signaling

Recent work on the Notch receptor has provided a clear example of how specific carbohydrate modifications can modulate specific biological events. The *Notch* locus was originally identified in mutant screens of *Drosophila* conducted early in the 20th century as an X-linked lethal mutation, in which the female flies have a notch in their wing, giving rise to the name for the mutation (4). The gene disrupted in the mutation was identified in 1985, and the protein encoded was revealed to be a large (>300 kD) transmembrane receptor (5). *Notch* homologues have been identified in all metazoans, and mammals have four *Notch* genes (6). *Notch* functions in numerous developmental cascades, playing a key role in cell fate decisions, most prominently in a process known as lateral specification (6).

Notch mediates its effects in development as a signaling receptor that becomes activated upon binding to ligands. The ligands are also transmembrane proteins, so signaling only occurs between adjacent cells. *Drosophila* Notch has two ligands: Delta and Serrate. Multiple homologues for each have been identified in mammalian systems (6). Binding of ligand to Notch initiates a series of proteolytic events resulting in transcriptional activation of a number of downstream gene products (Fig. 1). Ligand binding activates the extracellular protease TACE (TNF α converting enzyme), resulting in a proteolytic cleavage of Notch just external to the membrane (7, 8). This is followed by a second proteolytic cleavage at a site just inside the membrane, cata-

B. Notchシグナル

Notch受容体の最近の研究は、特異的糖鎖修飾がどのようにして生物学的現象を変化させるかの明らかな実例を示してきた。もともと*Notch*は、キイロショウジョウバエの変異体のスクリーニングから、翅に*notch*(刻み目)があるメス蠅のX染色体上の致死遺伝子として20世紀初期に同定された(4)。1985年に同定された変異遺伝子にコードされたタンパク質は分子量300kD以上の大きな膜貫通受容体であった(5)。Notchのホモログは全ての後生動物で同定され、哺乳類では4つの遺伝子がある(6)。多くの発生過程において、Notchは細胞の運命決定、特に側方特異化 lateral specificationとして知られる過程において、重要な役割を果たしている(6)。

Notchは、発生過程でリガンドに結合することにより活性化される情報伝達受容体として働いている。リガンドもまた膜貫通タンパク質で、情報伝達は隣り合う細胞間でのみおこる。キイロショウジョウバエの*Notch*はDeltaとSerrateの2つのリガンドを持ち、哺乳類ではそれぞれ複数のホモログが同定されている。Notchへのリガンドの結合により、一連のタンパク質分解反応が引き起され、多くの下流遺伝子の転写が活性化される(図1)。リガンドの結合によって、細胞外プロテアーゼTACE (TNF α 変換酵素)が活性化され、ちょうどその膜の外側にあるNotchタンパク質が分割される(7, 8)。これに伴い、ちょうどその膜の内側の部位で -セクレターゼによりNotchタンパク質の二次分割

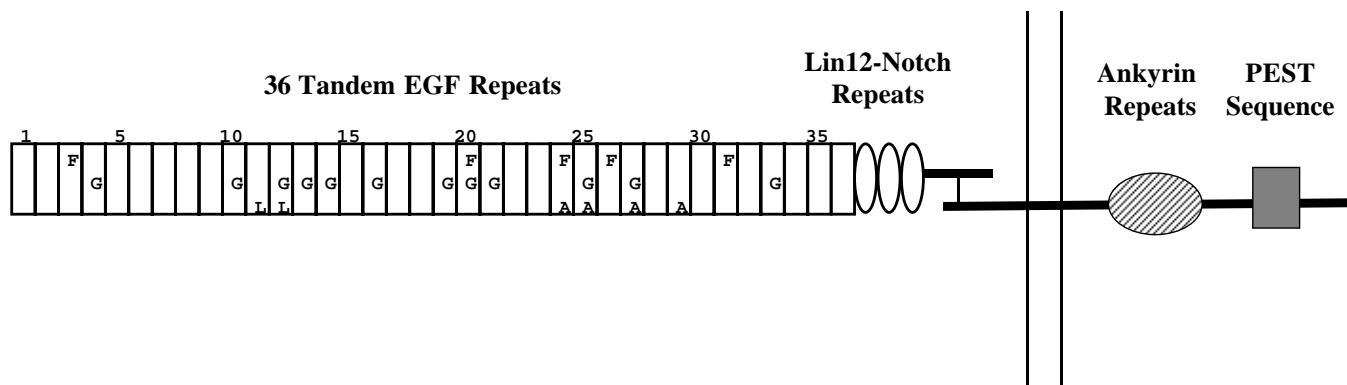


Fig. 2. Domain structure of Notch. The cell surface form of Notch exists as a heterodimer consisting of an extracellular domain tethered to the transmembrane/intracellular domain by disulfide linkages. The extracellular domain contains 36 tandem EGF repeats and three Lin12-Notch repeats. The intracellular domain contains ankyrin repeats that are required for interactions with the CSL transcriptional regulators (6) and a PEST sequence. The EGF repeats are numbered beginning at the amino terminus. EGF repeats containing a conserved *O*-fucose site contain an “F” (24), those with a conserved *O*-glucose site contain a “G” (18), those involved in ligand binding contain an “L” (12), and those containing N^{Ax} mutations contain an “A” (13).

lyzed by γ -secretase (9). The released cytoplasmic domain of Notch then translocates to the nucleus where it binds to a member of the CSL (CBF/Suppressor of hairless/ LAG-1) family of transcriptional regulators, resulting in transcriptional activation of target genes such as *Wingless* (6). Interestingly, ligand expressed in the same cell as Notch can lead to inhibition of signaling from an adjacent cell (10). The mechanism of this cell autonomous inhibition by ligand is unknown.

The Notch protein is synthesized as a single polypeptide chain that becomes proteolytically processed as it moves through the Golgi apparatus to generate a hetero-dimer wherein the extracellular domain remains tethered to the transmembrane/intracellular domain by disulfide bonds (Fig. 2). This form of the protein moves to the cell surface and is believed to be the active form for ligand binding, although recent work suggests that in some contexts the 300 kD uncleaved form can function at the cell surface (11). The extracellular domain of the Notch protein contains 36 tandem epidermal growth factor-like (EGF) repeats, as well as three Lin12/Notch repeats. EGF repeats 11 and 12 are known to be necessary and sufficient for ligand binding (12). Involvement of several other EGF repeats in Notch function has been revealed by a class of missense mutations called *Abruptex* (N^{Ax}) (13). These mutations occur in EGF repeats 24–29 and result in hyperactivatable forms of Notch. Although the mechanism of how they affect Notch signaling is not known, recent work suggests the N^{Ax} mutations may function by relieving cell autonomous inhibition by ligands (10).

C. *O*-Fucose and *O*-Glucose Modification of EGF Repeats

Several years ago two unusual forms of *O*-linked carbohydrate modification were reported to exist on EGF repeats. Urinary-type plasminogen activator was the first protein reported

がおこる(9)。遊離したNotchの細胞質内のドメインは核へ移動し、転写制御因子のCSL (CBF/Suppressor of hairless/LAG-1) ファミリーの一員と結合し、*Wingless*と類似した標的遺伝子の転写活性化を引き起こす。興味深いことに、リガンドはNotchが隣接した細胞からの情報伝達を阻止することができる同じ細胞で発現していた。リガンドによる細胞自律的な阻止機構はよく分かっていない。

Notchタンパク質は、単ポリペプチド鎖として合成され、ゴルジ装置通過時にタンパク質分解修飾を受け、細胞外ドメインと膜貫通/細胞内ドメインがジスルフィド結合によって結合しているヘテロダイマーとなる(図2)。最近の研究では300kDの非修飾の分子が細胞表面で機能すること示唆されているが、上述の構造で細胞表面へ輸送され、リガンドと結合する活性化型になると信じられている(11)。Notchタンパク質の細胞外ドメインは、Lin12/Notch リピートと36個のEGF様リピートを含み、EGFリピートの11と12が、必要かつ十分なリガンド結部位であることが知られている(11)。Notch機能における他のEGFリピートの関与は*Abruptex* (N^{Ax})と呼ばれるミスセンス変異体により明らかにされてきている(13)。これらの変異はEGFリピート24~29で起こっており、Notchの過剰な活性化が引き起こされる。 N^{Ax} 変異のNotchシグナリングに対する影響の機構は解明されていないが、これらの変異がリガンドによる細胞自律的抑制の軽減を引き起こすことが、最近の研究で示唆された。

C. EGFリピート上の*O*-fucoseと*O*-glucose修飾

数年前、二つの*O*-リンクの糖鎖修飾のめずらしい型がEGFリピート上にあることが報告された。尿型のプラスミノゲン

to bear an *O*-fucose modification on its EGF repeat (14), followed by tissue-type plasminogen activator and several clotting factors (15). Most of these proteins were modified with the simple monosaccharide L-fucose, but factor IX was shown to be modified with the tetrasaccharide NeuNAc- α 2,6-Gal- β 1,4-GlcNAc- β 1,3-Fuc (16). Further analysis revealed that several of the proteins also bore an *O*-glucose modification on their EGF repeat. The *O*-glucose was found to be extended with one or two α 1,3-linked xylose residues (15). Comparison of the sequences surrounding these modifications revealed putative consensus sequences for both *O*-fucose and *O*-glucose addition (15). For *O*-fucose, the consensus sequence is C_2 -X-X-G-G-S/T- C_3 , where S/T is the modified amino acid, X can be any amino acid, and C_2 and C_3 are the second and third conserved cysteines in the EGF repeat, respectively. Likewise, the *O*-glucose consensus sequence is C_1 -X-S-X-P- C_2 .

D. Modification of Notch with *O*-Fucose and *O*-Glucose

Database searches using the putative consensus sequences for *O*-fucose and *O*-glucose reveals a large number of proteins that are predicted to bear these modifications, including Notch (15, 17). The Notch receptor contains more of these sites than any other protein in the database (18) (Fig. 2). The fact that many proteins containing multiple EGF repeats contain no consensus sites for *O*-fucose or *O*-glucose and that many of the *O*-fucose and *O*-glucose sites on Notch are conserved across species suggested that these sites may play an important role in Notch biology. To determine whether the Notch protein was modified with these sugars, we examined the glycosylation of Notch in Chinese hamster ovary (CHO) cells (18). We demonstrated that CHO cells express Notch1 endogenously, and using standard metabolic radiolabeling techniques, that Notch1 is modified with both *O*-fucose and *O*-glucose saccharides. The major form of *O*-fucose on Notch1 is the monosaccharide *O*-fucose, although a small amount of tetrasaccharide, NeuNAc- α 2,3-Gal- β 1,4-GlcNAc- β 1,3-Fuc, was also detected. The major form of *O*-glucose on Notch1 was a trisaccharide, presumably the same as that reported on other proteins: Xyl- α 1,3-Xyl- α 1,3-Glc. A smaller amount of the *O*-glucose monosaccharide was also found. These results clearly demonstrated that the putative consensus sites for *O*-fucose and *O*-glucose addition to proteins can be used to accurately predict whether a protein will be modified with these sugars.

E. Fringe Provides a Clue to the Function of *O*-Fucose on Notch

Although the large number and conservation of the *O*-fucose and *O*-glucose sites on the Notch protein suggested they may play a key role in the biology of the protein, the function of the modifications was unknown. A major clue to the role of the

活性化因子は、EGFリピート上に*O*-fucose修飾を持つ最初に報告されたタンパク質であり(14)、続いて、組織型のプラスミノーゲン活性化因子やいくつかの血液凝固因子などが報告された(15)。これらのタンパク質の大半は単糖L-fucoseで修飾されているが、IX因子は四糖NeuNAc- 2,6-Gal- 1,4-GlcNAc- 1,3-Fucで修飾されていることが示されている(16)。さらなる解析から、その*O*-glucoseには、1,3結合で、一つか二つのキシロースが結合していることも明らかにされた。これらの修飾の近傍の配列を比較したところ、*O*-fucoseと*O*-glucoseの付加のためのコンセンサス配列が見い出された(15)。*O*-fucose付加のためのコンセンサス配列は C_2 -X-X-G-G-S/T- C_3 で、S/Tは修飾されるアミノ酸、Xはどのアミノ酸でも可、 C_2 と C_3 はそれぞれEGFリピートの二番目と三番目の保存されたシステインである。同様に、*O*-glucoseのコンセンサス配列は C_1 -X-S-X-P- C_2 である。

D. Notch上の*O*-fucoseと*O*-glucose修飾

O-fucose修飾と*O*-glucose修飾のコンセンサス配列を用いてデータベースを検索すると、Notchを含む、修飾受けると予測される膨大な数のタンパク質が見い出される。Notch受容体は、データベースのどのタンパク質よりもこれらの修飾サイトの数が多い(18)(図2)。複数のEGFリピートを含んでいるタンパク質の多くは、*O*-fucoseや*O*-glucose修飾のコンセンサス部位を含んでいないこと、また、Notchの*O*-fucoseや*O*-glucose修飾部位の多くが種を越えて保存されている事実から、これらの修飾部位がNotchの生物学で重要な役割を果たすと考えられている。Notchタンパク質がこれらの糖で修飾されているかを明らかにするため、我々はCHO(Chinese hamster ovary)細胞のNotchタンパク質の糖鎖構造を決定した(18)。通常のメタボリックラベル法により、CHO細胞がNotch 1を内因的に発現しており、Notch 1は*O*-fucoseと*O*-glucoseで修飾されていることを示した。Notch 1における*O*-fucose修飾の主なものは単糖、*O*-fucoseであるが、少量の四糖付加の構造、NeuNAc- 2,3-Gal- 1,4-GlcNAc- 1,3-Fucも検出された。Notch1における*O*-glucose修飾の主な形体は三糖で、おそらく他のタンパク質で報告されたXyl- 1,3-Xyl- 1,3-Glcと同じである。*O*-glucoseの単糖もまた、少量ではあるが見い出されている。これらの結果は、*O*-fucoseと*O*-glucose付加のための推定上のコンセンサス配列を、タンパク質がこれらの糖で修飾されるか否かを正確に予測するために用いることができることを明らかに示している。

E. FringeがNotchタンパク質上の*O*-fucose機能解明への手がかりとなった

Notchタンパク質上の*O*-fucoseと*O*-glucose部位の数の多さと保存されている様子は、それらがNotchタンパク質の生物学において重要な役割をしている事を示唆してはいるが、糖修飾の機能は分かっていた。Notch修飾の役割解明への主な手がかり

O-fucose modifications came from the discovery of a modifier of Notch function: Fringe. *Fringe* was first reported in 1994 as a gene involved in dorsal/ventral boundary formation in *Drosophila* wings (19). Subsequent work showed that *Fringe* functions as a modifier of Notch activity (20–22). In these studies, *Fringe* was shown to potentiate signaling from Delta while inhibiting signaling from Serrate. In addition, the authors demonstrated that *Fringe* must be expressed in the same cell as Notch in order to exert its effects on Notch signaling. Since *Fringe* was predicted to be a secreted protein, this observation prompted the investigators to propose that *Fringe* functions by either directly binding to Notch or as an enzyme, modifying Notch in some way. A separate report appeared at approximately the same time showing that *Fringe* has weak homology to a class of bacterial galactosyltransferases (23). The combination of these observations led us to hypothesize that *Fringe* altered Notch function by altering either the *O*-fucose or *O*-glucose saccharides on the Notch protein (18, 24).

To test this hypothesis we took two approaches. The first was a direct *in vitro* assay of glycosyltransferase activity of expressed *Fringe* protein. Since *Fringe* showed homology to galactosyltransferases, we and others attempted to perform *in vitro* galactosyltransferase assays using UDP-³H]galactose as donor and a variety of acceptors. None of these assays revealed enzymatic activity for *Fringe*. The second approach was less biased. We reasoned that if *Fringe* were modifying the *O*-fucose or *O*-glucose saccharides on Notch, we should be able to detect a change in the structures on Notch after transfection of *Fringe* into CHO cells. There are three known homologues of *Drosophila* *Fringe* in mammals: Manic Fringe, Lunatic Fringe and Radical Fringe (25, 26). Using CHO cells stably transfected with Manic Fringe or a control vector (generously provided by our collaborators, Drs. Tom Vogt and Pamela Stanley) we examined both the *O*-fucose and *O*-glucose saccharides on Notch1 using the same techniques we had used previously (18). No change in *O*-glucose structures was observed, but a significant increase in the level of the tetrasaccharide NeuNAc- α 2,3-Gal- β 1,4-GlcNAc- β 1,3-Fuc, the trisaccharide Gal- β 1,4-GlcNAc- β 1,3-Fuc, and the disaccharide GlcNAc- β 1,3-Fuc (all relative to the monosaccharide) were seen (24). These results suggested that Manic Fringe was causing elongation of the *O*-fucose saccharides on Notch1.

F. Fringe is a Fucose-Specific β 1,3-N-Acetylglucosaminyl-Transferase

The simplest explanation for the Manic Fringe-induced elongation of *O*-fucose on Notch1 was that Manic Fringe was catalyzing the transfer of a β 1,3-linked *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) to *O*-fucose. To test this possibility, we performed *in vitro* GlcNAc transferase assays using UDP-³H]GlcNAc as the donor and fucose in several contexts as the acceptor. As the

かりは、Notch機能の修飾因子：Fringeの発見による。Fringeは1994年に、キロショウジョウバエの翅の背側と腹側の境界形成に関与している遺伝子として初めて報告された(19)。これに引き続いて、Notch活性の修飾因子としてのFringeの機能が示された(20–22)。これらの研究で、FringeはDeltaからのシグナルを増強し、一方でSerrateからのシグナルを抑制することが示された。加えて、我々は、FringeはNotchシグナルに影響をおよぼすためにNotchと同じ細胞に発現しているはずであることを示した。Fringeは分泌タンパクであると予測されていたので、Fringeが、直接Notchに結合して機能するか、あるいは、酵素としてなんらかの方法でNotchを修飾し機能すると提唱されていた。Fringeが細菌のガラクトース転移酵素に対し、わずかに相同性を示すという報告がほぼ同時期になされた(23)。これらの知見を合わせ、我々は、FringeがNotchタンパク質上の*O*-fucoseか*O*-glucoseのどちらかを変化させることによって、Notchの機能を変えているという仮説をたてた。

この仮説を試すために、我々は二方向からのアプローチを取った。まず一つは、Fringeタンパク質を発現させ、糖転移酵素活性の測定を*in vitro*で行った。Fringeがガラクトース転移酵素に相同性を示すので、我々や他の研究者らは、ドナー基質としてのUDP-³H]ガラクトースと、様々なアクセプター基質を用いてガラクトース転移酵素活性の検出を*in vitro*で試みた。しかし、Fringeのガラクトース転移酵素活性は検出できなかった。第二のアプローチはよりもっともなものであった。もしFringeがNotch上の*O*-fucoseや*O*-glucoseを修飾していれば、CHO細胞にFringeをトランスフェクションした後、Notch上の糖鎖構造の変化が検出できるだろう。哺乳動物におけるキロショウジョウバエFringeのホモログは、Manic Fringe, Lunatic Fringe, Radical Fringeの3つがある(25, 26)。Manic Fringeがコントロールベクターを安定に発現させたCHO細胞(共同研究者、Drs. Tom VogtとPamela Stanleyから供与された)を使って、Notch上の*O*-fucoseと*O*-glucoseの糖鎖構造を、以前と同じ手法で調べた(18)。*O*-glucose構造の変化は全く認められなかったが、四糖のNeuNAc-2,3-Gal-1,4-GlcNAc-1,3-Fuc、三糖のGal-1,4-GlcNAc-1,3-Fuc、二糖のGlcNAc-1,3-Fuc(全て単糖と関係ある)の発現レベルには顕著な増加が認められた(24)。これらの結果からManic FringeがNotchの*O*-fucose糖鎖の伸長を引き起こすことが考えられた。

F. Fringeは、*O*-fucose 特異的 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素である

Manic Fringeが*O*-fucoseに β 1,3結合でN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を転移すれば、Manic FringeがNotchの*O*-fucose糖鎖を伸長することを最も簡単に説明できる。この可能性を試すため、我々はUDP-³H]N-アセチルグルコサミンをドナー基質とし、様々なフコースをアクセプター基質として、*in vitro*でN-ア

source of enzyme, we used purified, overexpressed *Drosophila* Fringe (generously provided by our collaborator, Dr. Ken Irvine) and both Manic and Lunatic Fringe (generously provided by our collaborator, Dr. Tom Vogt). We found that all three of these proteins catalyzed the transfer of [³H]GlcNAc from UDP to fucose (24). Product analysis demonstrated that the linkage formed was β1,3, indicating that all three Fringe proteins are β1,3 GlcNAc transferases. No transfer of GlcNAc was detected when other sugars were used as acceptor substrate (*e.g.* galactose or glucose), and the activity was dependent on the presence of manganese. Moreover, no transfer from other nucleotide sugars (*e.g.* UDP-glucose, UDP-galactose, UDP-GalNAc) was detected. Fucose in *O*-linkage to serine on a properly folded EGF repeat from factor VII (generously provided by Dr. Yang Wang) was a much better substrate (nearly 1000-fold) than *p*-nitrophenyl-fucose, indicating that Fringe recognizes aspects of the EGF repeat itself. Very similar results were obtained by Bruckner and coworkers (27). Thus, the Fringe proteins are *O*-fucose specific β1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferases.

G. GlcNAc Transferase Activity of Fringe is Essential for Biological Function

To address the role of the GlcNAc transferase activity in the biological function of Fringe, two approaches were taken. The first involved analysis of Notch signaling in several glycosylation mutants of CHO cells, and the second was analysis of a Fringe mutation in flies. Cell-based Notch signaling assays have been performed in several cell types (28, 29), and such an assay was adapted to CHO cells by the laboratories of Drs. Tom Vogt and Pamela Stanley. In this assay, wild-type CHO cells (Pro-5) expressing endogenous Notch1 were co-cultured with L cells expressing the Notch ligand Jagged1 (a Serrate homologue). Notch activation by Jagged1 was assayed by means of a reporter plasmid in the Pro-5 cells. When the assay was performed in Pro-5 cells containing Manic Fringe, the predicted inhibition of Notch signaling was observed. Similar results were obtained in Lec1 cells (CHO cells that lack complex-type *N*-glycans due to a mutation in GlcNAc transferase I). These results indicated that Manic Fringe does not require the presence of complex-type *N*-glycans on Notch to mediate its effects. In contrast, Manic Fringe did not alter Notch signaling in Lec13 cells, which have a defect in GDP-fucose biosynthesis (30, 31). Interestingly, addition of fucose to the media partially restored the Manic Fringe effect. Since addition of fucose to the media can partially bypass the mutation in the Lec13 cells, these findings are consistent with a role of fucosylated glycoconjugates in Manic Fringe function.

The second approach was to mutate the conserved DxD motif in *Drosophila* Fringe and analyze the effect both *in vitro* and *in vivo*. Each of the Fringe proteins contains a DDD that is believed to correspond to the conserved DxD motif found in

セチルグルコサミン転移酵素活性の測定を行った。酵素源としては、過剰発現させたキイロショウジョウバエ Fringe(共同研究者、Dr. Ken Irvineが供与)、Manic Fringe、Lunatic Fringe(共同研究者、Dr. Tom Vogtが供与)を精製して用いた。我々は、これらの三つのタンパク全てがフコースにUDP由来の[³H] N-アセチルグルコサミンを転移させることを見出した(24)。生成物の分析から、結合様式は 1,3であること、三つのFringeタンパク全てが 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素であることが示された。アクセプター基質として他の糖(例えばガラクトースやグルコース)を用いた時、N-アセチルグルコサミンの転移は全く観察されず、活性はマンガンに依存した。さらに他の糖ヌクレオチド(例えばUDP-グルコース、UDP-ガラクトース、UDP-アセチルガラクトサミン)由来の転移も全く検出されなかった。ファクターVII由来の正確に折り畳まれたEGFリピート上のセリンにO-結合したフコース(Dr. Yang Wangより供与)は *p*-ニトロフェニルフコースよりも1000倍ほどよい基質であり、FringeがEGFリピートそのものを認識していることを示していた。類似した結果がBrucknerらにより得られている(27)。従って、Fringeタンパク質は*O*-fucose特異的 1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素である。

G. Fringeの 1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素活性は、生物学的機能に必須である

Fringeの生物学的機能におけるN-アセチルグルコサミン転移酵素活性の役割を明らかにするため、二つの方法が取られた。第一は、糖鎖形成不全のCHO変異株でのNotchシグナルの解析であり、第二は、ショウジョウバエのFringe変異体の解析であった。培養細胞レベルでのNotchシグナルの解析はいくつかの細胞種で行われてきたが(28, 29)、Drs. Tom VogtとPamela Stanleyの研究室のCHO細胞の系が適していた。この系は、内因性にNotch1が発現している野生型CHO細胞(Pro-5)と、NotchリガンドJagged1 (Serrateのホモログ)が発現しているL細胞を共培養する系である。Jagged1によるNotchの活性化は、Pro-5細胞のリポータープラスミドによって検出された。Manic Fringeを発現しているPro-5細胞を用いた場合、予測されるようなNotchシグナルの阻害が認められた。Lec1細胞(N-アセチルグルコサミン転移酵素Iの変異により複合型のNグリカンの欠損したCHO細胞)においても同様な結果が得られた。これらの結果は、Manic Fringeが修飾因子として働くために、Notch上に複合型のNグリカンは必要ではないことを示していた。対照的にManic Fringeは、GDP-フコース生合成の欠損があるLec13細胞のNotchシグナルを変化させなかった(30, 31)。興味深いことに、培地にフコースを加えると、部分的にManic Fringeの効果が修復した。培地にフコースを付加することでLec13細胞の変異の影響を部分的に逃れることができたので、これらの事実は、Manic Fringeの機能におけるフコシル化された複合糖質の役割と一致していた。

第二のアプローチとして、キイロショウジョウバエ FringeのDxDモチーフを変異させ、その効果を*in vitro*、及び、*in vivo*で解析した。Fringeタンパク質は、ほとんどの糖転移酵素で見い出され、保存されているDxDモチーフに相当するDDD配列を含

most glycosyltransferases (32). In collaboration with Dr. Ken Irvine's laboratory, this motif was mutated in *Drosophila Fringe* to DEE (₂₃₆DDD₂₃₈ to ₂₃₆DEE₂₃₈). As predicted, this mutation abolished the *in vitro* GlcNAc transferase activity of the protein. Dr. Irvine's laboratory then evaluated the same mutation *in vivo* using an ectopic expression assay in wing imaginal discs. They showed that the mutated protein was expressed at normal levels in the discs, but that it had no effect on Notch signaling from either Delta or Serrate. These results suggested that the β 1,3 GlcNAc transferase activity is essential for Fringe to mediate its biological effects *in vivo*. Similar results were shown in studies by other workers (27, 33).

H. Future Directions

The results described above clearly show that Fringe mediates its effects on Notch signaling by altering the *O*-fucose structures on Notch, but they raise the interesting question of how an alteration in sugar structure affects activation of the Notch protein. A number of potential mechanisms exist, several of which have been discussed (24). In the simplest model, the alteration in sugar structure could directly change the interaction of Notch with its ligands. Some preliminary data exist to support this hypothesis. Fringe appears to increase the binding of Delta to Notch in S2 cells (27), although the authors could not detect binding of Serrate to Notch in the same cells. In contrast, both Jagged1 (Serrate homologue) and Delta1 bind mammalian cells expressing Notch1, but coexpression of Lunatic Fringe has little or no effect on the binding (28). Further work is necessary to resolve these apparent discrepancies. Another potential mechanism is that Fringe could affect cell autonomous inhibition by ligand (Fig. 1). The fact that the N^{Ax} mutations cluster near several of the conserved *O*-fucose sites (Fig. 2) suggests that they may influence one another. In support of this possibility, recent work has suggested that the N^{Ax} mutations work through abrogation of cell autonomous inhibition of ligands (10). The fact that N^{Ax} mutations also appear to be refractory to Fringe adds further weight to the argument that N^{Ax} mutations and Fringe may be operating through the same pathways (10). Finally, it is possible that the alteration in sugar structure on Notch somehow effects the interaction between Notch and the extracellular protease TACE (Fig. 1). Any one of these mechanisms, or some combination thereof, may be responsible for the effects of Fringe on Notch, and future experiments are aimed at determining these mechanisms.

The fact that the change in *O*-fucose structures on the Notch protein alters its response to ligands provides a clear example for the role of carbohydrates in signal transduction events. A number of recent studies have also demonstrated a role for heparan sulfate proteoglycans in signaling pathways (34). These and other findings are bringing to fruition the hypotheses made several decades ago that cell surface carbohydrates will play

んでいる(32). Dr. Ken Irvine's研究室と共同研究を行い、キイロショウジョウバエ Fringeタンパク質のこのモチーフをDEE (₂₃₆DDD₂₃₈ から ₂₃₆DEE₂₃₈)に変異させた。予測したように、この変異が *in vitro*でのN-アセチルグルコサミン転移酵素活性を不活性化させた。Dr. Irvineの研究室では、さらに、翅の原基で異所的に同じ変異を持つタンパク質を発現させ、*in vivo*の解析を行った。変異タンパク質は翅の原基で正常なレベルの発現を示したが、DeltaやSerrateからのNotchシグナルへの効果は認められなかった。これらの結果は 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が、Fringeが *in vivo*で生物学活性を示すために必要であることを示唆していた。同様な結果は、他の研究者からも得られている(27, 33)。

H. 今後の方向性

上述の結果は、FringeがNotch上のO-fucose構造を変化させ、Notchシグナルを調節していることを明らかに示しているが、糖鎖構造の変化が、どのような機構でNotchタンパク質の活性化をもたらすかという興味深い疑問も新たに生じてきている。可能性のあるメカニズムが多数存在し、そのうちいくつかは議論されている(24)。単純なモデルにおいて、糖鎖構造を変化させ、Notchとリガンドとの相互作用を直接的に変化させることができた。いくつかの予備的なデータがこの仮定を支持している。S2細胞ではSerrateとNotchの結合を検出できなかったが、FringeはDeltaとNotchの結合をS2細胞で増加させているようである。対照的に、哺乳類の細胞では、Jagged1 (Serrateのホモログ)とDelta1の両方ともNotch1を発現している細胞に結合するが、Lunatic Fringeを共発現させても結合への影響は、ほとんど認められなかった。これらの明らかな矛盾を解決するためには、さらなる研究が必要である。その他の可能性のある機構は、Fringeがリガンドによる細胞自律的抑制に影響を及ぼせることである(図1)。いくつかの保存されたO-fucose部位(図2)近くの N^{Ax} 変異クラスターの解析から、それらは互いに影響するであろうと示唆されている。最近の研究で、 N^{Ax} 変異はリガンドの細胞自律的抑制を抑制するように働くことが示されこの可能性を支持している。 N^{Ax} 変異もまたFringe抵抗性となるようである事から、 N^{Ax} 変異とFringeが同じ経路で機能する可能性が重要なものとなってきている。最終的には、Notch上の糖鎖構造の変化は、Notchと細胞外プロテアーゼTACEとの相互作用になんらかの影響を与えることができる。これらのメカニズムのどんなものでも、あるいは、それについてのいくつかの組み合わせは、Notchに対するFringeの効果によるものであり、これからの実験はメカニズムを決定することを目標とするだろう。

Notchタンパク質上のO-fucose構造の変化がリガンドに対する応答を変えるという事実は、情報伝達における糖質の役割の明らかな例となっている。情報伝達経路でのヘパリン硫酸プロテオグリカンの役割も最近の多くの研究で示されている(34)。これらの、また、他の発見は、細胞表面の糖鎖は情報伝達で特異

specific roles in information transfer. We anticipate that the next few years will see an increasing number of examples of carbohydrates impacting signal transduction events.

的な役割を果たすだろうという、数十年来の仮説を証明した。我々はこれからの数年で、糖鎖の関わる情報伝達過程の例が、数多く報告されると予測している。

Acknowledgements

The author would like to thank Drs. Alison Berman, Fred Grau, Li Shao and James Trimmer for discussions and comments on this manuscript. Original work was supported by grants from Neose Technologies, Inc, the American Cancer Society (RPG -99-101-01-TBE), and from the National Institutes of Health (GM 61126).

創価大学 生命科学研究所 細胞生物部門
久松 光湖 記

References

1. Kornfeld, S. (1998) *J. Clin. Invest.* **101**, 1293–1295
2. Kiss, J.Z., and Rougon, G. (1997) *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**(5), 640–646
3. McEver, R.P. (1997) *Glycoconj. J.* **14**(5), 585–591
4. Moor, O.L. (1919) *Genetics* **4**, 252
5. Wharton, K.A., Johansen, K.M., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1985) *Cell* **43**, 567–581
6. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999) *Science* **284**, 770–776
7. Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., and Israel, A. (2000) *Mol. Cell* **5**(2), 207–216
8. Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Saxena, M.T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D.J., Ray, W.J., and Kopan, R. (2000) *Mol. Cell* **5**(2), 197–206
9. De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., Goate, A., and Kopan, R. (1999) *Nature* **398**, 518–522
10. De Celis, J.F., and Bray, S.J. (2000) *Development* **127**, 1291–1302
11. Bush, G., diSibio, G., Miyamoto, A., Denault, J.B., Leduc, R., and Weinmaster, G. (2001) *Dev. Biol.* **229**(2), 494–502
12. Rebay, I., Fleming, R.J., Fehon, R.G., Cherbas, L., Cherbas, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1991) *Cell* **67**, 687–699
13. Kelley, M.R., Kidd, S., Deutsch, W.A., and Young, M.W. (1987) *Cell* **51**, 539–548
14. Kentzer, E.J., Buko, A.M., Menon, G., and Sarin, V.K. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 401–406
15. Harris, R.J., and Spellman, M.W. (1993) *Glycobiology* **3**, 219–224
16. Harris, R.J., Van Halbeek, H., Glushka, J., Basa, L.J., Ling, V. T., Smith, K.J., and Spellman, M.W. (1993) *Biochemistry* **32**, 6539–6547
17. Moloney, D.J., and Haltiwanger, R.S. (1999) *Glycobiology* **9**, 679–687
18. Moloney, D.J., Shair, L., Lu, F.M., Xia, J., Locke, R., Matta, K.L., and Haltiwanger, R.S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 9604–9611
19. Irvine, K.D., and Wieschaus, E. (1994) *Cell* **79**, 595–606
20. Panin, V.M., Papayannopoulos, V., Wilson, R., and Irvine, K.D. (1997) *Nature* **387**, 908–912
21. Fleming, R.J., Gu, Y., and Hukriede, N.A. (1997) *Development* **124**, 2973–2981
22. Klein, T., and Arias, A.M. (1998) *Development* **125**, 2951–2962
23. Yuan, Y.P., Schultz, J., Mlodzik, M., and Bork, P. (1997) *Cell* **88**, 9–11
24. Moloney, D.J., Panin, V.M., Johnston, S.H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K.D., Haltiwanger, R.S., and Vogt, T. F. (2000) *Nature* **406**, 369–375
25. Johnston, S.H., Rauskolb, C., Wilson, R., Prabhakaran, B., Irvine, K.D., and Vogt, T.F. (1997) *Development* **124**, 2245–2254
26. Cohen, B., Bashirullah, A., Dagnino, L., Campbell, C., Fisher, W.W., Leow, C.C., Whiting, E., Ryan, D., Zinyk, D., Boulianne, G., Hui, C.C., Gallie, B., Phillips, R.A., Lipshitz, H.D., and Egan, S.E. (1997) *Nature Genet.* **16**, 283–288
27. Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H., and Cohen, S. (2000) *Nature* **406**, 411–415
28. Hicks, C., Johnston, S. H., DiSibio, G., Collazo, A., Vogt, T.F., and Weinmaster, G. (2000) *Nature Cell Biol.* **2**, 515–520
29. Lindsell, C.E., Shawber, C.J., Boulter, J., and Weinmaster, G. (1995) *Cell* **80**, 909–917
30. Ohyama, C., Smith, P.L., Angata, K., Fukuda, M. N., Lowe, J.B., and Fukuda, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 14582–14587
31. Sullivan, F.X., Kumar, R., Kriz, R., Stahl, M., Xu, G.Y., Rouse, J., Chang, X.J., Boodhoo, A., Potvin, B., and Cumming, D.A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 8193–8202
32. Wiggins, C.A.R., and Munro, S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7945–7950
33. Munro, S., and Freeman, M. (2000) *Curr. Biol.* **10**(14), 813–820
34. Perrimon, N., and Berfield, M. (2000) *Nature* **404**, 725–728

Received on March 20, 2001, accepted on April 9, 2001

Profile of the Author



Robert Haltiwanger

Biographical sketch for Dr. Robert S. Haltiwanger, Associate Professor of Biochemistry, State University of New York at Stony Brook:

Robert Haltiwanger received both his undergraduate degree (B.S. in Biology) in 1980 and his doctorate (Ph.D. in Biochemistry) in 1986 from Duke University. He did his doctoral work in the laboratory of Dr. Robert L. Hill on the purification and characterization of mammalian lectins. During this work he purified and characterized the mannose receptor from rat alveolar macrophages. He went on to do post-doctoral work with Dr. Gerald W. Hart at Johns Hopkins University School of Medicine. In Dr. Hart's laboratory he worked on the O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) modification. His major contribution was the purification and characterization of the enzyme responsible for addition of O-GlcNAc to proteins, the UDP-GlcNAc: polypeptide O-GlcNAc transferase. In 1992 he began his independent career as an assistant professor in the Department of Biochemistry and Cell Biology at the State University of New York at Stony Brook. There he has continued to work in unusual forms of protein O-glycosylation, including the O-GlcNAc, O-fucose and O-glucose modifications. He was promoted to associate professor in 1998.

He enjoys spending his free time with his wife, Kim, and their three children, Robby and Rachel (11 year old boy/girl twins) and Nathan (8 year old boy). They all enjoy traveling, reading, playing sports, and participating in activities at their local church.