主論文

# Mib1 は Snx18 を介した dynamin 2 の誘導を制御し Dll1 のエンドサイトーシスを促進して Notch シグナル活性化に寄与する

名古屋大学大学院　理学研究科　生命理学専攻

岡野　誠

目次

開始ページ

1. 要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3

2. 序論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4

3. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6

4. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 12

5. 材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 16

6. 謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 20

7. 参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 21

8. Figure legends・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 26

9. Figures・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 30

## 要旨

Notch シグナル伝達は個体の正常な発生や恒常性の維持を制御する重要なシグナル伝達の一つである。Notch 受容体は細胞膜上で Notch 細胞外ドメインと Notch 細胞内ドメインが会合したヘテロ二量体として存在し、Delta や Jagged 等のリガンドと結合した後、リガンドのエンドサイトーシスに伴って Notch 細胞外ドメインが乖離する。その後、Notch 細胞内ドメインは切断され核内に移行し、標的遺伝子を活性化する。Mind bomb1 (Mib1) はリガンドをユビキチン化しエンドサイトーシスを誘導して、Notch シグナル伝達を正に制御していることが報告されている。他方、Notch シグナル伝達は dynamin などのエンドサイトーシス因子によって厳密に制御されていることが報告されているが、Mib1 とエンドサイトーシス因子がどのように協調して Notch シグナル伝達活性化を制御しているかは不明な点が多い。本研究では Notch 細胞外ドメインタンパク質を用いて、Notch リガンドの一つである Delta-like1 (Dll1) 活性化における Mib1 とエンドサイトーシス因子の機能を解析した。

まず、Notch 細胞外ドメインの Dll1 への結合によって Mib1 のユビキチンリガーゼ活性が上昇し、Dll1 をユビキチン化することを明らかにした。更に Mib1 は Notch 細胞外ドメインと結合した Dll1 のエンドサイトーシスを誘導し、Dll1 への dynamin 2 の誘導を促進することが明らかとなった。次に、dynamin と相互作用し細胞膜に誘導することが知られている Snx18 が Notch シグナル伝達に寄与するか検討したところ、Snx18 は Notch 細胞外ドメインのエンドサイトーシスと Notch シグナル活性化を促進していることを新たに発見した。更に dynamin 2 と Snx18 の相互作用は Mib1 のユビキチンリガーゼ活性依存的に増加することを見出した。

これらの結果から、1) Dll1 が Notch 細胞外ドメインと結合すると Mib1 のユビキチンリガーゼ活性が上昇し Dll1 をユビキチン化する。2) Mib1 のユビキチンリガーゼ活性依存的に Snx18 を介して Dll1 へ dynamin 2 を誘導する。3) dynamin 2 の結合により Dll1 のエンドサイトーシスが促進し、Dll1 と結合する Notch 細胞外ドメインの乖離による Notch シグナルの活性化を促す、というモデルを提唱する。

## 序論

Notch シグナル伝達は進化的に非常によく保存されたシグナル伝達経路で個体の発生や恒常性の維持に重要な機能を持つ(Harper *et al.* 2003; Guruharsha *et al.* 2012)。Notch 受容体は、細胞膜上に細胞外ドメインと細胞内ドメインが会合したヘテロ二量体として存在し、Delta や Jagged 等のリガンドと Notch 細胞外ドメインが結合する。次に Notch 受容体の細胞内ドメインが切り離されて遊離し、Notch 細胞内ドメインが核内に移行して標的遺伝子を活性化する(Kopan 2012)。さらに Notch シグナル伝達は様々なタンパク質によって厳密に制御していることが報告されている(Schweisguth 2004; Bray 2006; Ishitani *et al.* 2010)。

Notch シグナル伝達は隣接細胞のリガンドが Notch 受容体に結合することによって開始されるが、リガンドと Notch 細胞外ドメインとの結合だけではシグナルは活性化されず、リガンドのエンドサイトーシスが Notch シグナル活性化に必要であることが明らかとなっている(Parks *et al.* 2000; Overstreet *et al.* 2004; Wang & Struhl 2004; Nichols *et al.* 2007; Hansson *et al.* 2010)。さらにリガンドは E3 ユビキチンリガーゼである Neuralized (Neur) や Mind bomb (Mib)にユビキチン化されエンドサイトーシスを誘導することが報告されており(Parks *et al.* 2000; Overstreet *et al.* 2004; Wang & Struhl 2004; Nichols *et al.* 2007; Hansson *et al.* 2010)、モデル生物であるショウジョウバエでは Neur と Mib は相補的に働くが (Le Borgne *et al.* 2005b; Wang & Struhl 2005; Daskalaki *et al.* 2011)、脊椎動物では Mib1 のみ Notch シグナルの活性化に必要であることが明らかとなっている (Itoh *et al.* 2003; Koo *et al.* 2007)。

リガンドのユビキチン化は Notch シグナル活性化に関わるエンドサイトーシス経路において重要な役割を果たすと考えられている(Le Bras *et al.* 2011; Weinmaster & Fischer 2011; Musse *et al.* 2012)。Delta の哺乳類相同遺伝子である Delta-like1 (Dll1) がユビキチン化されるとユビキチン鎖と相互作用する epsin とユビキチン化された Dll1 が相互作用し、リガンドのエンドサイトーシスを促進させる。さらにエンドサイトーシスに伴って発生する牽引力が Notch 細胞外ドメインと Notch 細胞内ドメインを物理的に乖離させ、Notch 細胞内ドメインの切断を誘導すると考えられている(Nichols *et al.* 2007)。更にリガンドがエンドサイトーシスを介してリサイクリングされることによって、Notch 受容体と結合可能な活性型になるとの報告もある。このようにリガンドのユビキチン化はエンドサイトーシスにおいて重要な役割を持ち、ユビキチンリガーゼの活性は厳密に制御されている。しかしながら、Mib1 によるリガンドのユビキチン化を介した Notch シグナル活性のメカニズムは不明な点が多い。

Epsin や dynamin のようなエンドサイトーシス因子は Delta や Jagged のエンドサイトーシスに寄与し Notch シグナル活性化に必要であることが明らかとなっている(Parks *et al.* 2000; Overstreet *et al.* 2004; Wang & Struhl 2004)。Dll1 と epsin1 の複合体は細胞培養プレートに固定した Notch1 細胞外ドメインでは形成されるが、固定していない Notch1 細

胞外ドメインでは形成されないことが報告されており、epsin1 はユビキチン相互作用モチーフ (ubiquitin-interacting motifs, UIMs)を介してユビキチン化された Dll1 と相互作用する(Meloty-Kapella *et al.* 2012)。epsin は細胞膜上に局在しクラスリンを誘導してユビキチン化されたリガンドのエンドサイトーシスを促進する。更に Dynmain はエンドサイトーシス小胞を細胞膜から切り離す機能を持った GTPase であり、Delta や Jagged のエンドサイトーシスや Notch シグナルの活性化に必要である(Seugnet *et al.* 1997; McNiven 1998; Ferguson & De Camilli 2012)。dynamin の膜陥入部位への誘導は細胞膜からの切断時に増加し、他のエンドサイトーシス因子と同様に厳密に制御されている。BIN/amphiphysin/Rvs (BAR)ドメインは Sorting Nexin (Snx)ファミリーや amphiphysin または endophilin に存在し dynamin をクラスリン被覆ピットへ誘導する機能を持ち、dynamin の C 末端プロリン/アルギニンリッチドメイン(PRD)と BAR ドメインを持つタンパク質の Src homology 3 (SH3)を介して相互作用する。Dynamin の誘導は Delta や Jagged のエンドサイトーシスでも起こると考えられるが、どのように制御されているのか明らかになっていない。

本論文では Notch 発現細胞と Dll1 発現細胞の共培養系やヒト IgG, Fcγ断片が融合された Notch2 細胞外ドメインタンパク質に抗ヒト IgG, Fcγ抗体を加え反応させた複合体である clustered Notch2Fc を用いて、エンドサイトーシス因子である Snx18 や Dynamin と Dll1 が Mib1 によってどのように制御されているのか明らかにした。この Mib1 を介した制御メカニズムはリガンドが Notch シグナルを活性化するために重要である。

## 結果

### Notch シグナル伝達活性化は Dll1 発現細胞における Mib1 のユビキチンリガーゼ活性に依存する

E3 ユビキチンリガーゼである Mib1 は、Notch シグナル活性化において重要な正の制御因子であることが明らかになっているが(Itoh *et al.* 2003)、本論文では、まず Dll1 発現細胞による Notch シグナル活性化に Mib1 による Dll1 のユビキチン化が必要であるか検討した。Notch1 または Dll1 の安定発現株を用いた共培養系において、Dll1 発現細胞の Mib1 をノックダウンし共培養後 40 時間の Notch 発現細胞での Notch シグナル活性化を測定したところ、過去の報告と同様に活性の減少が見られた(Fig. 1A) (Song *et al.* 2008; Yoon *et al.* 2008)。次に Mib 1 のユビキチンリガーゼ活性が Dll1 による Notch シグナル活性化に必要か検討するために、Mib1 をノックダウンした Dll1 発現細胞に野生型の zebrafish Mib1 (zMib1)またはユビキチンリガーゼ活性のない C1001S 変異体を発現させ Notch1 発現細胞と共培養し Notch 発現細胞における Notch シグナル活性を測定した。その結果、野生型の zMib1 では Notch シグナル活性化のレスキューが見られたが、C1001S 変異体ではレスキューされなかった(Fig. 1B)。このことから Mib1 のユビキチンリガーゼ活性は Dll1 による Notch シグナル伝達活性化に寄与することが示唆された。更に過去の研究から *in vivo* では Mib1 の機能欠損によって細胞膜での Delta タンパク質の発現は減少しないことが報告されている(Itoh *et al.* 2003; Wang & Struhl 2005)。しかし、Notch 受容体との相互作用がない場合において Mib1 が Delta タンパク質の発現に寄与するか明らかになっていないため、Dll1 発現細胞の Mib1 をノックダウンし Dll1 の発現量を確認した。その結果 Mib1 をノックダウンしても全体または細胞膜表面上の Dll1 発現量は減少しなかった(Fig. 1A , C)。更に Notch 受容体との相互作用がない条件下では Dll1 のエンドサイトーシスに Mib1 は寄与しないことが明らかとなった(Fig. 1D)。

### Mib1 は Notch 細胞外ドメインの Delta 発現細胞へのトランスエンドサイトーシスに寄与する

次に Mib1 による Notch シグナル活性化の制御メカニズムを検討した。これまでの報告から隣接した Notch 発現細胞の Notch 細胞外ドメインと結合した Dll1 のエンドサイトーシス(すなわち Notch 細胞外ドメインのトランスエンドサイトーシス)に伴う牽引力の発生が、Notch 発現細胞での Notch シグナル活性化に必要であることが明らかになっている(Meloty-Kapella *et al.* 2012)。そこで Notch 細胞外ドメインの Dll1 発現細胞へのトランスエンドサイトーシスに Mib1 が寄与するか検討するために、培地中に Dextran Alexa488 を加えて Dll1 発現細胞に取り込まれた Dextran と Notch 細胞外ドメインの共局在を確認した。その結果、Dll1 発現細胞に control siRNA を導入した細胞では、Dextran Alexa488 と共局在した Notch 細胞外ドメインが観察され、隣接した Notch 発現細胞から

Notch 細胞外ドメインのトランスエンドサイトーシスが起こっていた(Fig. 2A, B)。しかし Mib1 をノックダウンした Dll1 発現細胞では、Notch 細胞外ドメインのトランスエンドサイトーシスはほとんど確認できなかった (Fig. 2A, B)。一方で、Dll1 発現細胞に取り込まれた Dextran の数は control siRNA または Mib1 siRNA でも変化しなかったことから一般的なエンドサイトーシス経路は Mib1 に寄与しないことが明らかになった(Fig. 2C)。これらのことから Mib1 は Notch 細胞外ドメインと Dll1 の結合もしくは Notch 細胞外ドメインのトランスエンドサイトーシスに伴った牽引力の発生に必要であることが示唆された。

**Dll1 発現細胞における Mib1 は隣接した Notch 発現細胞の Notch 細胞内ドメインの切断に必要である**

次に Dll1 発現細胞の Mib1 が、隣接した Notch 発現細胞における Notch 細胞内ドメインの切断に必要であるか検討した。Notch1 発現細胞と control siRNA を導入した Dll1 発現細胞を 1、6 または 24 時間共培養したところ、Notch 細胞内ドメインの切断産物である cleaved Notch1 の増加が検出できた (Fig. 2D)。Dll1-3T3 細胞の親細胞株である MIG-3T3 細胞では Jagged1 が弱く発現しているため、6 時間では cleaved Notch1 が僅かに増加し、24 時間では cleaved Notch1 の大きな増加が検出された(Fig. 2D)。他方、Mib1 をノックダウンした Dll1 発現細胞では、1 時間または 6 時間での cleaved Notch1 の増加が抑制されていた(Fig. 2D)。これらのことからリガンド発現細胞における Mib1 は隣接した Notch 発現細胞の Notch 受容体の細胞内ドメインを切断し遊離させるのに必要であることが示唆された。

**Notch 細胞外ドメインと Dll1 との結合は Mib1 依存的な Dll1 のユビキチン化を引き起こすが、Mib1 は Dll1 の Notch 細胞外ドメインへの結合能には寄与しない**

過去の報告から、Notch1 と Jagged1 の相互作用に Mib1 は寄与しないことが明らかとなっている (Hansson *et al.* 2010)。そこで Mib1 の機能欠損が Dll1 と Notch 受容体の結合に与える影響を、ヒト IgG, Fc γ 断片が融合された Notch2 細胞外ドメインタンパク質に抗ヒト IgG, Fc γ 抗体を加え反応させた複合体 (clustered Notch2Fc) を、Mib1 をノックダウンした Dll1 発現細胞に 4℃で加えて検討した。その結果、Mib1 のノックダウンを行った Dll1 発現細胞でも clustered Notch2Fc の結合が見られた(Fig. 3A, B)。このことから Mib1 による Dll1 のユビキチン化は Dll1 と Notch 受容体との結合に寄与しないことが示唆された。これまでに Notch1Fc を固定した細胞培養プレート上で Dll1 発現細胞を培養するとユビキチン化 Dll1 の増加が見られるが、Notch1Fc を固定せず培養液中に加えてもユビキチン化 Dll1 は増加しないことが報告されている (Meloty-Kapella *et al.* 2012)。そこで本論文では、clustered Notch2Fc を Dll1 発現細胞に 37℃で加え、Dll1 のユビキチン化が見られるか検討したところ、clustered Notch2Fc の刺激時間依存的に Dll1

のユビキチン化が誘導された (Fig. 3C)。更に Dll1 発現細胞の Mib1 をノックダウンして同様の実験を行ったところ、Dll1 のユビキチン化は顕著に減少した(Fig. 3D)。これらの結果から Mib1 は Notch 受容体と結合した Dll1 のユビキチン化を誘導することが示唆された。しかしながら Mib1 のユビキチンリガーゼ活性が、Notch 受容体と Dll1 の相互作用によってどのように制御されているか明らかでない。そこで Mib1 の自己ユビキチン化能が Dll1 発現細胞への clustered Notch2Fc の刺激によって変化するか検討した。Dll1 発現細胞に野生型 zMib1 またはユビキチンリガーゼ活性のない zMib1CS 変異体を導入し clustered Notch2Fc を刺激したところ、野生型 zMib1 ではユビキチン化が見られたが zMib1CS 変異体では見られなかった(Fig. 3E)。このことから、Dll1 への Notch 受容体の結合は Mib1 のユビキチンリガーゼ活性を上昇させ、Dll1 のユビキチン化を促進させることが示唆された。

**Mib1 は膜陥入構造形成後の Nothc2Fc の初期エンドソームへの輸送に必要である**

Dll1 のユビキチン化は Dll1 のエンドサイトーシスを促進させることが既に明らかとなっているため、clustered Notch2Fc が結合した Dll1 のエンドサイトーシスが Mib1 を必要とするか検討した。その結果、Dll1 は clustered Notch2Fc と共局在しており(Fig. S1)、control siRNA を導入した Dll1-3T3 細胞では共局在する Notch2Fc と EEA1 が見られ、clustered Notch2Fc の初期エンドソームへの輸送が見られた (Fig. 4A, B) 。しかし Mib1 をノックダウンした Dll1-3T3 細胞では clustered Notch2Fc と共局在している EEA1 は顕著に減少していた(Fig. 4A, B)。

EEA1 は初期エンドソームのマーカーであり、FYVE ドメインを介して初期エンドソームに局在している。Mib1 のノックダウンによる Notch2Fc と EEA1 の共局在の減少は、Dll1 の初期エンドソームへの輸送が阻害されているのではなく EEA1 の局在が変化している可能性も考えられる。そこで次に別の初期エンドソームのマーカーである Rab5 との共局在を検討した。これまでの研究から、多くの Rab5 ポジティブな小胞は EEA1 と共局在していることが報告されており、control siRNA を導入した Dll1 発現細胞ではこれまでの報告と同様に Rab5 は EEA1 と共局在しており、clustered Notch2Fc ともよく共局在が見られた。更に Mib1 をノックダウンした Dll1 発現細胞では Rab5 と clustered Notch2Fc の共局在は顕著に減少したが、Rab5 と EEA1 の共局在は変化しなかった(Fig. S2)。これらのことから Mib1 は clustered Notch2Fc と結合した Dll1 の初期エンドソームへの輸送に必要であることが明らかとなった。

次に Mib1 は Dll1 の細胞膜上からの内在化に寄与するかどうか、細胞膜上からの clustered Notch2Fc の取り込みを検討することで確認した。過去の研究より Notch1Fc の取り込みには epsin または actin の重合に依存しないことが報告されており(Meloty-Kapella *et al.* 2012)、その結果と同様に Mib1 をノックダウンした Dll1 発現細胞でも clustered Notch2Fc の細胞膜表面上からの内在化が見られた(Fig. 4C)。しかしながら、こ

れらのデータは clustered Notch2Fc が細胞膜から完全に取り込まれ小胞を形成しているとするには不十分である。エンドサイトーシス経路の順序は膜陥入後、被覆ピットの狭窄に伴って深く陥入し、細胞膜から切り離される。アクチンの制御機構が破綻した細胞では細胞膜上のビオチン化されたトランスフェリンは狭窄し深く陥入した被覆ピットに局在し、巨大な分子であるアビジンは到達できずビオチンと結合できないことが報告されている(Yarar *et al.* 2005)。本論文で行った clustered Notch2Fc の取り込みも、大きな分子であるペルオキシダーゼで標識した抗体を用いて clustered Notch2Fc を検出している。そのため、狭窄したピットに局在した Dll1 に結合した clustered Notch2Fc を、細胞膜から完全に切り離された小胞内に存在する clustered Notch2Fc と同様に検出できなかったと考えられる。これらのことから Mib1 は clustered Notch2Fc と結合した Dll1 のエンドサイトーシスにおいて膜陥入構造の形成と初期エンドソームへの輸送の間で機能することが示唆された。

**Mib1 は dynamin 2 の Dll1 への誘導に必要である**

これまでの研究からクラスリン依存的なエンドサイトーシスは Dll1 のシグナル伝達活性に重要な役割を果たすことが報告されている(Meloty-Kapella *et al.* 2012)。クラスリンが寄与するエンドサイトーシスでは細胞膜の陥入やクラスリン被覆の構築、細胞膜からの切断および融合など様々な段階が存在する(Kaksonen *et al.* 2006; McMahon & Boucrot 2011)。初期エンドソームへの輸送よりも前の段階で、dynamin は細胞膜からクラスリン被覆小胞切り離す機能を持つ。そこで、Dll1 と clustered Notch2Fc の結合後の dynamin 2 と Notch2Fc の共局在に Mib1 が寄与するか検討した。control siRNA を導入した Dll1 発現細胞に clustered Notch2Fc を添加すると、clustered Notch2Fc と dynamin 2 の共局在は添加後 10 分まで時間とともに増加した(Fig. 5A)。対照的に Mib1 のノックダウンは clustered Notch2Fc 添加後 2 分または 5 分での dyanmin 2 との共局在を減少させなかったが 10 分では減少させた (Fig. 5A)。更に近接した二種類のタンパク質のみを検出できる proximity ligation assay (PLA)を用いて clustered Notch2Fc 添加後に Dll1 へ dynamin 2 が誘導されるか検討した。Dll1 発現細胞にまず 4℃で 30 分 clustered Notch2Fc を加え洗浄した後、培地に交換し 37℃でインキュベートしエンドサイトーシスを開始させた。dynamin 2 は Dll1 を含む膜陥入部位にエンドサイトーシスの初期に誘導され、小胞が切り取られた後 dynamin 2 は小胞から遊離すると考えられる。control siRNA を導入した Dll1 発現細胞では Dll1 と dynamin の PLA シグナルは 37℃でのインキュベートから 5 分では増加し 20 分では減少していた(Fig. 5B, C)。Mib1 siRNA を導入した Dll1 発現細胞では Dll1 と dynamin 2 の PLA シグナルは、control siRNA を導入した細胞と比べて 37℃でのインキュベートから 5 分では減少したが 20 分では増加していた (Fig. 5B, C)。これらの結果から、Mib1 の機能欠損において Notch 細胞外ドメインのエンドサイトーシス初期段階

では、Dll1 を含む膜陥入部位への dynamin 2 の誘導が減少するが、後期では dynamin 2 と Dll1 を含む膜陥入部位の総量が増加することが考えられた。

**Dll1 発現細胞の Snx18 は Notch シグナル活性化に寄与する**

次に dynamin 2 の誘導に関わる因子が Notch シグナル活性化に寄与するか検討した。Dynamin の細胞膜への誘導は Snx ファミリーの一つである Snx18 のような BAR ドメインを持ったタンパク質によって促進されることが知られている (Lundmark & Carlsson 2004; Soulet *et al.* 2005; Shin *et al.* 2008; Park *et al.* 2010; van Weering *et al.* 2010; Ferguson & De Camilli 2012)。そこで Snx18 が高発現している NIH3T3 細胞を用いて Notch シグナル伝達における Snx18 の機能を解析した (Park *et al.* 2010)。Dll1 発現細胞における Snx18 をノックダウンし、Notch 発現細胞との共培養系を用いて Notch シグナル伝達活性を測定したところ、control siRNA を導入した細胞に比べてやや減少していた(Fig. 6A)。更に、*in vivo* において Snx18 が Notch シグナル伝達に寄与するか検討するために、ショウジョウバエにおける Snx18 の機能を確認した。脊椎動物では Snx ファミリーは三つの遺伝子が発見されているが、ショウジョウバエではホモログが SH3PX1 の一つしかない (Knaevelsrud *et al.* 2013)。そこで翅成虫原基における SH3PX1 の RNAi トランスジェニックラインを用いてノックダウンし、翅とその翅脈における表現型を観察した。その結果 SH3PX1 のノックダウンでは翅の辺縁部の支脈が広くなることが明らかとなった(Fig. 6B, arrowhead)。さらに過去の報告からこれらの表現型は Delta-Notch シグナル伝達の消失に関係していることが考えられ(Mummery-Widmer *et al.* 2009)、ショウジョウバエにおける Notch シグナル伝達に SH3PX1 が寄与し、Snx は Notch シグナル伝達に対して進化的に保存された機能を持っていることが明らかとなった。しかしながら、ショウジョウバエにおける SH3PX1 のノックダウンによる表現型は Mib1 のノックダウンによる表現型よりも弱かった(Fig. 6B)。これらの結果は Snx ファミリー以外の BAR ドメインを持ったタンパク質が dynamin 2 の誘導に寄与することを示唆している。また、Snx18 の機能は Notch シグナル伝達特異的ではなく、翅における SH3PX1 のノックダウンでは前横脈の消失も表現型として見られ、この表現型は Dpp シグナル伝達の阻害に起因する可能性がある(Fig. 6B, arrow) (Blair 2007)。これを裏付けるように過去の研究から Snx ファミリーの一つである Snx9 は Smad3 依存的な TGFβ シグナル伝達に寄与していることが報告されている(Wilkes *et al.* 2015)。

**Snx18 は clustered Notch2Fc に結合した Dll1 のエンドサイトーシスに寄与する**

次に私たちは Snx18 による Notch シグナル伝達の制御メカニズムがどのように行われているか検討した。まず Snx18 をノックダウンした Dll1 発現細胞を clustered Notch2Fc で刺激し、Dll1 と結合した Notch2Fc と EEA1 との共局在を確認した。その結果 clustered Notch2Fc 刺激 15 分後では、Snx18 siRNA を導入した Dll1 発現細胞において EEA1 と

clustered Notch2Fc の共局在の減少がみられた(Fig. 6C, D)。これらの結果から Notch2Fc によって誘導される Dll1 のエンドサイトーシスに Snx18 が寄与していることが明らかとなった。

Dll1 のシグナル伝達活性は Notch 細胞外ドメインとの結合後の Mib1 による Dll1 のユビキチン化に依存していることから、Dll1 による Notch シグナル伝達活性化において、Mib1 が Snx18 の機能にどのように寄与しているか検討した。近接した二種類のタンパク質のみを検出できる PLA を行い、Notch2Fc 刺激後の Dll1 への Snx18 の誘導が Mib1 のノックダウンによって変化するか検討した。Control siRNA を導入した Dll1 発現細胞において Dll1 と Snx18 の PLA シグナルは clustered Notch2Fc の刺激によって変化しなかった(Fig. 6E, F)。Mib1 のノックダウンにおける Dll1 と Snx18 の PLA シグナルは clustered Notch2Fc 刺激なしで僅かに増加したが、Notch2Fc 刺激後 5 分または 20 分で変化しなかった(Fig. 6E, F)。これらの結果から Mib1 は Dll1 と Snx18 の相互作用に寄与しないことが示唆された。

**Mib1 は dynamin 2 と Snx18 の相互作用に寄与し Dll1 へ dynamin 2 を誘導する**

Snx18 が Dll1 への dynamin 2 の誘導に寄与するか検討するために、Snx18 をノックダウンした Dll1 発現細胞に clustered Notch2Fc 刺激を行い、Dll1 への dynamin 2 の誘導について PLA を用いて確認した。Control siRNA を導入した Dll1 発現細胞では Dll1 と dynamin 2 の PLA シグナルは Notch2Fc 刺激後 5 分で増加したが、Snx18 のノックダウンではその増加が見られなかった(Fig. 7A, B)。このことから、Dll1 への dynamin 2 の誘導に Snx18 が寄与することが明らかとなった。

更に、Snx18 と dynamin 2 の相互作用に Mib1 が寄与するか検討した。共免疫沈降による内在性タンパク質の Snx18 と dynamin 2 の相互作用を検出することができなかったため、野生型 zMib1 またはユビキチンリガーゼ活性のない zMib1CS 変異体と外来性の dynamin 2 と Snx18 を HEK293T 細胞に同時に発現させ、Snx18 と共沈してくる dynamin 2 の量を検討した。その結果、野生型 zMib1 を導入した細胞では Snx18 と共沈してくる dynamin 2 の量の増加が見られたがユビキチンリガーゼ活性のない zMib1CS 変異体を導入した細胞では見られなかった(Fig. 7C)。分子量から判断してユビキチン化されていない dynamin 2 の Snx18 に対する共沈量が増加していたことから、dynamin 2 と Snx18 の相互作用は Mib1 を介したなんらかのユビキチン化された因子に依存することが示唆された。

## 考察

本研究では、clustered Notch2Fc を用いることによって Notch 受容体と Dll1 の結合によって誘導される Dll1 のエンドサイトーシスの分子メカニズムを解析した。本研究で得られた結果と過去の研究の報告を合わせて考察すると以下のモデルが考えられた。Notch-Dll1 の相互作用は Mib1 のユビキチンリガーゼ活性の活性化を促し、活性化された Mib1 は Dll1 のユビキチン化を誘導し、ユビキチン化された Dll1 と epsin が相互作用する。更に Mib1 は Snx18 と dynamin 2 の相互作用を促進して、Snx18 を介して Notch 受容体と結合した Dll1 の細胞膜陥入部位へ dynamin を誘導させる。Dll1 のエンドサイトーシスとそれに伴った Notch 細胞外ドメインの乖離を引き起こす (Fig. 7D)。この Mib1 を介した制御メカニズムはリガンドのシグナル伝達活性に重要な働きを担うことが明らかとなった。

### Mib1 を介した Dll1 のエンドサイトーシスは Dll1 のシグナル伝達活性に重要である

Delta や Jagged などのリガンドのエンドサイトーシスは隣接した細胞の Notch 受容体を活性化させることが既に明らかになっている(Parks *et al.* 2000; Nichols *et al.* 2007)。またこれまでにリガンドのエンドサイトーシスがどのように Notch シグナルを活性化させているのかいくつかのモデルが提唱されており(Le Borgne *et al.* 2005a; Musse *et al.* 2012)、更にリガンドのユビキチン化はリガンドのエンドサイトーシスに必要であることが明らかになっている(Itoh *et al.* 2003; Barsi *et al.* 2005; Lai *et al.* 2005; Koo *et al.* 2007; Yamamoto *et al.* 2010)。リガンドのエンドサイトーシスによる Notch シグナルの活性化には Notch ヘテロ二量体が乖離するのに必要な牽引力の発生やリガンドのリサイクリングによるリガンドの活性化及び Notch 受容体との結合能上昇などが考えられてきたが、その分子メカニズムは完全に明らかにされていなかった(Meloty-Kapella *et al.* 2012; Shah *et al.* 2012) 。本研究では Mib1 は Dll1 の細胞表面上での発現や Dll1 と Notch 受容体の結合や Notch 受容体非存在下での Dll1 のエンドサイトーシスには寄与せず、Notch 受容体と結合した Dll1 のエンドサイトーシスを制御していることを明らかにした。また、Notch 受容体がリガンドと相互作用した後、epsin によって特定のエンドサイトーシス経路が誘導され、リガンドがリサイクリングすることが報告されている(Wang & Struhl 2004)。Mib1 が Notch 受容体非存在下での Dll1 のエンドサイトーシスに寄与しなかったことから、Mib1 は epsin と共に Notch 受容体とリガンドの相互作用後、リガンドのリサイクリングに寄与する可能性がある。本研究では Mib1 の機能欠損は Notch 受容体と結合した Dll1 のエンドサイトーシスを阻害するため直接証明できなかったが、Mib1 は Dll4 のリサイクリングに必要であることがすでに報告されている(Shah *et al.* 2012)。更に本論文では、リガンドと Notch 受容体が相互作用することによって Mib1 のユビキチンリガーゼ活性が上昇すること、clustered Notch2Fc 刺激 5 分後の dynamin の

Dll1 への誘導は Mib1 の機能欠損により減少すること、リガンドと Notch 受容体の相互作用一時間後における Notch 細胞内ドメインの切断は Mib1 に依存することを示した。これらのことから、本研究によって隣接した Notch 発現細胞の Notch 受容体の切断に必要な牽引力の発生に Dll1 発現細胞での Mib1 が寄与し、Notch シグナル伝達を活性化していることを明らかにした。

**Notch リガンドのユビキチン化は様々な機構で Notch シグナル伝達を活性化する**

Notch 受容体のリガンドのユビキチン化は Notch シグナル活性化を制御していることがすでに報告されており (Le Bras *et al.* 2011; Weinmaster & Fischer 2011)、更に Delta や Jagged にはユビキチンリガーゼにユビキチン化されるリジン残基を複数持っていると考えられている。また Notch シグナル伝達における二つのユビキチンリガーゼファミリーである Neur と Mib1 はリガンドをユビキチン化し Notch シグナルを活性化することが明らかになっている(Deblandre *et al.* 2001; Lai *et al.* 2001; Pavlopoulos *et al.* 2001; Itoh *et al.* 2003)。本研究では Dll1 と Notch 細胞外ドメインの結合後 10 分以内に Dll1 の複数のサイトが Mib1 によってユビキチン化されることが明らかにした。更に Mib1 のユビキチンリガーゼ活性が Notch 受容体と Dll1 の結合後に活性化され、その後 Dll1 がユビキチン化されることを発見した。これらのことから、リガンドと Notch 受容体の相互作用によって活性化された Mib1 が Dll1 のエンドサイトーシスを促進することが考えられた。

Dll1 や Dll3 または Dll4 の細胞内ドメインにおけるアミノ酸の置換や欠損変異体の解析によって、細胞内ドメインのリジン残基は様々な機能を持ち、リガンドと Notch 受容体との相互作用や細胞膜への局在、トランスエンドサイトーシスまたはリサイクリングに必要であることが明らかになっている(Heuss *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2011; Shah *et al.* 2012)。Dll1 の細胞内ドメインのリジン残基 17 個全てに変異を導入した変異体は Notch 受容体と結合できない。更にリサイクリングや Notch 細胞外ドメインのトランスエンドサイトーシスが起こらず、Notch シグナル伝達を活性化できないことが報告されている (Heuss *et al.* 2008)。また、Dll1 の細胞内ドメインの 613 番目のリジン残基をアルギニンに置換した変異体では Notch 細胞外ドメインとの結合能が低下し、Notch シグナル伝達活性化能が減少するが、Dll1 のリサイクリングに変化はないことが明らかになっている (Zhang *et al.* 2011)。本研究で行った Mib1 のノックダウンでは Notch 細胞外ドメインのトランスエンドサイトーシスは減少するが、Dll1 の Notch 受容体への結合能は減少しなかった。そのため Mib1 は 613 番目以外のリジン残基をユビキチン化することが考えられる。Neur ファミリーは 613 番目のリジン残基をユビキチン化する可能性があるが、Neur1 と Neur2 の二重変異マウスでは表現型が見られず、哺乳類では Notch シグナル伝達において Neur は重要ではないことが明らかになっている(Koo *et al.* 2007)。今後それぞれのユビキチンリガーゼによって、Dll1 の様々なサイトで起こるユビキチン化が脊椎

動物における Notch シグナル伝達の活性化においてどのような機能を持っているのか、その分子メカニズムの解明が必要である。

**Mib1 は dynamin 2 の Dll1 の膜陥入部位への局在に寄与する**

Notch リガンドのシグナル伝達活性が clathrin や epsin、dynamin または actin などのエンドサイトーシスにおける機能に依存していることが明らかになっている(Seugnet *et al.* 1997; Overstreet *et al.* 2004; Wang & Struhl 2004; Meloty-Kapella *et al.* 2012)。更に E3 ユビキチンリガーゼである Mib1 はリガンド発現細胞において重要な役割を持っており、Notch リガンドのユビキチン化は epsin 依存的なエンドサイトーシスを引き起こす。その一方で Dll1 発現細胞への固定化されていない Notch1Fc による刺激は Dll1 と epsin1 の複合体の形成を促進しない。さらに Mib1 のノックダウンでは Dll1 と epsin1 の相互作用は完全には消失しないことが報告されている。これらのことは Dll1 と epsin1 の相互作用だけでなく他の制御機構が存在し、Mib1 を介した Notch シグナル伝達の活性化に寄与することを示唆している(Meloty-Kapella *et al.* 2012)。本論文では Dll1-Snx-dynamin 2 の相互作用に Mib1 が深く関わっていることを新たに明らかにした。

エンドサイトーシスの初期段階では Dynamin と他のエンドサイトーシス因子の相互作用が弱いため、クラスリン被覆ピットにおける dynamin の局在は少量であるが、エンドサイトーシスが進むと dynamin が誘導され、エンドサイトーシス小胞が細胞膜から切り離される(Taylor *et al.* 2011; Ferguson & De Camilli 2012)。この dynamin のクラスリン被覆ピットへの誘導は、dynamin の C 末端 PRD と結合する SH3 ドメインを持つエンドサイトーシス因子である Snx9/18/33 や amphiphysin または endophilin によって促進される(David *et al.* 1996; Ringstad *et al.* 1999; Lundmark & Carlsson 2004; Park *et al.* 2010)。しかし、dynamin とこれらのエンドサイトーシス因子の相互作用がどのように制御されているか、その詳細なメカニズムは明らかになっていなかった。

本研究によって、Snx18 と dynamin 2 の相互作用が、Mib1 によって促進される Dll1 のエンドサイトーシスの一端を制御していることを明らかとなった。また、Snx18 の機能欠損では Notch シグナル伝達活性が部分的にしか減少しなかったことから、Dynamin と相互作用する他の Snx ファミリーや amphiphysin または endophilin も同様の働きを持ち冗長的に機能していることが考えられる。事実、amphiphysin は Mib1 と相互作用することが明らかになっている(data not shown)。また、Mib1 のユビキチンリガーゼ活性依存的にユビキチン化されていない Snx18 と dynamin の相互作用を増強することから、いまだに明らかになっていないエンドサイトーシス因子が Mib1 によってユビキチン化され、Snx18 と dynamin 2 の相互作用を増強することで、Dll1 が局在する膜陥入部位への dynamin 2 の誘導を促進している可能性が考えられる。今後 Snx と dynamin 2 の相互作用が Mib1 によってどのように制御されているのか明らかにしていかなければならない。

本研究では、Notch リガンドの内在化にエンドサイトーシス因子の複合体形成における空間的または時間的な制御に、Notch リガンドやエンドサイトーシス因子に対する Mib1 の一過的なユビキチンリガーゼ活性が必要であることを示した。エンドサイトーシス因子に対する Mib1 の機能は、Notch シグナル伝達以外に Mib1 が関わる様々な生化学的な現象における膜タンパク質の取り込みにも起きている可能性がある。

## 材料と方法

### 使用した抗体

mouse anti-FLAG (M2, Sigma, CA, USA)、 rabbit anti-DDDDK-tag (MBL, Japan)、 rabbit anti-Myc (A14, Santa Cruz, USA)、 mouse anti-Myc (9E10, Wako, Japan)、 mouse anti-HA (Covance, USA)、 rabbit anti-HA (MBL, Y-11, Santa Cruz Biotechnology, Japan)、 hamster anti-Mib1 (Yamamoto *et al.* 2010)、 rabbit anti-Mib1 (M5948, Sigma-Aldrich, USA)、 hamster anti-Dll1 (HMD1-3, Biolegend, USA)、 rabbit anti-cleaved Notch1 (#2421, Cell Signaling Technology, USA)、 anti-Notch1 (mN1A, Biolegend, USA)、 anti-ubiquitin (P4D1, #3936, Cell Signaling Technology, USA)、 anti-tubulin (B-5-1-2, Sigma-Aldrich, USA)、 rabbit anti-GFP (MBL, Japan)、 mouse anti-GFP (GF200, Nacalai, Japan)、 anti-dynamin 2 (ab3457, Abcam, UK)、and anti-EEA1 (#2411, Cell Signaling Technology, USA)は一次抗体として使用した。 Peroxidase-AffiniPure goat anti-mouse、anti-Armenian hamster または anti-rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch)、 anti-mouse IgG Alexa488、 anti-Mouse IgG Alexa555、 anti-mouse IgG Dylight 649、anti-rabbit IgG Alexa647 は二次抗体として使用した。

### 使用した培養細胞および培地

Dll1-3T3 はレトロウィルスによってマウス Dll1 の C 末端に Flag tag をつけたものを NIH3T3 細胞に導入し取得した安定発現株である。また MIG-3T3 はレトロウィルスのベクターのみ導入したコントロール細胞である。Dll1-HeLa はマウス Dll1 の C 末端に Myc tag を付けたものを HeLa 細胞にトランスフェクションし取得した安定発現株である。 Dll1-3T3 zMib1WT または zMib1CS は QCXIN レトロウィルス発現システムを用いて野生型 zMib1 または zMib1C1001S を安定的に Dll1-3T3 細胞に発現させた細胞株である。 HA-Notch1-Neuro2a 細胞は Notch1 の細胞外ドメインに HA tag を付加し Neuro2a 細胞に導入し取得した安定発現株である。ルシフェラーゼアッセイにて使用した Lfng/Notch1-3T3 細胞は L-fringe と Notch1 を NIH3T3 に導入し取得した安定発現細胞株である。これらの細胞及び HEK293T 細胞は DMEM 10%FBS にて培養を行った。

siRNA によるノックダウン

siRNA は Sigma-Aldrich または日本バイオサービスから購入し、control siRNA は AllStars Negative control siRNA (QIAGEN)または SIC-001 (Sigma)を使用した。siRNA のトランスフェクションは RNAiMAX (Invitrogen, CA, USA)を用いて行い、トランスフェクションから 48 時間培養した。各 siRNA の配列は以下に示したものを使用した。

Mib1 siRNA#1: 5’-GGAUAAAGAUGGAGAUCGATT-3’、

Mib1 siRNA#2: 5’-GCAAAAUGUCAUAAGGAAATT-3’、

human Mib1 siRNA#1: 5’-GGAUAAAGAUGGUGAUAGATT-3

human Mib1 siRNA#1: 5’-GCAAAGUGUCAUAAGGAAATT-3’
mouse Snx18 siRNA#1: 5’-GCAUUCAAGACCGCUGUAATT-3’
mouse Snx18 siRNA#2: 5’-CCUUUGAGCUGGAUCAGCATT-3’

細胞の溶解及び共免疫沈降のウェスタンブロッティングによる検出

細胞は lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、1% Triton X-100、12.5 mM ß-glycerophosphate、10 mM NaF、2 mM DTT、10 mM N-ethylmaleimide、protease inhibitor cocktail)を使用し溶解して whole-cell extracts を取得した。その後、whole-cell extracts に抗体を加え 4℃でインキュベートし、更に protein G-sepharose (GE, United Kingdom)を加え 4℃でインキュベートした。ビーズを 0.1%または 1% Triton/PBS で洗った後 2x サンプルバッファー(125mM Tris-HCl pH6.8、4% SDS、10% glycerol、1% 2-mercaptoethanol、0.02% BPB)を加え 98℃でボイルしサンプルとした。免疫沈降産物または whole-cell extracts のサンプルを 7%または 10%の SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。その後、ゲルから Immobilon-P (EMD Milipore, Germany)に転写し、0.3%スキムミルク TBST でブロッキングし、一次抗体を 4℃で O/N インキュベートした。二次抗体には horseradish peroxidase で標識されたものを使用し発光させ、Ez-Capture MG (ATTO, Japan) を用いて画像を取得した。

共培養系による **cleaved Notch1** の検出

Dll1-3T3 細胞に control siRNA または Mib1 siRNA を導入し、その 48 時間後 HA-Notch1 を発現させた HEK293T 細胞を培地で剥がし Dll1-3T3 に添加し、37℃で 1、6 または 24 時間インキュベートした。その後培地を取り除き lysate を取得して、anti-cleaved Notch1 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い cleaved Notch1 を検出した。

ルシフェラーゼによる **Notch** シグナル伝達活性化の測定

Dll1-3T3 細胞には各 siRNA を導入し、Lfg/Notch1-3T3 には Notch 応答性ルシフェラーゼ発現プラスミドである pGL4.1-TP1-dELuc と補正用ベクターである pGL4.74[hRluc/TK]をトランスフェクションした。Dll1-3T3 を 0.53mM EDTA/PBS で剥がした後 Lfg/Notch1-3T3 に加え共培養した。Dual-luciferase reporter assay system (Promega, USA)のプロトコルに従って GLOMAX multi+で化学発光を検出した。

**Dll1-3T3** の細胞膜上の **Dll1** 発現量の検出

Dll1-3T3 に各 siRNA を導入し、48 時間後に hamster IgG anti-Dll1 抗体または hamster IgG (IgG1, k, A19-3; BD Bioscience, San Jose, CA, USA)を添加しインキュベートした。次にビオチン標識 anti-hamster IgG 抗体(eBioscience, CA, USA)と PE 標識ストレプトアビ

ジン(BD Biosciences)を加えた。その後 FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, CA, USA)と CellQuest software (BD Biosciences, CA, USA)を用いて解析を行った。

**Notch 細胞外ドメインのトランスエンドサイトーシスの検出**

HA-Notch1-Neuro2a 細胞と Dll1-HeLa 細胞を 20 時間共培養し、2mg/ml の Alexa488 dextran 10,000MW (Life Technologies, USA)を加えて 4 時間共培養を行った。その後 4% PFA を用いて細胞を固定し mouse anti-HA 抗体および rabbit anti-Myc (A14) 抗体で蛍光免疫染色を行った。

**clustered Notch2Fc の内在化の検出**

Notch2Fc 溶液に Mouse anti-Human IgG, Fcγ Fragment (Jackson immune research, USA)を加え、37℃で 30 分インキュベートし複合体を作らせた(clustered Notch2Fc)。この clustered Notch2Fc を Dll1-3T3 細胞に加え 4℃で 40 分インキュベートした後、HBSS buffer で洗い、すぐに細胞を 4%PFA で固定または培地に交換し 37℃で 20 分または 120 分インキュベートした後細胞を 4%PFA で固定した。POD 標識 anti-Mouse IgG を反応させて luminol の化学発光量を測定し、その後細胞の lysate を回収し BCA assay によってタンパク質量を測定した。得られた値を化学発光量を全タンパク質量で補正した後、インキュベート時間が 0 分の値から 120 分の値を引き Dll1-3T3 細胞内に内在化した Notch2Fc 量を求めた。

**ユビキチン化タンパク質の検出**

Dll1-3T3 細胞に clustered Notch2Fc を加え 37℃でインキュベートした後、whole-cell extracts を回収した。次に免疫沈降用の抗体と protein G-sepharose を加え 4℃でインキュベートした。1%Triton 0.1%SDS/PBS で 6 回洗った後、2x サンプルバッファーを加えボイルしサンプルとした。免疫沈降産物を anti-ubiquitin (P4D1)抗体用いてウェスタンブロッティングを行い、ユビキチン化タンパク質を検出した。

**Proximity ligation assay**

Dll1-3T3 細胞に 4℃で 40 分間 clustered Notch2Fc を加えた後、HBSS buffer で洗い培地に交換し 37℃でインキュベートした。細胞を 4%PFA で固定し、0.2% Triton/PBS によって細胞膜透過処理を行った。その後、Duolink PLA (Olink Bioscience, Sweden)のプロトコルに従った。抗体は Dll1 には mouse anti-Flag 抗体または rabbit anti-DDDDKtag 抗体を使用し、dynamin 2 には rabbit anti-dynamin 2、Snx18-Myc には mouse anti-Myc 抗体を使用した。画像は共焦点顕微鏡 Carl Zeiss LSM700 または Leica TCS SP8 を用いて取得した。

**ショウジョウバエにおける表現型の観察_**

ショウジョウバエのトランスジェニックラインは次のものを用いた。*MS1096-GAL4, UAS-Mib1-RNAi* （*TRiP.JF02629*), *UAS-SH3PX1-RNAi* （*TRiP.JF02730* or *TRiP.HMJ21552*）*UAS-RNAi* line を 2 コピー持った雄と *MS1096-GAL4* もつバージンの雌を 25℃で掛け合わせた。成体の翅を切り取り、スライドガラスにマウンティングした後、その表現型を光学顕微鏡にて観察し写真を取得した。

**謝辞**

本研究は千葉大学薬学部 伊藤素行教授の指導の元で行われました。深く感謝致します。本研究を遂行するにあたり、助力してくださった方に深く感謝いたします。特に様々なご助言や研究結果について大変有益な議論をしてくださった溝口貴正助教、殿城亜矢子助教に深く感謝を申し上げます。実験に助力していただいた、松尾宏美さん、西村侑也さん、吉岡佐保さん、劉楽笛さんに深く感謝いたします。

研究以外にも支えてくださった名古屋大学理学部 分子第六講座の松本邦弘教授、久本直毅准教授、花房洋准教授に深く感謝いたします。また、申請等の連絡を逐一教えてくださった中尾由美子さんに深く感謝申し上げます。

## 参考文献


Aguilar, R.C., Watson, H.A. & Wendland, B. (2003) The yeast Epsin Ent1 is recruited to membranes through multiple independent interactions. *The Journal of biological chemistry* **278**, 10737-10743.

Barsi, J.C., Rajendra, R., Wu, J.I. & Artzt, K. (2005) Mind bomb1 is a ubiquitin ligase essential for mouse embryonic development and Notch signaling. *Mechanisms of development* **122**, 1106-1117.

Blatner, N.R., Stahelin, R.V., Diraviyam, K., Hawkins, P.T., Hong, W., Murray, D. & Cho, W. (2004) The molecular basis of the differential subcellular localization of FYVE domains. *The Journal of biological chemistry* **279**, 53818-53827.

Bray, S.J. (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 678-689.

Chen, H., Fre, S., Slepnev, V.I., Capua, M.R., Takei, K., Butler, M.H., Di Fiore, P.P. & De Camilli, P. (1998) Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature* **394**, 793-797.

Daskalaki, A., Shalaby, N.A., Kux, K., Tsoumpekos, G., Tsibidis, G.D., Muskavitch, M.A. & Delidakis, C. (2011) Distinct intracellular motifs of Delta mediate its ubiquitylation and activation by Mindbomb1 and Neuralized. *J Cell Biol* **195**, 1017-1031.

David, C., McPherson, P.S., Mundigl, O. & de Camilli, P. (1996) A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 331-335.

Deblandre, G.A., Lai, E.C. & Kintner, C. (2001) Xenopus neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with XDelta1 and regulates Notch signaling. *Developmental cell* **1**, 795-806.

Ferguson, S.M. & De Camilli, P. (2012) Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**, 75-88.

Guruharsha, K.G., Kankel, M.W. & Artavanis-Tsakonas, S. (2012) The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nature reviews. Genetics* **13**, 654-666.

Hansson, E.M., Lanner, F., Das, D., Mutvei, A., Marklund, U., Ericson, J., Farnebo, F., Stumm, G., Stenmark, H., Andersson, E.R. & Lendahl, U. (2010) Control of Notch-ligand endocytosis by ligand-receptor interaction. *Journal of cell science* **123**, 2931-2942.

1 Harper, J.A., Yuan, J.S., Tan, J.B., Visan, I. & Guidos, C.J. (2003) Notch signaling in development and disease. *Clin Genet* **64**, 461-472.

Heuss, S.F., Ndiaye-Lobry, D., Six, E.M., Israel, A. & Logeat, F. (2008) The intracellular region of Notch ligands Dll1 and Dll3 regulates their trafficking and signaling activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 11212-11217.

Ishitani, T., Hirao, T., Suzuki, M., Isoda, M., Ishitani, S., Harigaya, K., Kitagawa, M., Matsumoto, K. & Itoh, M. (2010) Nemo-like kinase suppresses Notch signalling by interfering with formation of the Notch active transcriptional complex. *Nature cell biology* **12**, 278-285.

Itoh, M., Kim, C.H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y.J., Maust, D., Yeo, S.Y., Lorick, K., Wright, G.J., Ariza-McNaughton, L., Weissman, A.M., Lewis, J., Chandrasekharappa, S.C. & Chitnis, A.B. (2003) Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Developmental cell* **4**, 67-82.

Kaksonen, M., Toret, C.P. & Drubin, D.G. (2006) Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 404-414.

Knaevelsrud, H., Soreng, K., Raiborg, C., Haberg, K., Rasmuson, F., Brech, A., Liestol, K., Rusten, T.E., Stenmark, H., Neufeld, T.P., Carlsson, S.R. & Simonsen, A. (2013) Membrane remodeling by the PX-BAR protein SNX18 promotes autophagosome formation. *J Cell Biol* **202**, 331-349.

Koo, B.K., Yoon, M.J., Yoon, K.J., Im, S.K., Kim, Y.Y., Kim, C.H., Suh, P.G., Jan, Y.N. & Kong, Y.Y. (2007) An obligatory role of mind bomb-1 in notch signaling of mammalian development. *PLoS One* **2**, e1221.

Kopan, R. (2012) Notch Signaling.

Lai, E.C., Deblandre, G.A., Kintner, C. & Rubin, G.M. (2001) Drosophila neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of delta. *Developmental cell* **1**, 783-794.

Lai, E.C., Roegiers, F., Qin, X., Jan, Y.N. & Rubin, G.M. (2005) The ubiquitin ligase Drosophila Mind bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of Serrate and Delta. *Development* **132**, 2319-2332.

Lakadamyali, M., Rust, M.J. & Zhuang, X. (2006) Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell* **124**, 997-1009.

Le Borgne, R., Bardin, A. & Schweisguth, F. (2005a) The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* **132**, 1751-1762.

Le Borgne, R., Remaud, S., Hamel, S. & Schweisguth, F. (2005b) Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of delta and serrate signaling in Drosophila. *PLoS Biol* **3**, e96.

Le Bras, S., Loyer, N. & Le Borgne, R. (2011) The multiple facets of ubiquitination in the regulation of notch signaling pathway. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **12**, 149-161.

Lundmark, R. & Carlsson, S.R. (2004) Regulated membrane recruitment of dynamin-2 mediated by sorting nexin 9. *The Journal of biological chemistry* **279**, 42694-42702.

McMahon, H.T. & Boucrot, E. (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 517-533.

McNiven, M.A. (1998) Dynamin: a molecular motor with pinchase action. *Cell* **94**, 151-154.

Meloty-Kapella, L., Shergill, B., Kuon, J., Botvinick, E. & Weinmaster, G. (2012) Notch ligand endocytosis generates mechanical pulling force dependent on dynamin, epsins, and actin. *Developmental cell* **22**, 1299-1312.

Merrifield, C.J., Feldman, M.E., Wan, L. & Almers, W. (2002) Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nature cell biology* **4**, 691-698.

Mummery-Widmer, J.L., Yamazaki, M., Stoeger, T., Novatchkova, M., Bhalerao, S., Chen, D., Dietzl, G., Dickson, B.J. & Knoblich, J.A. (2009) Genome-wide analysis of Notch signalling in Drosophila by transgenic RNAi. *Nature* **458**, 987-992.

Musse, A.A., Meloty-Kapella, L. & Weinmaster, G. (2012) Notch ligand endocytosis: mechanistic basis of signaling activity. *Seminars in cell & developmental biology* **23**, 429-436.

Nichols, J.T., Miyamoto, A., Olsen, S.L., D'Souza, B., Yao, C. & Weinmaster, G. (2007) DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. *J Cell Biol* **176**, 445-458.

Overstreet, E., Fitch, E. & Fischer, J.A. (2004) Fat facets and Liquid facets promote Delta endocytosis and Delta signaling in the signaling cells. *Development* **131**, 5355-5366.

Park, J., Kim, Y., Lee, S., Park, J.J., Park, Z.Y., Sun, W., Kim, H. & Chang, S. (2010) SNX18 shares a redundant role with SNX9 and modulates endocytic trafficking at the plasma membrane. *Journal of cell science* **123**, 1742-1750.

Parks, A.L., Klueg, K.M., Stout, J.R. & Muskavitch, M.A. (2000) Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* **127**, 1373-1385.

Pavlopoulos, E., Pitsouli, C., Klueg, K.M., Muskavitch, M.A., Moschonas, N.K. & Delidakis, C. (2001) neuralized Encodes a peripheral membrane protein involved in delta signaling and endocytosis. *Developmental cell* **1**, 807-816.

Ringstad, N., Gad, H., Low, P., Di Paolo, G., Brodin, L., Shupliakov, O. & De Camilli, P. (1999) Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* **24**, 143-154.

Schweisguth, F. (2004) Regulation of notch signaling activity. *Current biology : CB* **14**, R129-138.

Seugnet, L., Simpson, P. & Haenlin, M. (1997) Requirement for dynamin during Notch signaling in Drosophila neurogenesis. *Dev Biol* **192**, 585-598.

Shah, D.K., Mohtashami, M. & Zuniga-Pflucker, J.C. (2012) Role of recycling, Mindbomb1 association, and exclusion from lipid rafts of delta-like 4 for effective Notch signaling to drive T cell development. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **189**, 5797-5808.

Shin, N., Ahn, N., Chang-Ileto, B., Park, J., Takei, K., Ahn, S.G., Kim, S.A., Di Paolo, G. & Chang, S. (2008) SNX9 regulates tubular invagination of the plasma membrane through

interaction with actin cytoskeleton and dynamin 2. *Journal of cell science* **121**, 1252-1263.
Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.H., Murphy, C., Zerial, M. & Stenmark, H. (1998) EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**, 494-498.
Song, R., Kim, Y.W., Koo, B.K., Jeong, H.W., Yoon, M.J., Yoon, K.J., Jun, D.J., Im, S.K., Shin, J., Kong, M.P., Kim, K.T., Yoon, K. & Kong, Y.Y. (2008) Mind bomb 1 in the lymphopoietic niches is essential for T and marginal zone B cell development. *J Exp Med* **205**, 2525-2536.
Soulet, F., Yarar, D., Leonard, M. & Schmid, S.L. (2005) SNX9 regulates dynamin assembly and is required for efficient clathrin-mediated endocytosis. *Molecular biology of the cell* **16**, 2058-2067.
Stenmark, H., Aasland, R., Toh, B.H. & D'Arrigo, A. (1996) Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *The Journal of biological chemistry* **271**, 24048-24054.
Sweitzer, S.M. & Hinshaw, J.E. (1998) Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* **93**, 1021-1029.
Taylor, M.J., Perrais, D. & Merrifield, C.J. (2011) A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol* **9**, e1000604.
van Weering, J.R., Verkade, P. & Cullen, P.J. (2010) SNX-BAR proteins in phosphoinositide-mediated, tubular-based endosomal sorting. *Seminars in cell & developmental biology* **21**, 371-380.
Wang, W. & Struhl, G. (2004) Drosophila Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch. *Development* **131**, 5367-5380.
Wang, W. & Struhl, G. (2005) Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in Drosophila. *Development* **132**, 2883-2894.
Weinmaster, G. & Fischer, J.A. (2011) Notch ligand ubiquitylation: what is it good for? *Developmental cell* **21**, 134-144.
Xie, X., Cho, B. & Fischer, J.A. (2012) Drosophila Epsin's role in Notch ligand cells requires three Epsin protein functions: the lipid binding function of the ENTH domain, a single Ubiquitin interaction motif, and a subset of the C-terminal protein binding modules. *Dev Biol* **363**, 399-412.
Yamamoto, M., Morita, R., Mizoguchi, T., Matsuo, H., Isoda, M., Ishitani, T., Chitnis, A.B., Matsumoto, K., Crump, J.G., Hozumi, K., Yonemura, S., Kawakami, K. & Itoh, M. (2010) Mib-Jag1-Notch signalling regulates patterning and structural roles of the notochord by controlling cell-fate decisions. *Development* **137**, 2527-2537.
Yarar, D., Waterman-Storer, C.M. & Schmid, S.L. (2005) A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Molecular biology of the cell*

**16**, 964-975.

Yoon, M.J., Koo, B.K., Song, R., Jeong, H.W., Shin, J., Kim, Y.W., Kong, Y.Y. & Suh, P.G. (2008) Mind bomb-1 is essential for intraembryonic hematopoiesis in the aortic endothelium and the subaortic patches. *Molecular and cellular biology* **28**, 4794-4804.

Zhang, L., Widau, R.C., Herring, B.P. & Gallagher, P.J. (2011) Delta-like 1-Lysine613 regulates notch signaling. *Biochimica et biophysica acta* **1813**, 2036-2043.

Figure legends

**Figure legends**

**Figure 1 Mib1 は Dll1 発現細胞による Notch シグナル活性化に必要であるが、Dll1 の細胞膜での発現や Dll1 単独でのエンドサイトーシスには必要ない**

(A) Dll1 発現細胞の Mib1 ノックダウンによる Notch 発現細胞での Notch シグナル活性の減少。左図は Dll1-3T3 に各 siRNA を 2nM または 10nM で導入し Notch1-3T3 細胞と共培養した後、Notch1-3T3 細胞での Notch シグナル活性測定し、その測定値を示した。右図は Mib1 siRNA 導入によるタンパク質量変化を示し Mib1 は減少したが Dll1 の発現量は変化しなかった。(B) Mib1 のノックダウンによって減少した Notch シグナル活性の zebrafish Mib1 の過剰発現によるレスキュー実験。zMib1WT は野生型の zMib1 を示し、zMib1CS はユビキチンリガーゼ活性のない変異体を示す。**は one-way anova 検定において P<0.01 であることを示す。(C) Mib1 ノックダウンによって細胞膜上での Dll1 発現量は変化しない。白抜きのヒストグラムはフローサイトメトリーを用いて抗 Dll1 抗体によって得られた細胞膜表面上の Dll1 発現量を示し、灰色のヒストグラムは control IgG によって得られた値を示す。(D) Mib 1 のノックダウンによって Dll1 のエンドサイトーシス量は変化しない。ELISA によって得られた細胞内にとりこまれビオチン化されている Dll1 と全 Dll1 の値から計算した。値は平均を示しエラーバーは標準偏差を示した。ns は one-way anova 検定において有意差なしであることを示す。

**Figure 2 Mib1 は Dll1 発現細胞への Notch1ECD のトランスエンドサイトーシスと NICD の遊離に必要である**

(A) Dll1-HeLa 細胞への Notch1 細胞外ドメインのトランスエンドサイトーシスの蛍光免疫染色による解析。上図は control siRNA、下図は Mib1 siRNA を導入した Dll1-HeLa を示す。緑は dextran、マゼンタは Notch1 細胞外ドメイン、青は Dll1 を示す。(B) Notch1 細胞外ドメインのトランスエンドサイトーシスは Mib1 のノックダウンによって減少する。値は写真から得られた細胞中の Notch 細胞外ドメイン陽性である dextran の数を全 dextran の数で割った細胞一つあたりの割合を示した。(C) Dll1-HeLa 細胞における全 dextran の数は Mib1 のノックダウンで変化しない。(B, C) **は one-way anova 検定において P<0.01 であることを示し、ns は有意差がないことを示す。n 数は control siRNA が n=26, Mib1 siRNA#1 が n=24 である。(D) Mib1 のノックダウンは NICD の遊離を抑制する。Nocth1 発現細胞と Dll1 発現細胞の共培養後 1、6、24 時間の cleaved NICD 量を抗体によって検出した。

**Figure 3 Notch 受容体と Dll1 の相互作用は Dll1 のユビキチン化と Mib1 の自己ユビキチン化を誘導する**

(A, B) Dll1 の Notch2Fc への結合は Mib1 のノックダウンによって減少しない。(A) 蛍光免疫染色による control siRNA または Mib1 siRNA を導入した Dll1-3T3 細胞への Notch2Fc の結合の検出。赤が Notch2Fc を示し、緑は Dll1-3T3 で発現している EGFP を示す。(B) Dll1-3T3 へ結合した Notch2Fc 量を ELISA によって定量した。値は ELISA によって得られた結合した Notch2Fc 量を示す化学発光の値を BCA アッセイによって得られた細胞溶解液に含まれる全タンパク量で割った任意の値(AU)の平均を示し、エラーバーは標準偏差を示す。(C) Dll1 のユビキチン化は Notch2Fc による刺激で引き起こされ、Notch2Fc 刺激後 10 分で最大となる。(D) Notch2Fc 刺激後 10 分で見られる Dll1 のユビキチン化は Mib1 のノックダウンで顕著に減少する。(E) 野生型 zMib1 を発現した Dll1-3T3 では Notch2Fc 刺激後 2 分で zMib1 の自己ユビキチン化が見られるが、ユビキチンリガーゼ活性のない zMib1 変異体を導入した Dll1-3T3 では見られない。*は zMib1CS のモノユビキチン化産物の可能性があるバンド示した。zMib1WT は野生型 zMib1、zMib1CS はユビキチンリガーゼ活性のない zMib1 変異体を示す。

**Figure 4 Mib1 は膜陥入構造形成後の Notch 受容体と結合した Dll1 の初期エンドソームへの輸送に寄与する**

(A, B) Mib1 のノックダウンは Notch2Fc と EEA1 の共局在を減少させる。(A) control siRNA または Mib1 siRNA を導入した Dll1-3T3 における Dll1 に結合した Notch2Fc と EEA1 陽性のエンドソームの蛍光免疫染色による検出。Dll1-3T3 に clsutered Notch2Fc を加え 4℃で 40 分静置し、HBSS buffer で洗った後培地に交換し、37℃で 0 分または 15min 静置し固定を行った後、免疫染色を行った。緑は EEA1、マゼンタは Notch2Fc、青は Dll1-3T3 で発現している EGFP を示す。左図の破線の四角で囲んだ範囲を右図で拡大した染色を示した。(B) control siRNA または Mib1 siRNA を導入した Dll1-3T3 細胞における Notch2Fc と EEA1 の共局在の割合。値は各細胞における全 EEA1 陽性のエンドソームに対する Notch2Fc と共局在した EEA1 陽性のエンドソームの割合を示した。バーは各細胞における割合の平均を示し、n 数は各データ n<25 で、**は one-way anova 検定において P<0.01 であることを示す。(C) 取り込みによる細胞表面上からの Notch2Fc の減少は Mib1 のノックダウンによって変化しない。20min は Notch2Fc 結合後培地に交換し 37℃で 20 分静置、120min は Notch2Fc 結合後培地に交換し 37℃で 120 分静置した。値は平均を示しエラーバーは標準偏差を示している。

**Figure 5 Mib1 は dynamin2 の Dll1 への誘導を調節する**

(A) Notch2Fc 刺激の時間依存的な Notch2Fc と dynamin の共局在の増加が見られたが、Mib1 をノックダウンした Dll1-HeLa 細胞では増加は見られなかった。control siRNA または Mib1 siRNA を導入した Dll1-HeLa に Notch2Fc を加え 37℃で 2、5 または 10 分間静置し、蛍光免疫染色によって Notch2Fc と dynamin を検出した。値は各細胞における

Notch2Fc 陽性な dynamin 2 の数を数え、全 dynamin に対する割合を使用し横棒は平均を示す。n 数は左から n=30、n=30、n=29、n=28、n=30、n=30 である。*は one-way anova 検定における P<0.05 を示す。(B) control siRNA または Mib1 siRNA を導入した Dll1-3T3 細胞に Notch2Fc を結合させ、培地に交換後 37℃で 5 または 20 分後の Dll1 と dynamin 2 の PLA シグナル。マゼンタは Dll1-dynamin 2 の PLA シグナル、青は Dll1-3T3 で発現している EGFP を示す。(C) Notch2Fc 結合後 37℃ 5 分のインキュベートでは Dll1-dynamin 2 の PLA シグナルは増加するが、Mib1 ノックダウンでは増加しない。値は Dll1-3T3 の Dll1-dynamin 2 PLA シグナルの細胞一つあたりの数で横棒は平均を示す。n 数は左から n=31、n=44、n=42、n=27、n=34、n=34 である。*は one-way anova 検定において P<0.05、**は P<0.01 を示す。

**Figure 6　Snx18 は Notch シグナル伝達に対して正に働く**

(A) Dll1-3T3 細胞の Snx18 のノックダウンは Dll1 による Notch シグナル伝達活性化を低下させる。各 siRNA を導入した Dll1-3T3 細胞と Notch1-3T3 細胞を共培養し Notch1-3T3 細胞における Notch シグナル活性を測定した。値は平均を示し、エラーバーは標準偏差を示す。**は one-way anova 検定において P<0.01 を示す。(B) ショウジョウバエでの SH3PX1 のノックダウンでは翅における Notch シグナル伝達由来の表現型が見られる。矢頭は翅外縁部近くの翅脈の拡幅を示し、矢印は SH3PX1 のノックダウンによって消失する前横脈を示す。スケールバーは 1mm を示している。(C) control siRNA または Snx18 siRNA#1 を導入した Dll1-3T3 に Notch2Fc 結合後、培地に交換して 37℃で 15 分静置した後、蛍光免疫染色による EEA1 と Notch2Fc の共局在の検出。緑は EEA1、マゼンタは Notch2Fc、青は Dll1-3T3 で発現している EGFP を示す。(D) Snx18 のノックダウンにより EEA1 と Notch2Fc の共局在が減少する。値は全 EEA1 エンドソームに対する Notch2Fc 陽性の EEA1 エンドソームの割合を示し、横棒は平均を示す。N 数は左から n=93、n=67 である。**は one-way anova 検定において P<0.01 を示す。(E) control siRNA または Mib1 siRNA と導入し Snx18 を発現させた Dll1-3T3 細胞に Notch2Fc 結合後、培地に交換して 5 または 20 分後の Dll1 と Snx18 の PLA シグナル。青は Snx18 を示し、マゼンタは Notch2Fc を示す。(E) Notch2Fc 刺激によって Dll1-Snx18 PLA シグナルは変化しない。値は細胞一つあたりの Dll1-Snx18 の PLA シグナル数を示し、横棒は平均を示す。N 数は左から n=23、n=23、n=31、n=25、n=22、n=28 である。

**Figure 7 Mib1 は Snx18 と dynamin 2 の相互作用を制御し、Dll1 へ Dynamin を誘導する**

(A) control siRNA または Snx18 siRNA#1 を導入した Dll1-3T3 細胞に Notch2Fc 結合後、培地に交換して 5 または 20 分後の Dll1 と dynamin の PLA シグナル。マゼンタは Notch2Fc を、青は Dll1-3T3 で発現している EGFP を示す (B) Snx18 のノックダウンでは Notch2Fc による Dll1-dynamin 2 PLA シグナルの増加が見られない。値は細胞一つあ

たりの Dll1-dynamin 2 の PLA シグナル数を示し、横棒は平均を示す。**は one-way anova 検定における P<0.01 を示す。(C) Mib1 は Snx18 と dynamin 2 の相互作用を促進する。Snx18 と共沈してきた dynamin 2 を上図に示した。whole-cell extrancts 中の Snx18 と dynamin 2 と野生型 zMib1 または zMib1CS は下図に示した。図中の zMib1WT は野生型 zMib1、zMib1CS はユビキチンリガーゼ活性のない zMib1 変異体、WCE は whole-cell extracts、IB は immunoblot、IP は immunoprecipitation を示す。dynnamin 2 と zMib1 を共発現したサンプルでは whoole-cell extracts の dynamin 2 の上に一つバンドが検出されたが、分子量から判断すると dynamin 2 のモノユビキチン化産物だと考えられる。(D) Mib1 によって制御される Dll1 エンドサイトーシスのモデル図。Notch 受容体非存在下でも Snx18 と Dll1 は相互作用しており、Dll1 が Notch 受容体と相互作用すると Mib1 のユビキチンリガーゼ活性が上昇し Dll1 がユビキチン化される。Mib1 のユビキチンリガーゼ活性依存的に Snx18 を介した Dll1 の膜陥入部位への dynamin の誘導が行われ、Dll1 のエンドサイトーシスが促進される。この Dll1 のエンドサイトーシスによって Notch 細胞外ドメインが乖離し、Notch 発現細胞にて Notch 細胞内ドメインが切断され遊離する。

**Supplementary figure legends**

**Figure S1 clustered Notch2Fc は Dll1 と共局在する**

Control siRNA または Mib1 siRNA を導入した Dll1 発現細胞の Dll1 と Notch2Fc の共局在解析を行った。clustered Notch2Fc 4℃ 30 分で加えてから、HBSS で洗い 37℃ 20 分インキュベートを行って固定し、免疫染色を行って共焦点顕微鏡にて画像を取得した。マゼンタは Notch2Fc、緑は Dll1、青は Dll1-3T3 で発現している EGFP を示す

**Figure S2 Mib1 は Notch と結合した Dll1 の Rab5 陽性エンドソームへの輸送に関与する**

(A) control siRNA または Mib1 siRNA を導入した Dll1-HeLa 細胞における Rab5-GFP と EEA1 の共局在解析。緑は Rab5-GFP、シアンは EEA1 を示す。左図の破線で囲った部分を右図で拡大した。(B) 上図は Dll1-HeLa 細胞での Notch2Fc と Rab5 及び EEA1 の共局在解析。緑は Rab5、シアンは EEA1、マゼンタは Notch2Fc を示す。下図左は EEA1 と Rab5 の共局在解析で値は細胞一つに対する全 Rab5 あたりの EEA1 陽性な Rab5 を示す。下図右は Dll1-HeLa 細胞一つに対する全 Rab5 あたりの Notch2Fc 陽性な Rab5 を示す。**は one-way ANOVA における P<0.01 を示す。

Figure 1

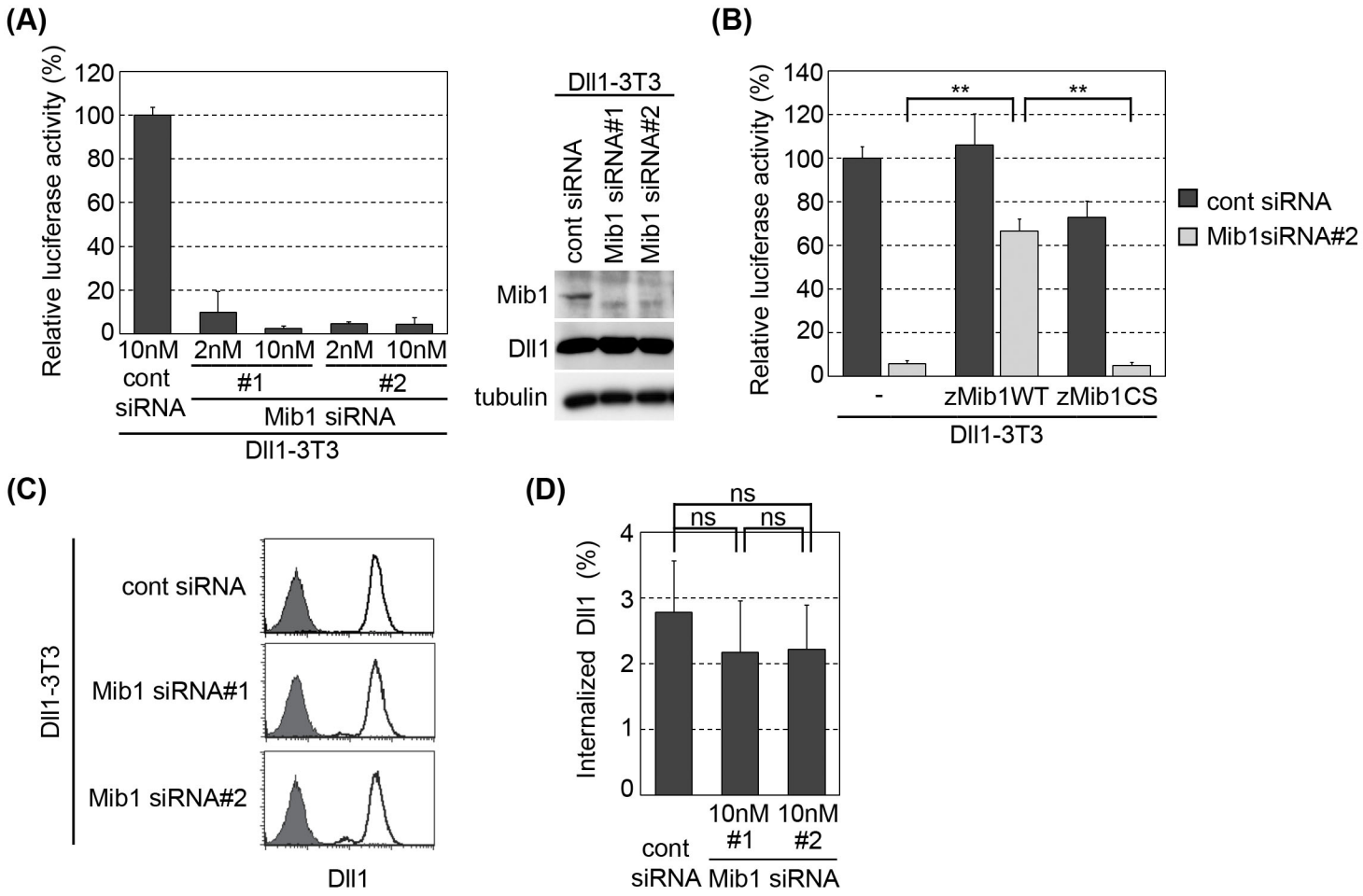

(A)
Relative luciferase activity (%)
120
100
80
60
40
20
0
10nM
cont siRNA
2nM
10nM
#1
2nM
10nM
#2
Mib1 siRNA
Dll1-3T3
Dll1-3T3
cont siRNA
Mib1 siRNA#1
Mib1 siRNA#2
Mib1
Dll1
tubulin
(B)
Relative luciferase activity (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
**
**
-
zMib1WT
zMib1CS
Dll1-3T3
cont siRNA
Mib1siRNA#2
(C)
Dll1-3T3
cont siRNA
Mib1 siRNA#1
Mib1 siRNA#2
Dll1
(D)
Internalized Dll1 (%)
4
3
2
1
0
ns
ns
ns
cont siRNA
10nM #1
10nM #2
Mib1 siRNA

Figure 2

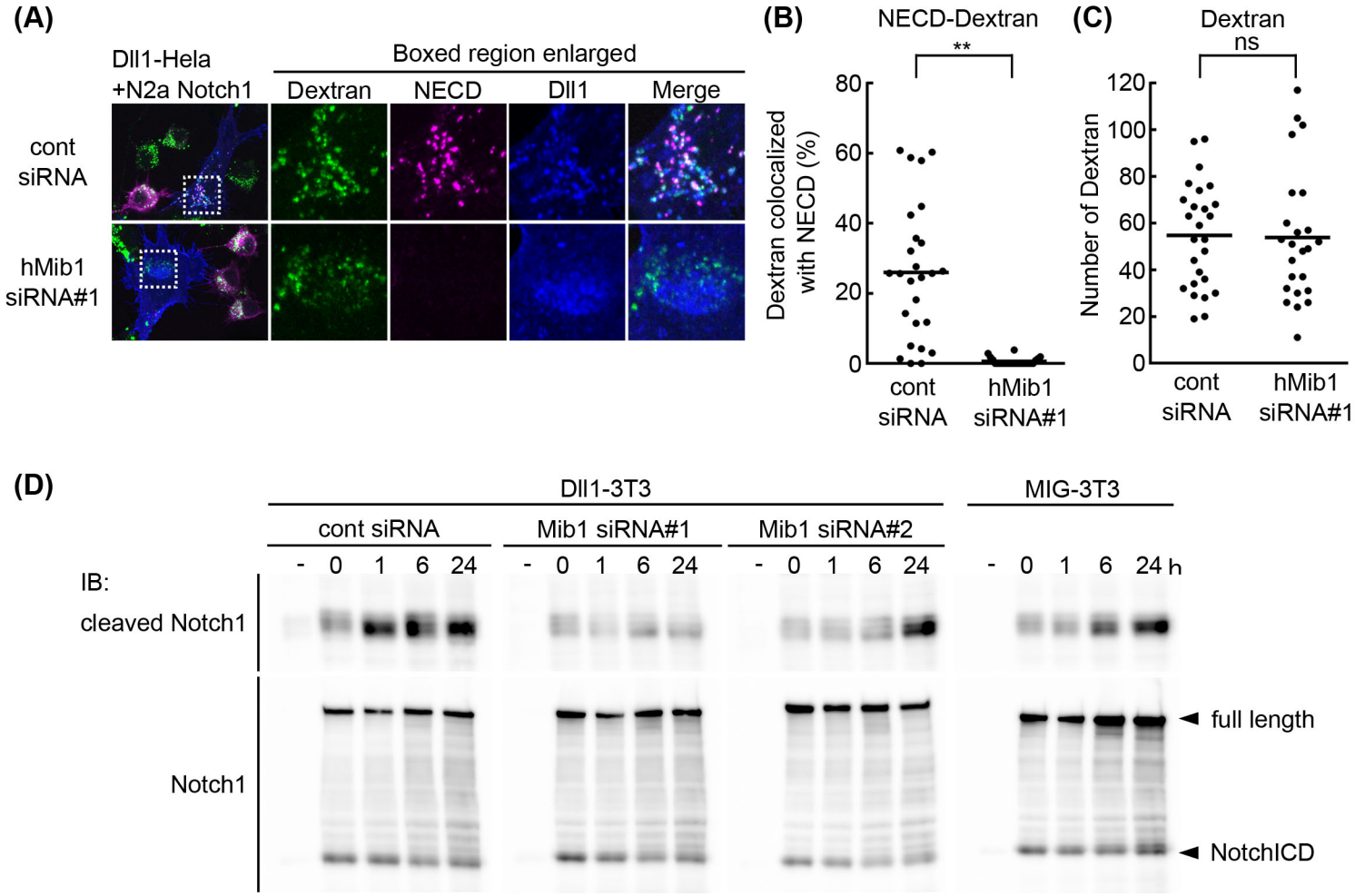

(A)
Dll1-Hela
+N2a Notch1
Boxed region enlarged
Dextran
NECD
Dll1
Merge
cont
siRNA
hMib1
siRNA#1
(B)
NECD-Dextran
**
Dextran colocalized
with NECD (%)
80
60
40
20
0
cont
siRNA
hMib1
siRNA#1
(C)
Dextran
ns
Number of Dextran
120
100
80
60
40
20
0
cont
siRNA
hMib1
siRNA#1
(D)
Dll1-3T3
MIG-3T3
cont siRNA
Mib1 siRNA#1
Mib1 siRNA#2
- 0 1 6 24
- 0 1 6 24
- 0 1 6 24
- 0 1 6 24 h
IB:
cleaved Notch1
Notch1
full length
NotchICD

Figure 3

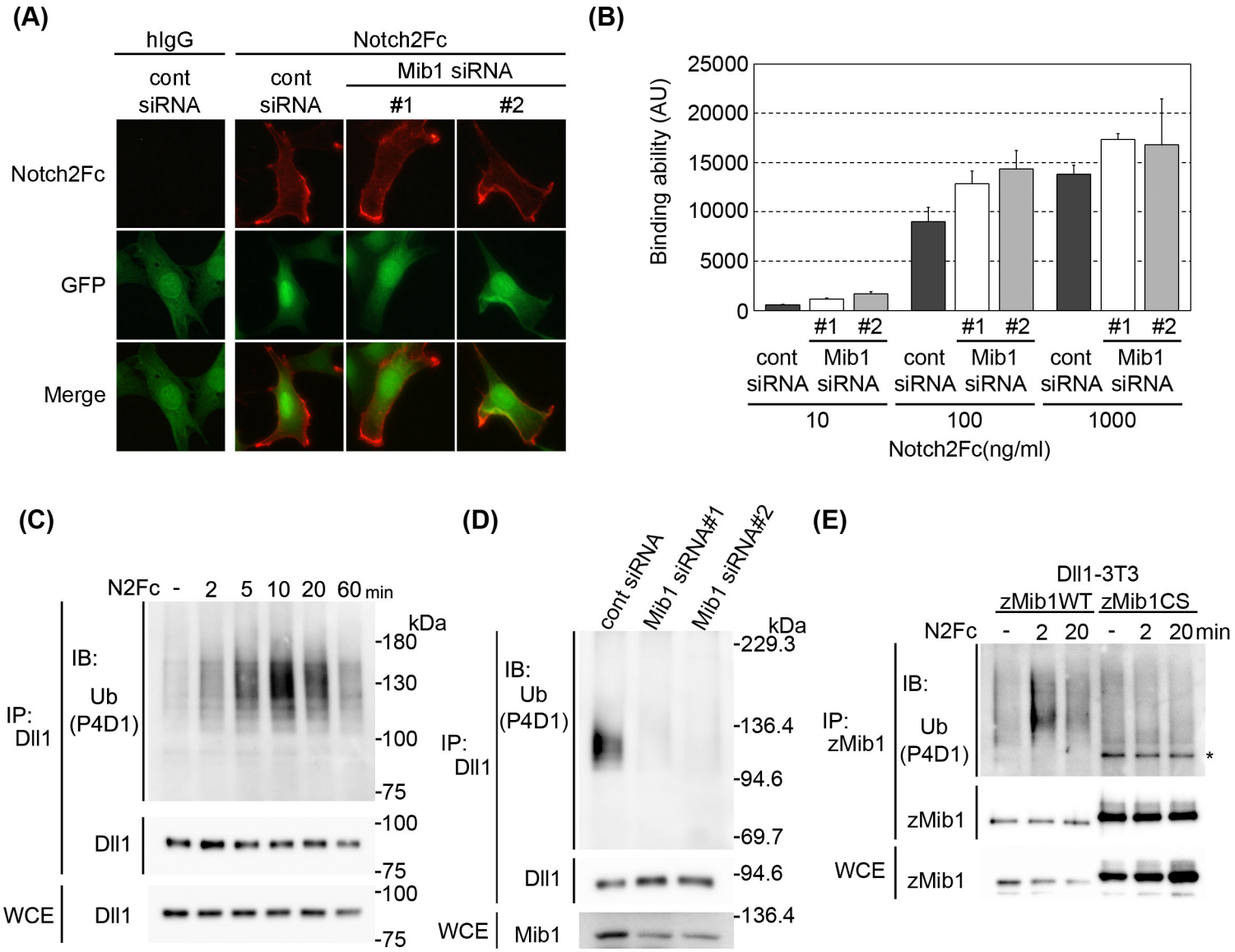

(A)
hIgG
Notch2Fc
cont siRNA
cont siRNA
Mib1 siRNA
#1
#2
Notch2Fc
GFP
Merge
(B)
Binding ability (AU)
25000
20000
15000
10000
5000
0
#1 #2 #1 #2 #1 #2
cont siRNA
Mib1 siRNA
cont siRNA
Mib1 siRNA
cont siRNA
Mib1 siRNA
10
100
1000
Notch2Fc(ng/ml)
(C)
N2Fc - 2 5 10 20 60 min
kDa
IP: Dll1
IB: Ub (P4D1)
-180
-130
-100
-75
Dll1
-100
-75
WCE
Dll1
-100
-75
(D)
cont siRNA
Mib1 siRNA#1
Mib1 siRNA#2
kDa
IP: Dll1
IB: Ub (P4D1)
-229.3
-136.4
-94.6
-69.7
Dll1
-94.6
WCE
Mib1
-136.4
(E)
Dll1-3T3
zMib1WT
zMib1CS
N2Fc - 2 20 - 2 20 min
IP: zMib1
IB: Ub (P4D1)
*
zMib1
WCE
zMib1

Figure 4

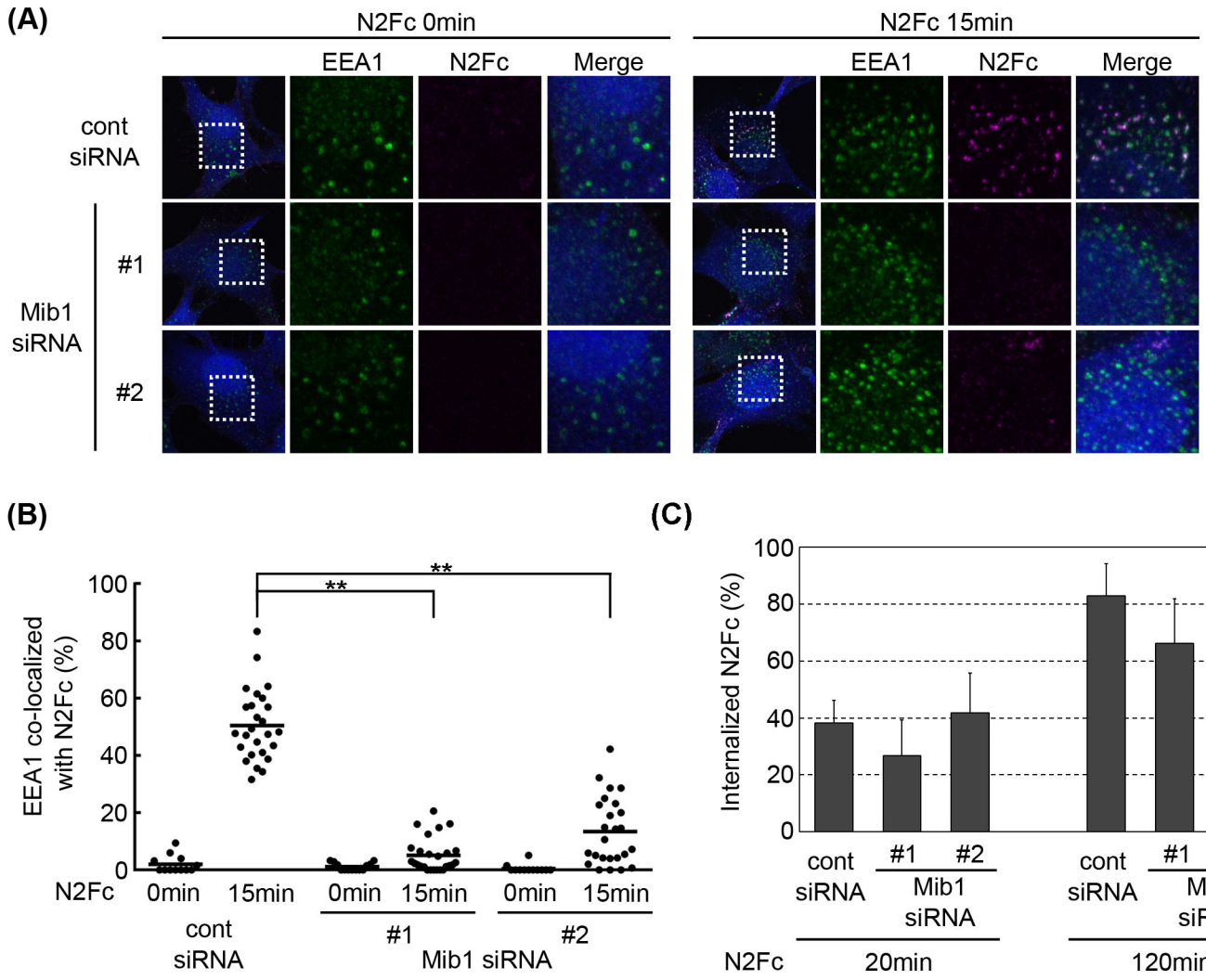

(A)
N2Fc 0min
N2Fc 15min
EEA1
N2Fc
Merge
cont siRNA
Mib1 siRNA
#1
#2
(B)
EEA1 co-localized with N2Fc (%)
**
**
N2Fc
0min
15min
cont siRNA
#1
#2
Mib1 siRNA
(C)
Internalized N2Fc (%)
cont siRNA
Mib1 siRNA
20min
120min

Figure 5

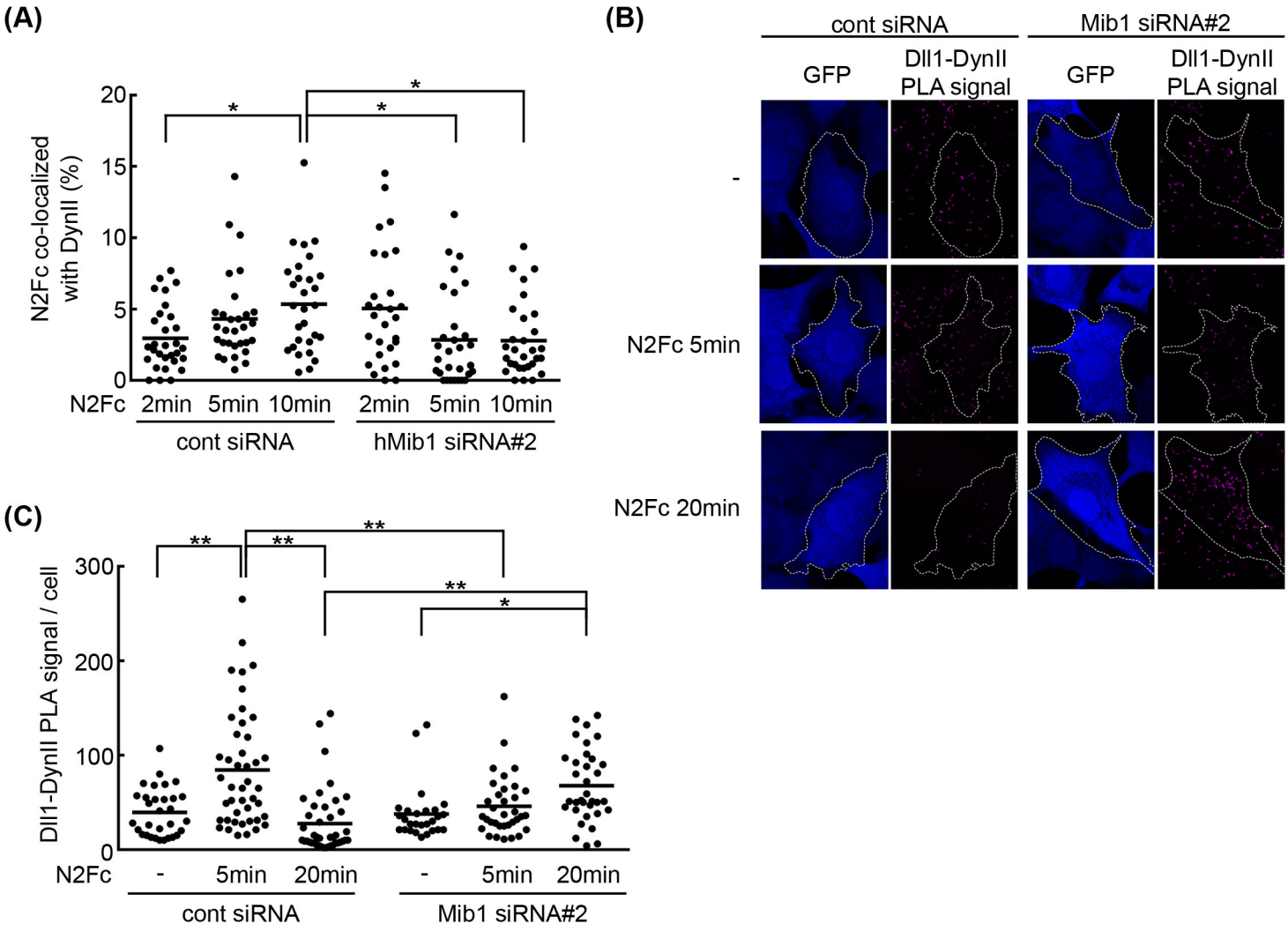

(A)
N2Fc co-localized with DynII (%)
20
15
10
5
0
*
*
*
N2Fc 2min 5min 10min 2min 5min 10min
cont siRNA
hMib1 siRNA#2
(B)
cont siRNA
Mib1 siRNA#2
GFP
Dll1-DynII PLA signal
GFP
Dll1-DynII PLA signal
-
N2Fc 5min
N2Fc 20min
(C)
Dll1-DynII PLA signal / cell
300
200
100
0
**
**
**
**
*
N2Fc - 5min 20min - 5min 20min
cont siRNA
Mib1 siRNA#2

Figure 6

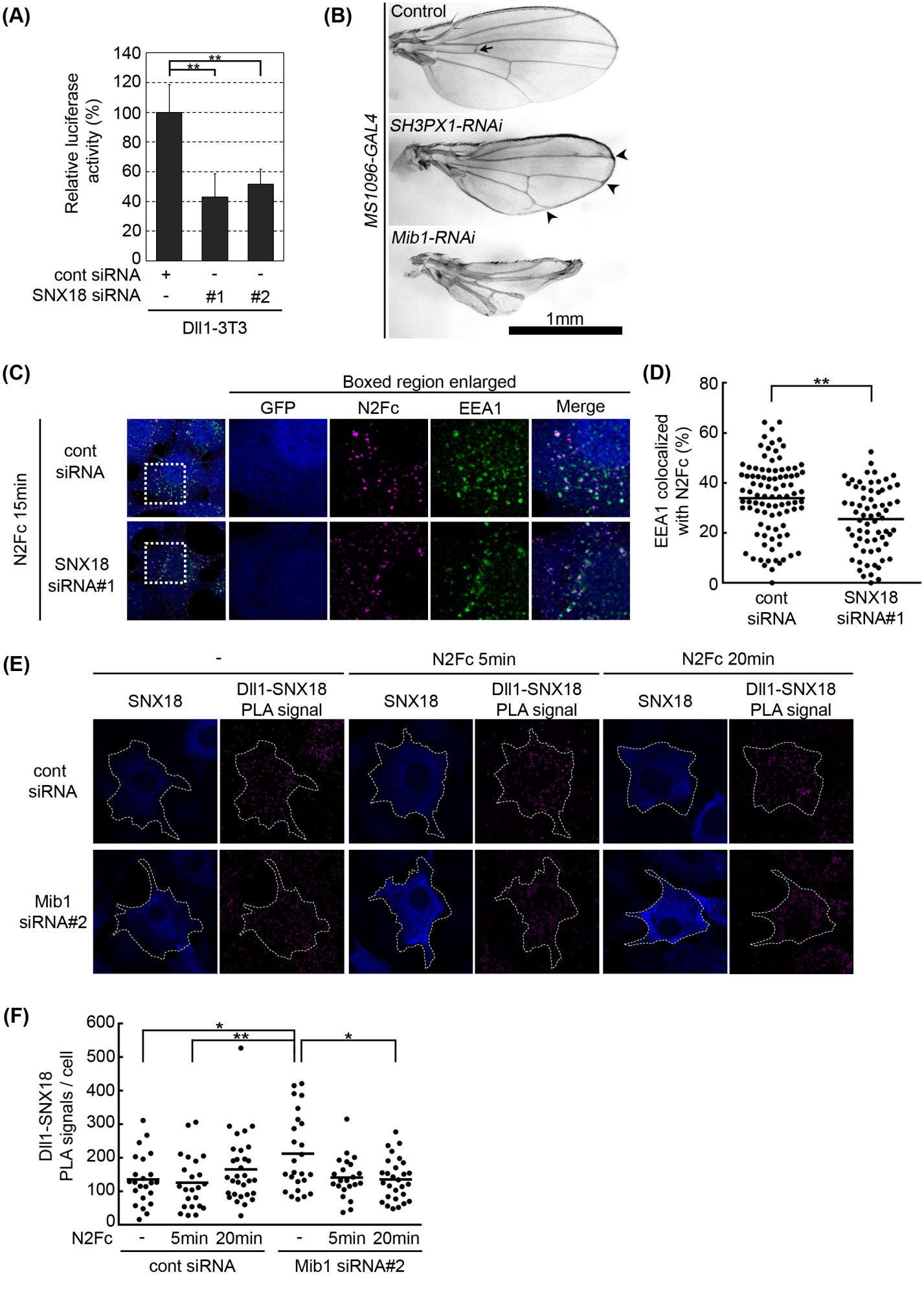
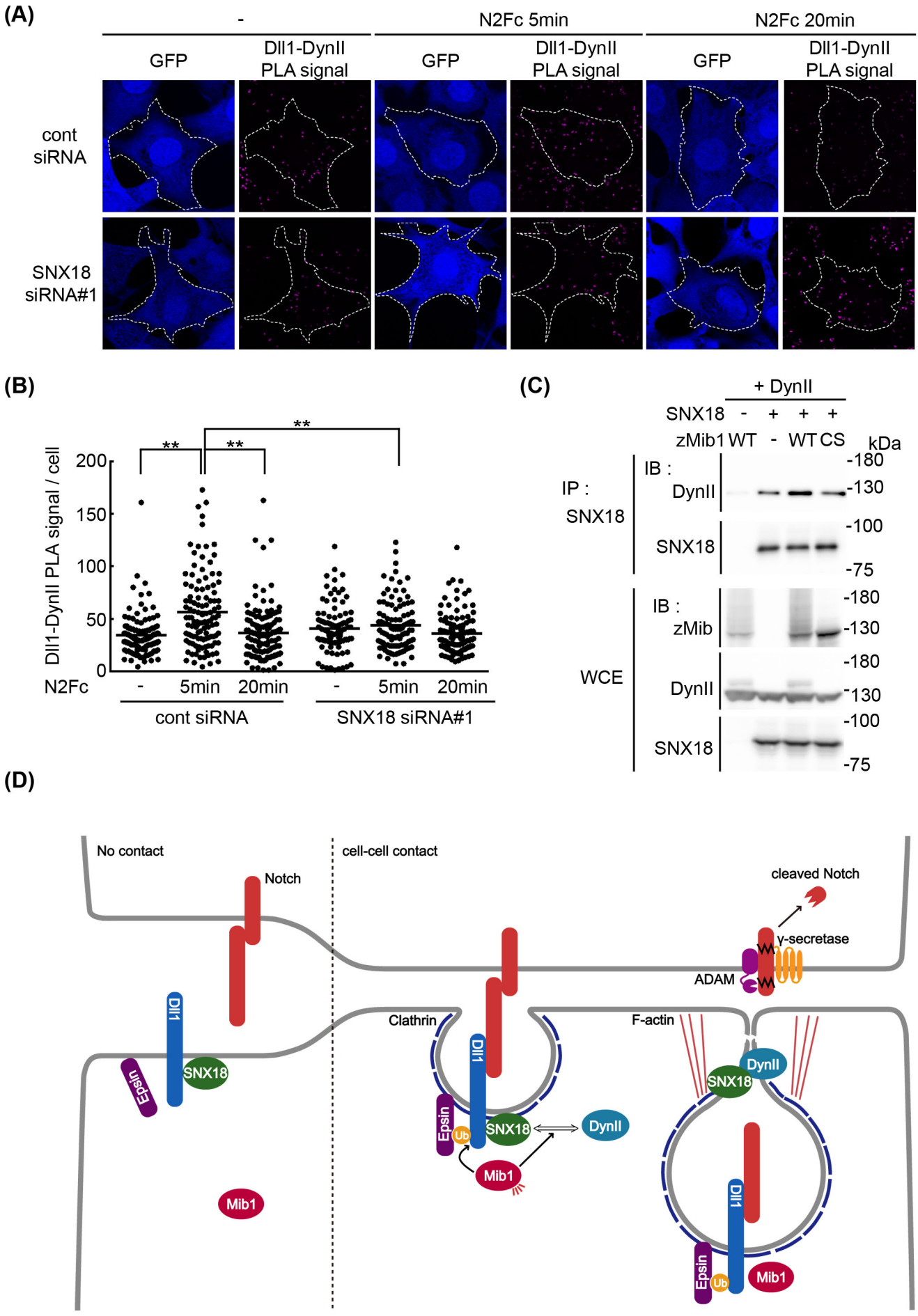

(A)
Relative luciferase activity (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
**
**
cont siRNA + - -
SNX18 siRNA - #1 #2
Dll1-3T3
(B)
Control
SH3PX1-RNAi
Mib1-RNAi
MS1096-GAL4
1mm
(C)
Boxed region enlarged
GFP
N2Fc
EEA1
Merge
N2Fc 15min
cont siRNA
SNX18 siRNA#1
(D)
EEA1 colocalized with N2Fc (%)
80
60
40
20
0
**
cont siRNA
SNX18 siRNA#1
(E)
-
N2Fc 5min
N2Fc 20min
SNX18
Dll1-SNX18 PLA signal
SNX18
Dll1-SNX18 PLA signal
SNX18
Dll1-SNX18 PLA signal
cont siRNA
Mib1 siRNA#2
(F)
Dll1-SNX18 PLA signals / cell
600
500
400
300
200
100
0
*
**
*
N2Fc - 5min 20min - 5min 20min
cont siRNA
Mib1 siRNA#2

Figure 7


(A)
-
N2Fc 5min
N2Fc 20min
GFP
Dll1-DynII PLA signal
cont siRNA
SNX18 siRNA#1
(B)
Dll1-DynII PLA signal / cell
200
150
100
50
0
**
**
**
N2Fc
-
5min
20min
-
5min
20min
cont siRNA
SNX18 siRNA#1
(C)
+ DynII
SNX18 - + + +
zMib1 WT - WT CS
kDa
IP : SNX18
IB : DynII
SNX18
-180
-130
-100
-75
WCE
IB : zMib
DynII
SNX18
(D)
No contact
cell-cell contact
Notch
cleaved Notch
γ-secretase
ADAM
Dll1
SNX18
Epsin
Clathrin
F-actin
DynII
Ub
Mib1

Supplemental figures

Figure S1

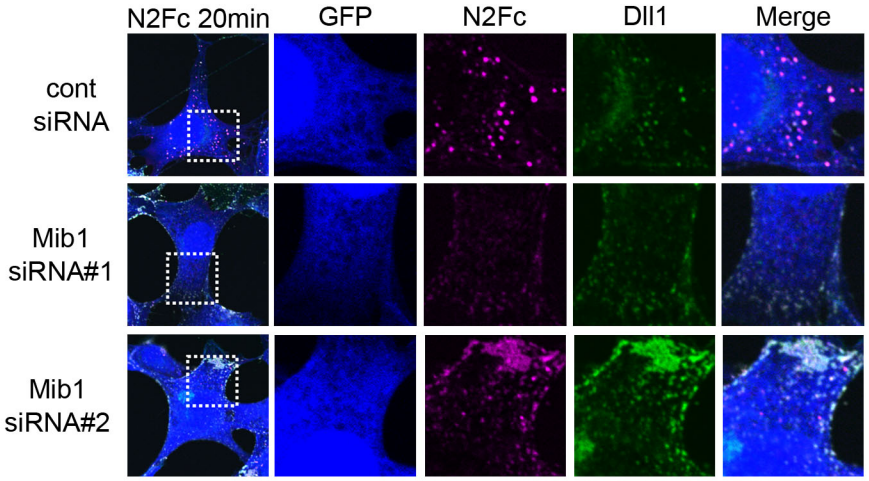



Figure S2

