

主論文の要旨

**O-GlcNAc on NOTCH1 EGF repeats regulates
ligand-induced Notch signaling and vascular
development in mammals**

〔細胞外O-GlcNAcによるNotchシグナル制御〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
生物化学講座 分子細胞化学分野

(指導：岡島 徹也 教授)

澤口 翔伍

【緒言】

Notch 受容体(Notch1/2/3/4)は、1 回膜貫通型タンパク質である。Notch 受容体のリガンドには、Dll (Dll1/3/4)と Jag (Jag1/2)が存在する。Notch 受容体とリガンドの細胞外ドメインの大部分は、上皮成長因子(EGF)リピートで構成される。

Notch シグナルは、Notch 受容体とそのリガンドである Dll 又は Jag が互いの細胞外ドメインを介して結合することにより開始する。Notch 受容体とリガンドが結合した後、 γ -セクレターゼにより Notch の細胞外ドメイン(Notch Intracellular Domain : NICD)は切断される。NICD が核移行した後、Rbpj と結合して、Notch のターゲット遺伝子である *HES1*、*HEY1*、*CDH2* の発現を増加させ、血管内皮細胞内では *VEGFR 2/3* の発現を抑制する。このような Notch シグナル伝達経路は、神経・造血・血管・免疫や内分泌系の発生に関わり、非常に重要である。

EOGT (EGF domain specific O-GlcNAc Transferase)は、Notch1 の細胞外ドメイン(EGF ドメイン)を小胞体内で O-GlcNAc 修飾する糖転移酵素である。*EOGT* は、頭蓋骨の頭頂部、手、足などの先端の欠損、血管の形成に異常を呈する先天性疾患アダムズ-オリバー症候群(AOS)の原因遺伝子として報告された。さらに、AOS の原因遺伝子として、*NOTCH1* や、Notch のリガンドである *DLL4*、Notch シグナルの下流にある転写因子 *RBPJ* などの Notch シグナルに関連している遺伝子の変異も報告された。しかし、EOGT と Notch シグナルの関係性は明らかではなかった。

そこで、私は *Eogt* 欠損マウス(*Eogt*^{-/-})を用いて、Notch シグナルにおける O-GlcNAc 修飾の役割を明らかにすることを目的として研究を行った。

【方法】

1. 組織における *Eogt* の発現様式を解析するために、血管内皮細胞特異的 *Eogt* 欠損マウスの網膜を用いて、*in-situ hybridization* により *Eogt* の発現様式を評価した。2. 野生型マウス(WT)、*Eogt*^{-/-}マウス、*Notch1* 欠損マウス及び *Rbpj* 欠損マウスの表現型を比較するために、それぞれのマウスの網膜を血管内皮マーカーの Isolectin B4 (IB4)で組織染色し、血管新生を評価した。さらに、血中のフィブリノーゲンを染色し、網膜の血管の脆弱化を評価した。3. *Eogt*^{-/-}マウスの血管内皮細胞内の遺伝子発現変化を評価するために、WT と *Eogt*^{-/-}マウスの脳より血管内皮細胞を単離し、定量的 PCR で遺伝子発現を検出した。

4. EOGT が制御する分子を同定するため、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術により *EOGT* 変異 HEK293T 細胞(*EOGT*^{null})を作成し、WT 及び *Eogt*^{-/-}マウスの肺より血管内皮細胞を単離し、シグナルアッセイを行なった。Dll4 / Jag1 を過剰発現した HEK293T 細胞 / *EOGT*^{null} 細胞を、WT / *Eogt*^{-/-}マウスの肺血管内皮細胞上で 16 時間共培養し、マウス特異的 *Hey1* プライマーを用いて定量的 PCR を行い、*Hey1* の発現量の変化を解析した。5. Dll4-Fc 又は Jag1-Fc をあらかじめビーズに結合させ、*Eogt*、*Notch1*、*Eogt* 及び *Notch1* を遺伝子導入した HEK293T 細胞又は *EOGT*^{null} と培養し、それらビーズの結合量を比較した。6. 既報から推測された O-GlcNAc 修飾に必要な配

列(CXXGL/YFT/SGX_{3,4}C)をもとに、マウス、ヒト、ラット、チャイニーズハムスター、ゼブラフィッシュの間で共通して保存された Notch1 の EGF ドメインを見出した。その中で Notch1 EGF2、10、17、20 のセリン/スレオニン残基をアラニンに置換した変異体(Notch1 O-GlcNAc 修飾部位のアラニン置換変異体)を作成し、ウエスタンブロットで O-GlcNAc 修飾の変化を評価した。Notch1 及び Notch1 O-GlcNAc 修飾部位のアラニン置換変異体の細胞膜での発現量は、フローサイトメトリーで検出した。さらに、Notch1 O-GlcNAc 修飾部位のアラニン置換変異体に対する Dll4 又は Jag1 の結合量の変化を解析した。

【結果】

1. *Eogt* はマウス網膜において、血管内皮細胞に高発現していることが明らかになった(Figure 1)。2. 生後 15 日目(P15)の *Eogt*^{-/-}マウス網膜血管では、WT マウスと比べて異常な血管新生を示し(Figure 2)、さらに血管の脆弱化を確認した(Figure 3)。3. P14 の *Eogt*^{-/-}マウスの脳血管内皮細胞では、Notch シグナル標的遺伝子である *Hes1* と *Hey1* の発現量が減少し、Notch のリガンドである *Dll4* の発現量も減少した。一方、Notch シグナルにより発現が抑制される *Vegfr 2/3* の発現量は増加していた(Figure 4)。

4. *Dll4* を過剰発現させた HEK293T/*EOGT*^{null}細胞と WT マウス肺血管内皮細胞を共培養させた結果、*Hey1* の発現量が上昇した。しかし、*Eogt*^{-/-}マウス肺血管内皮細胞と共培養した時は、*Hey1* の発現量の上昇は認められなかった。一方、*Jag1* を過剰発現させた HEK293T/*EOGT*^{null}細胞は、共培養した WT マウス肺血管内皮細胞及び *Eogt*^{-/-}マウス肺血管内皮細胞で *Hey1* の発現を上昇させた(Figure 5)。5. *EOGT*^{null}細胞において、Notch1-Dll4 の結合量の低下が認められた。一方、Notch1-Jag1 の結合量には異常は認められなかった(Figure 6)。6. マウス、ヒト、ラット、チャイニーズハムスター、ゼブラフィッシュで共通して保存されている Notch1 の O-GlcNAc 修飾部位を解析した結果、11 個の EGF ドメインが候補として特定された(Figure 7)。この結果をもとに、Notch1 O-GlcNAc 修飾部位のアラニン置換変異体を作成すると、O-GlcNAc 修飾はほぼ消失した。また、Notch1 O-GlcNAc 修飾部位のアラニン置換変異体とリガンドとの結合量を解析すると、*Dll4* との結合量は低下したが、*Jag1* との結合量には変化がなかった(Figure 8)。

【結論】

Eogt は、Notch1 受容体の特定の EGF リピートに O-GlcNAc 修飾を付加することで、Notch1 受容体と Dll リガンドとの相互作用を特異的に制御していることが明らかになった。