

主論文の要旨

**Xylosyl Extension of *O*-Glucose Glycans
on the Extracellular Domain of NOTCH1
and NOTCH2 Regulates Notch Cell Surface Trafficking**

NOTCH1, NOTCH2 細胞外ドメインにおける
O-グルコース糖鎖のキシロース伸長は細胞表面への
Notchの輸送を制御する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導：日比 英晴 教授)

浦田 悠輔

【緒言】

Notch シグナル伝達経路は、進化的に非常によく保存された、多細胞生物個体における細胞の運命決定に重要な役割を果たす細胞間情報伝達経路である。Notch 受容体の細胞外部位には 29-36 個の上皮増殖因子様 (EGF) ドメインの繰り返し構造が存在し、この EGF ドメインへの *O*-グルコースなどの *O*-結合型糖鎖修飾は、その活性化に必須である。近年、この *O*-グルコース糖鎖修飾の異常が、種々の癌の病態や肢帯型筋ジストロフィーなどの遺伝病に関わっていることが明らかになってきた。Notch 受容体細胞外ドメインにおける *O*-グルコース単糖には、キシロース転移酵素 *GXYLT1* および *GXYLT2* によって 1 つ目のキシロースが付加され、*XXYLT1* によって 2 つ目のキシロースが付加される。Notch 上の *O*-グルコース糖鎖の伸長度、そして、糖鎖によって Notch 受容体の活性化が制御される分子機構は解明されていない。本研究では、*O*-グルコース糖鎖の構造と、キシロース伸長の Notch シグナルにおける役割について調べた。

【方法】

HEK293T 細胞において、1 つ目のキシロースを付加する *GXYLT1*、*GXYLT2* のダブルノックアウト (DKO) 細胞、2 つ目のキシロースを付加する *XXYLT1* のノックアウト (KO) 細胞を CRISPR/Cas9 技術により作製した。野生型及び、KO 細胞において、強制発現させた NOTCH1 または NOTCH2 の細胞外部位を培地に分泌させ、回収した後に Ni-NTA アガロース アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製物を還元/アルキル化し、10% SDS-PAGE で分離、GelCode ブルー染色で可視化したバンドを切り取り、ゲル内プロテアーゼ (トリプシン、キモトリプシン、V8) 消化し、得られた消化産物を Zip-Tip (C18) を使用して精製および濃縮し、Orbitrap Fusion LC-MS 質量分析計を用いて糖鎖修飾を解析した。

野生型及び、各 KO 細胞において、内因性 NOTCH の細胞表面発現をフローサイトメトリーにて調べた。また、N 末端 FLAG タグ付き全長 NOTCH1 と C 末端 FLAG タグ付き全長 NOTCH2 を細胞内で GFP と共に過剰発現させ、抗 FLAG 抗体と抗マウス NOTCH2 抗体を使用したフローサイトメトリーで、GFP 陽性細胞をゲーティングし、NOTCH1 と NOTCH2 の発現を調べた。野生型及び、各 KO 細胞に NOTCH 細胞外ドメイン NOTCH1 EGF1-36 または NOTCH2 EGF1-36 を IgG 共に強制発現し培地に分泌させ、培地を回収し、また細胞は可溶化し、分泌実験をウェスタンブロットにより行なった。トランスフェクション効率は IgG にて補正した。

【結果】

質量分析により、NOTCH1 の全 17 個箇所の *O*-グルコース糖鎖修飾を受ける EGF リピートを、NOTCH2 の 16 箇所の EGF リピートの糖鎖修飾を解析することができた。糖鎖修飾の度合いは EGF ドメイン間で異なるもの、NOTCH1、NOTCH2 の 17 箇所のうち 12 個の EGF ドメインで *O*-グルコースグリコフォームの 70%

以上がキシロース伸長の *O*-グルコース三糖であり (Figure 1、Figure 2、Figure 3)、NOTCH1 EGF27 などキシロース伸長が見られない EGF ドメインも一部存在した。*GXYLT1/2*DKO 細胞では、キシロース伸長が完全に消失しており、また *XXYLT1* KO 細胞では、1 つ目のキシロースの付加には変化がなく、2 つ目のキシロースの付加が消失した (Figure 2、Figure 3)。キシロース伸長の消失は、*GXYLT1/2* DKO 細胞において、NOTCH1 発現ベクターと、*GXYLT1* および *GXYLT2* 発現ベクターとの共トランスフェクションによって、レスキューされることが確認された。同様に、*XXYLT1* KO 細胞の NOTCH1 発現ベクターと、*XXYLT1* 発現ベクターとの共トランスフェクションによって、NOTCH1 上の *O*-グルコース糖鎖のキシロース伸長がレスキューされた (Figure 4)。

フローサイトメトリーの結果より、野生型細胞と、各 KO 細胞では、内因性 NOTCH1、NOTCH2 の細胞表面発現レベルに差は見られなかったが (Figure 5)、各々の NOTCH を強制発現させた場合には、各 KO 細胞で細胞表面発現レベルが野生型に比べ有意に低下した。(Figure 6)。さらに、野生型対照細胞と比較して、培養液に分泌される NOTCH1 EGF1-36 タンパク質のレベルは、*GXYLT1/2* DKO 細胞で有意に低かった (Figure 7A、7B)。統計的に有意ではなかったが、*XXYLT1* KO 細胞においても NOTCH1 EGF1-36 の分泌は、野生型対照細胞と比較して減少する傾向が観察された (Figure 7A、7B)。*GXYLT1/2*DKO 細胞における NOTCH1 EGF1-36 タンパク質の分泌の減少は、*GXYLT1* または *GXYLT2* 発現ベクターを単独で、または組み合わせてトランスフェクションすることでレスキューされた (Figure 7A、7B)。NOTCH2 についても同様の結果が得られた (Figure 7C、7D)。

【考察】

Notch シグナル伝達で中心的な役割を果たす Notch 受容体の機能は、細胞内のさまざまなレベルで調節されており、糖鎖修飾はそれらの 1 つであると考えられる。先行研究において、*O*-グルコース転移酵素 *POGLUT1* の遺伝子破壊実験などから、*O*-グルコース糖鎖の付加は EGF リピートを安定化することで Notch などの EGF 含有タンパク質の品質管理に関与することが示唆されていた。本研究では、まず、Notch 細胞外部位における *O*-グルコース糖鎖のキシロースによる伸長を、質量分析により、世の中で初めて網羅的に半定量解析した。さらに、Notch タンパク質の品質管理におけるキシロースによる伸長の役割を明らかにするために、HEK293T 細胞にてキシロース転移酵素遺伝子の KO 細胞を樹立し、NOTCH1 および NOTCH2 の細胞表面発現を調べた。キシロースによる伸長が失われると、内因性 NOTCH1 または NOTCH2 の輸送に変化は観察されなかったが、過剰発現させた NOTCH1 および NOTCH2 の輸送の減少が観察された。このことより、NOTCH1 と NOTCH2 の複数の EGF リピートにおける *O*-グルコース糖鎖のキシロースによるタンパク質安定化効果が、NOTCH1 と NOTCH2 の細胞表面への効率的な輸送を促進することが考えられる (Figure 8)。

糖鎖修飾を網羅的に詳細に解析した結果、NOTCH1 と NOTCH2 の EGF リピートの大部分が *O*-グルコース三糖で修飾されるのに対し、NOTCH1 EGF27 など、キシロース伸長が見られない EGF ドメインも一部存在することが判明した。さらに、HEK293T 細胞由来の NOTCH1 の EGF10 を含む特定の EGF リピートで、これまでに報告のない *O*-結合型糖鎖が同定された (Figure 2、Figure 3)。この糖鎖は、直鎖型で、ヘキソースおよびシアル酸による伸長を受けた構造であった。この新しいヘキソースによる伸長を含む EGF リピートは、NOTCH2 ではなく、NOTCH1 のリガンド結合領域に存在しているので、Notch パラログ特異的に Notch シグナル伝達経路に関与しているかもしれない。本研究では、培養細胞における強制発現系で、NOTCH1、NOTCH2 の *O*-グルコース糖鎖のキシロースによる伸長が、Notch 受容体の輸送の調節に関与している可能性を示した。Notch 受容体の発現レベルは、組織や細胞の種類によって大きく異なり、胚発生時の体節形成過程においては発現レベルがオシレーションすることも知られている。今後、生体内において、*O*-グルコース糖鎖のキシロース伸長が Notch 受容体の機能調節にどのように関与するか、さらに研究する必要がある。

【結語】

NOTCH1 と NOTCH2 の細胞外ドメインにおける複数の EGF リピートに対するキシロシル伸長の構造安定化効果が、NOTCH1 と NOTCH2 の細胞表面への効率的な輸送を促進することが示唆された。