

令和元年5月19日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06743

研究課題名(和文)腫瘍抑制因子Notch1がキシロース付加によって不活性化される分子機構の解析

研究課題名(英文)Elucidating the molecular mechanism by which tumor suppressor Notch1 is inactivated by xylosyl-extension

研究代表者

竹内 英之(Takeuchi, Hideyuki)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80361608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、AMLや扁平上皮癌の発生と細胞増殖の亢進は、Notch1へのキシロース付加の異常な亢進によるNotch1の不活性化に起因しているという仮説を立てた。研究の第一段階として、本研究では、Notch1上の0-グルコース糖鎖修飾の構造と、そして、キシロース転移酵素遺伝子の欠損により、0-グルコース糖鎖の伸長度の改変が可能であるか調べた。本解析により、Notch1の全ての0-グルコース糖鎖修飾プロファイルを明らかにした。さらに、XXYL1のKOにより、非還元末端のキシロース付加が消失し、GXYL1とGXYL2両者のKOにより、0-グルコースへのキシロースの付加が消失した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

0-グルコース糖鎖キシロース伸長は、Notch1の小胞体内品質管理と、細胞表面におけるリガンド結合に寄与している可能性がある。Notch1上の0-グルコース糖鎖修飾プロファイルは、これまでに報告がなかったが、本研究により、初めてそれが明らかとなった。現段階では培養細胞由来の解析結果であり、今後、生体試料でも同様の解析をしていく必要がある。そして、それらの情報を活用することにより、Notch1受容体を介したシグナル伝達機構の制御に関する分子メカニズムの解明と、Notchシグナルの異常に起因する病態の診断および治療法の開発に資することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The PI hypothesized that carcinogenesis and elevated proliferation of AML and squamous carcinoma are caused by aberrantly increased xylosylation of 0-glucose glycans on Notch1. Here, as an initial step of our long-term research, we examined the structures of 0-glucose glycans on Notch1 and whether it is possible to manipulate the extent of xylosyl-extension of 0-glucose glycans on Notch1 by genetically engineering the genes that encode the xylosyltransferases. We accomplished the comprehensive analysis of 0-glucose glycans on Notch1 produced in cultured cell lines. Furthermore, as expected, knocking out of XXYL1 resulted in loss of the addition of the terminal xylose residues at a non-reducing end of 0-glucose glycans on Notch1, and knocking out both GXYL1 and GXYL2 resulted in loss of xylosyl-extension of 0-glucose glycans on Notch1.

研究分野：Glycobiology

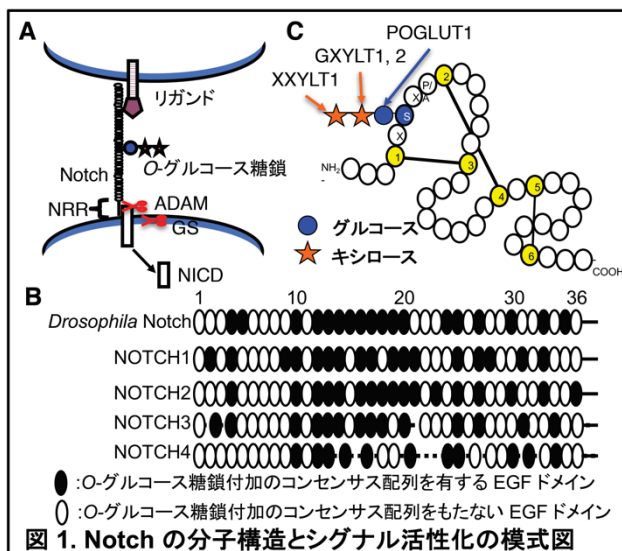
キーワード：0-グルコース糖鎖 Notch1 Notch シグナル 糖転移酵素 キシロース 腫瘍抑制因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

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(1)。近年の研究により、Notch シグナルの破綻が多くの種類の癌の発生、悪性度の進展、そして、転移に関わっていることが明らかになってきた(2)。Notch シグナル伝達経路は、I 型膜蛋白質受容体 Notch にリガンドが結合することによって活性化する(図 1A)。結合したリガンドのエンドサイトーシスによって、NRR と呼ばれる Notch の細胞外抑制性領域に構造変化が起こり、ADAM プロテアーゼ、そして、ガンマセクレターゼ (GS) による Notch の切断が起こり、切り出された Notch の細胞内ドメイン (NICD) が核内に移行して、下流の遺伝子の転写を活性化する。多くの種類の癌で Notch シグナルの異常な亢進が観察される一方、急性骨髄性白血病 (AML) や扁平上皮癌など、ある種の癌では、Notch シグナルの低下が発癌と悪性度の進展に関与している。

申請者は、Notch の細胞外部位における糖鎖修飾が、その活性化に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた(3)。Notch 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、この部分がリガンドとの結合を担っている(図 1B)。個々の EGF ドメインは、およそ 40 アミノ酸残基からなり、6 つのシステイン残基が 3 本のジスルフィド結合を形成し、その立体構造を保持している(図 1C)。申請者は、Notch の EGF ドメインに O-グルコース



コースを付加する糖転移酵素 POGLUT1/Rumi を、Notch の活性化に必須の因子として世界で初めて同定した(4)。続けて、POGLUT1/Rumi が哺乳類にも保存されており、マウス発生過程における Notch の機能に必要で(5,6)、Notch1 の活性化には O-グルコース糖鎖修飾が必要であることを示した(7)。さらに、O-グルコース糖鎖のキシロースによる伸長を担うキシロース転移酵素 GXYLT1 と GXYLT2、および XXYLT1 を同定した(図 1C)(8,9)。興味深いことに、ショウジョウバエにおいては、O-グルコース糖鎖のキシロースによる伸長は、Delta リガンドによる Notch の活性化を抑制する(10,11)。

AML や扁平上皮癌においては、Notch1 の不活性化が細胞増殖を促進する(12-15)。AML では、Notch リガンドも受容体も発現しているにもかかわらず、Notch1 は不活性化しており、その機序は不明であった。最近、Notch1 の NRR に結合して、その活性化を促す低分子化合物が発見され、AML 治療への応用の可能性が示された(16)。このことは、AML では Notch1 のリガンド結合から、NRR の構造変化に至るまでの過程に異常があることを示唆している。Wouters らは、526 例の AML 患者標本を解析した結果、GXYLT2 の発現が健常人に比べて有意に亢進していることを報告している(17)。また、肺、食道、および頭頸部由来扁平上皮癌を含む、多くの癌で XXYLT1 の増幅がみられる(18)。食道癌では、この遺伝子増幅がみられる患者の生存期間が、増幅の見られない患者のそれに比べて有意に短い。以上より、申請者は、AML や扁平上皮癌の発生と細胞増殖の亢進は、Notch1 へのキシロース付加の異常な亢進による Notch1 の不活性化に起因しているという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

研究の第一段階として、本研究では、培養細胞の発現する Notch1 上の *O*-グルコース糖鎖修飾の構造を明らかにすること、そして、キシロース転移酵素遺伝子を CRISPR/Cas9 技術によって欠損させ、*O*-グルコース糖鎖の伸長度の改変が可能であるか調べることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3-1. キシロース転移酵素の発現レベルの解析

培養細胞 HEK293T における、GXylT1、GXylT2、XXylT1 の発現を既報と同様に、RT-qPCR 法によって調べた (19)。

### 3-2. キシロース転移酵素遺伝子のターゲティング

CRISPR/Cas9 技術を用いて *GXYLT1*、*GXYLT2*、および *XXYLT1* を KO した細胞を既報通り作製した (20)。標的遺伝子の特異的欠損は標的ゲノム配列のシーケンシングにより確認した。

### 3-3. Notch1 の糖プロテオミクス解析

既報の通り、Notch1 EGF1-18 および EGF19-36 を強制発現させ、培養上清に分泌させ、精製した (7)。これらの蛋白質をプロテアーゼ消化後、質量分析計 Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific) を用いて、*O*-グルコース糖鎖の付加位置と構造を解析し、野生型の細胞の場合と比較した。

## 4. 研究成果

### 4-1. キシロース転移酵素の発現レベルの解析

RT-qPCR 法により、遺伝子発現レベルを調べた結果を図 2 に示した。*O*-グルコース転移酵素 POGlut1 のみならず、*O*-グルコース糖鎖の伸長に関与する糖転移酵素 GXylT1、GXylT2、そして、XXylT1 いずれにも HEK293T 細胞には同程度に発現していることが明らかとなった。

	GXylT1			GXylT2			XXylT1			GAPDH
primer	Set1	Set2	Set3	Set1	Set2	Set3	Set1	Set1	Set3	
Ct value	29.51	26.18	26.82	28.42	27.36	26.27	30.77	29.61	29.04	18.89

図2 RT-qPCR による野生型の HEK293T 細胞におけるキシロース転移酵素発現レベルの解析

### 4-2. キシロース転移酵素遺伝子のターゲティング

HEK293T 細胞には、3 種類のキシロース転移酵素が発現していることが判明したので、それらの遺伝子を CRISPR/Cas9 法によりノックアウト (KO) することとした。GFP 陽性細胞を 96 穴プレートにてシングルセルクローニングし、各クローンのゲノム画分を鋳型として標的配列を含む領域を PCR 法によって増幅し、野生型とは異なる大きさのバンドが検出されたクローンについて、詳細なゲノム配列の解析を行った。以上の操作により、GXylT1、GXylT2、そして、XXylT1 の KO 細胞を得た。さらに、GXylT1 KO 細胞を使用して、GXylT2 のターゲティングを行い、GXylT1 と GXylT2 両者の KO 細胞を得た。

### 4-3. Notch1 の糖プロテオミクス解析

キシロース転移酵素の機能的欠損を確認することを目的として、マウス Notch1 の細胞外部位の EGF1-18 および EGF19-36 をコードする cDNA を pSecTag2c ベクターにクローニングし、C 末端に MycHis タグが付加した形でタンパク質が培養上清に分泌されるように、発現ベクターを構築した。これを野生型の HEK293T 細胞クローン (ID: 1B2)、GXylT1 KO 細胞クローン (ID: 5D4)、GXylT2 KO 細胞クローン (ID: 7B3)、GXylT1 と GXylT2 KO 細胞クローン (ID: 13D3)、XXylT1 KO 細胞クローン (ID: 3C4) に遺伝子導入し、培養上清から 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 Notch1 タンパク質を濃縮、精製した。タンパク質

の発現は、抗 Myc タグ抗体によるウェスタンブロット解析と (Data not shown)、GelCode Blue 染色により確認した (図 3)。

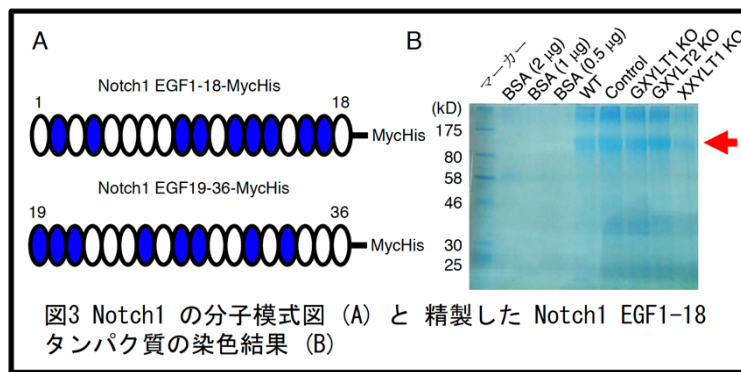


図3 Notch1 の分子模式図 (A) と 精製した Notch1 EGF1-18 タンパク質の染色結果 (B)

Notch1 上の *O*-グルコース糖鎖修飾を解析するために、精製したタンパク質の還元アルキル化と、トリプシンによるプロテアーゼ消化を行った。消化産物を Zip-Tip を用いて濃縮、精製し、質量分析を行った。Notch1 には、*O*-グルコースコンセンサス配列を含む EGF リピートが 17 存在するが、本解析により、全ての *O*-グルコース糖鎖修飾プロファイルが明らかとなった。このうち、6 箇所の EGF リピートにおける *O*-グルコース糖鎖修飾を受けたイオンの相対値をまとめた (図 4)。野生型において、*O*-グルコース糖鎖付加自体の割合が異なり、特に、EGF28 や EGF33 は、およそ 50-60% であることが本研究から明らかとなった。キシロース伸長については、当初の予想通り、XXylT1 の KO により、非還元末端のキシロース付加が消失した。GXylT1 と GXylT2 両者の KO により、*O*-グルコース単糖へのキシロースの付加が消失した。興味深いことに、GXylT1 の KO 細胞では、*O*-グルコース単糖へのキシロースの付加の減少が、どの EGF リピートにおいても減少が観察されたのに対し、GXylT2 の KO 細胞では有意な *O*-グルコース糖鎖修飾の変化は観察されなかった。

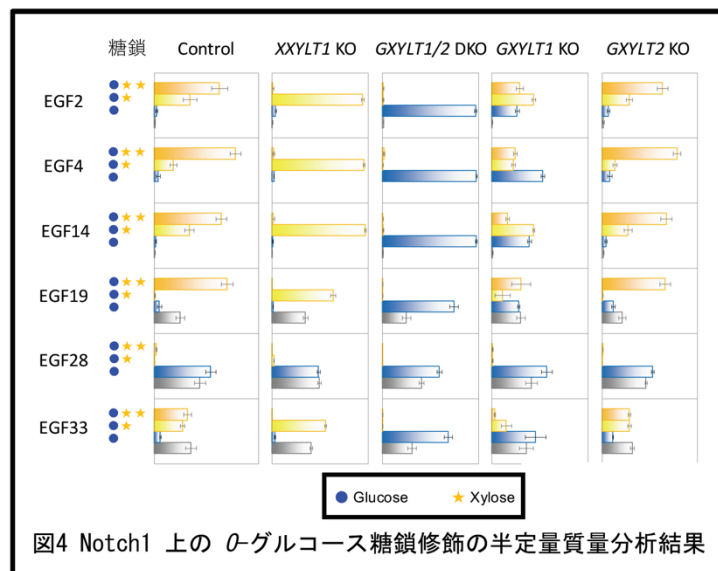


図4 Notch1 上の *O*-グルコース糖鎖修飾の半定量質量分析結果

*O*-グルコース糖鎖キシロース伸長は、Notch1 の小胞体内品質管理と、細胞表面におけるリガンド結合に寄与している可能性がある。本研究により、Notch1 上の *O*-グルコース糖鎖修飾プロファイルが初めて明らかとなった。ゆえに、今後、これらの情報を活用することにより、Notch1 受容体を介したシグナル伝達機構の制御に関する分子メカニズムの解明に資することが期待される。

<引用文献>

1. Bray, S. J. (2016) Notch signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 722-735
2. Ntziachristos, P., et al. (2014) From fly wings to targeted cancer therapies: a centennial for notch signaling. *Cancer Cell* **25**, 318-334
3. Takeuchi, H., and Haltiwanger, R. S. (2014) Significance of glycosylation in Notch signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **453**, 235-242
4. Acar, M., et al. (2008) Rumi is a CAP10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling. *Cell* **132**, 247-258
5. Takeuchi, H., et al. (2011) Rumi functions as both a protein O-glycosyltransferase and a protein O-xylosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 16600-16605
6. Fernandez-Valdivia, R., et al. (2011) Regulation of mammalian Notch signaling and embryonic development by the protein O-glycosyltransferase Rumi. *Development* **138**, 1925-1934
7. Rana, N. A., et al. (2011) O-glucose trisaccharide is present at high but variable stoichiometry at multiple sites on mouse Notch1. *J Biol Chem* **286**, 31623-31637
8. Sethi, M. K., et al. (2010) Identification of glycosyltransferase 8 family members as xylosyltransferases acting on O-glycosylated notch epidermal growth factor repeats. *J Biol Chem* **285**, 1582-1586
9. Sethi, M. K., et al. (2012) Molecular cloning of a xylosyltransferase that transfers the second xylose to O-glycosylated epidermal growth factor repeats of notch. *J Biol Chem* **287**, 2739-2748
10. Lee, T. V., et al. (2013) Negative regulation of notch signaling by xylose. *PLoS Genet* **9**, e1003547
11. Lee, T. V., et al. (2017) Xylosylation of the Notch receptor preserves the balance between its activation by trans-Delta and inhibition by cis-ligands in Drosophila. *PLoS Genet* **13**, e1006723
12. Kannan, S., et al. (2013) Notch activation inhibits AML growth and survival: a potential therapeutic approach. *J Exp Med* **210**, 321-337
13. Lobry, C., et al. (2013) Notch pathway activation targets AML-initiating cell homeostasis and differentiation. *J Exp Med* **210**, 301-319
14. Wang, N. J., et al. (2011) Loss-of-function mutations in Notch receptors in cutaneous and lung squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 17761-17766
15. Brooks, Y. S., et al. (2014) Multifactorial ER $\beta$  and NOTCH1 control of squamous differentiation and cancer. *J Clin Invest* **124**, 2260-2276
16. Ye, Q., et al. (2016) Small molecule activation of NOTCH signaling inhibits acute myeloid leukemia. *Sci Rep* **6**, 26510
17. Wouters, B. J., et al. (2009) Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* **113**, 3088-3091
18. Yu, H., et al. (2015) Notch-modifying xylosyltransferase structures support an SNI-like retaining mechanism. *Nat Chem Biol* **11**, 847-854
19. Sawaguchi, S., et al. (2017) O-GlcNAc on NOTCH1 EGF repeats regulates ligand-induced Notch signaling and vascular development in mammals. *Elife* **6**, e24419
20. Benz, B. A., et al. (2016) Genetic and biochemical evidence that gastrulation defects in Pofut2 mutants result from defects in ADAMTS9 secretion. *Dev Biol* **416**, 111-122

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

1. Hongjun Yu and Hideyuki Takeuchi. Protein O-glycosylation: another essential role of glucose in biology. *Current Opinion in Structural Biology* 査読有 (2019) **56**, 64-71

〔学会発表〕 (計 5 件)

1. Hideyuki Takeuchi. Significant roles of O-glucose glycans in mammalian Notch trafficking and signaling. Annual Meeting of Society for Glycobiology. (2018) 招待講演. 国際学会.
2. 竹内英之. 新しい 2 種類のタンパク質 O-グルコース転移酵素 (POGLUT) は POGLUT1 とは異なり Notch リガンド結合表面のアミノ酸を修飾する. 第 91 回日本生化学会. 2018 年.
3. 竹内英之. O-結合型糖鎖は上皮増殖因子様リピートの安定性を変化させることにより Notch のトラフィックを制御する. 第 41 回日本分子生物学会年会. 2018 年. 招待講演.
4. Wataru Saiki, Yusuke Urata, Yuya Senoo, Yohei Tsukamoto, Chenyu Ma, Tetsuya Okajima, and Hideyuki Takeuchi. Exploring the significance of xylosyl-extension of O-glucose

glycans on EGF repeats for Notch signaling in mammals. Annual Meeting of Society for Glycobiology. (2018)

5. 浦田悠輔, 竹内英之, 岡島徹也 O-グルコース糖鎖のキシロシル化の Notch シグナルにおける役割の解析. 第 91 回日本生化学会. 2018 年.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：浦田 悠輔

ローマ字氏名：(URATA, yusuke)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。