

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22490

研究課題名(和文) 生体内において自由自在にNotchシグナルの強弱を変化させる分子ハンドルの創生

研究課題名(英文) Generation of a molecular handle that modulates the strength of Notch signaling in vivo

研究代表者

竹内 英之 (Takeuchi, Hideyuki)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：80361608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：Notch シグナル伝達経路は、進化的によく保存された、多細胞生物における細胞の運命決定に重要な役割を果たす。また、Notch シグナルの破綻は癌の発生、悪性度の進展、転移に関わっている。研究代表者は、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。本研究では、タンパク質O-グルコース転移酵素POGLUT1を対象として、約1万化合物のスクリーニングを行い、POGLUT1に対して阻害作用を示す約50種類の化合物を得た。研究期間において、Notch受容体機能の糖鎖修飾による制御機構に関する原著論文8報、並びに、英文総説3報の発表に貢献した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多細胞生物における細胞間シグナル伝達は、個体の恒常性を維持するために重要である。また、Notchシグナル伝達の異常によって病気になることも知られている。Notchシグナルは糖鎖修飾で制御される。本研究では、この糖鎖修飾を変化させる低分子化合物を探索し、グルコース転移酵素に対する阻害剤を見つけることに成功した。本成果は、がんなどのNotchシグナルの異常に起因する病気の治療に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The Notch signaling pathway is evolutionarily well conserved and plays an important role in determining cell fate in multicellular organisms. Disruption of Notch signaling is also involved in cancer development, malignant progression, and metastasis. Glycosylation at the extracellular domain of Notch plays an important role in its activation. Here we screened approximately 10,000 compounds against the protein O-glucosyltransferase 1 POGLUT1, and obtained about 50 compounds showing inhibitory activity against POGLUT1. During the research period, we contributed to the publication of 8 original papers and 3 review papers on the regulatory mechanism of Notch receptor function by glycosylation.

研究分野：糖鎖生物学

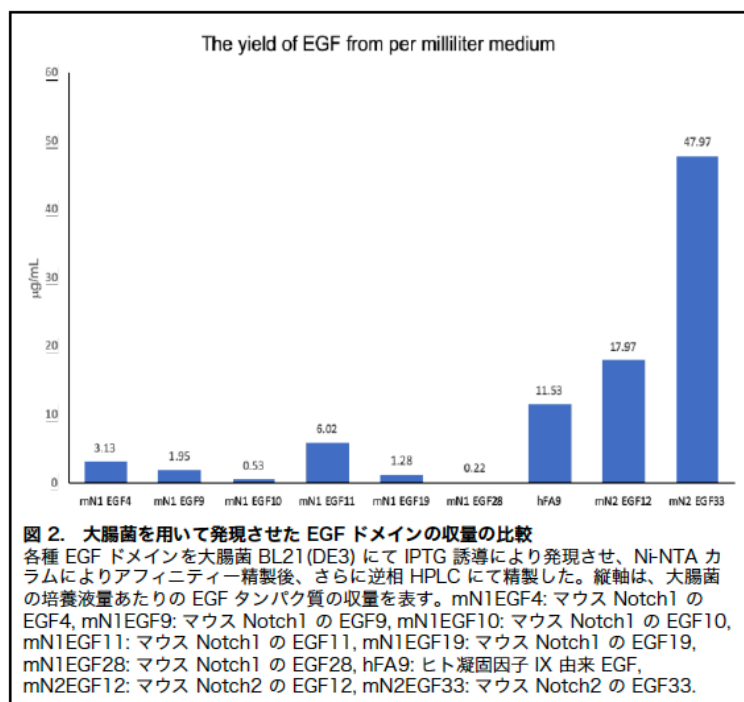
キーワード：糖鎖 O-グルコース糖鎖修飾 糖転移酵素 Notchシグナル 阻害剤

られた化合物について、培養細胞を用いた Notch リポーターアッセイを行う [Rana *et al.* 2011 *J Biol Chem*]. Jafar-Nejad 博士がショウジョウバエ個体を用い Notch シグナルに対する影響を調べる [Lee *et al.* 2017 *Plos Genetics*]. GXYL1 と GXYL2 の基質との複合体の構造解析を行う。なぜなら、細かな特異性に差異のある [Takeuchi *et al.* 2012 *J Biol Chem*] 3 種類のキシロース転移酵素、GXYL1、GXYL2、XXYL1 の構造上の差異を明らかにすることで、より効率良く、選択的な阻害薬の探索を進めることができるからである。

4. 研究成果

タンパク質 O-グルコース転移酵素 POGLUT1 のアッセイ系を開発した。具体的には、まず、POGLUT1 タンパク質を既報に通り [Takeuchi *et al.* 2012 *J Biol Chem*]、C-末端に MycHis タグを付加した形で、HEK293T 細胞に発現、培地に分泌されてきた POGLUT1 タンパク質を Ni-NTA アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製した。POGLUT1 タンパク質の発現、並びに、量と純度は、SDS-PAGE 後の抗 Myc 抗体を用いたウェスタンブロッティング、並びに、BSA をスタンダードとして用いたクマシー染色により確かめた。

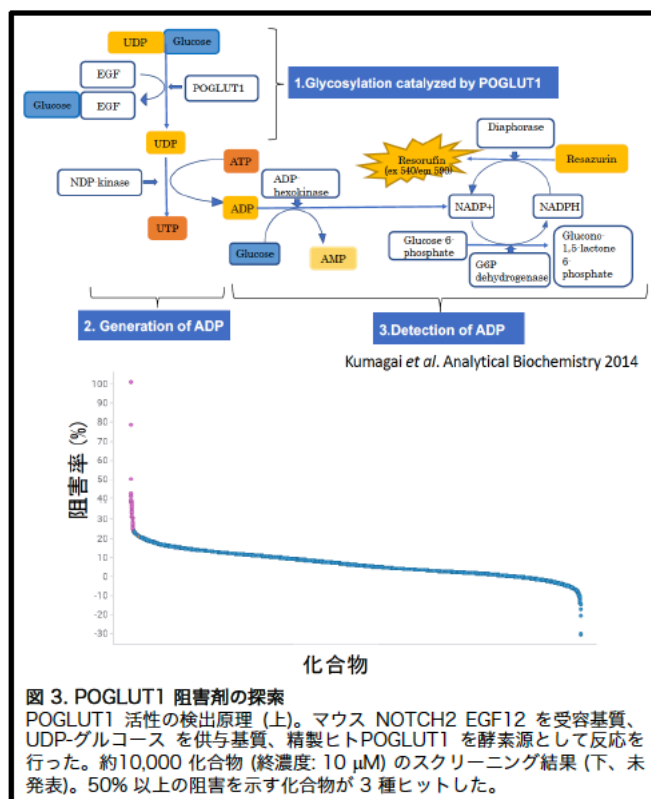
次に、酵素アッセイ系の受容基質として、上皮増殖因子様 (EGF) ドメインの作製を行った。EGF ドメインをコードする cDNA 配列を pET20b(+) ベクターに組み込み、C-末端に His タグが付加する形で大腸菌に発現させた。EGF ドメインの発現とファオールディングは、そのアミノ酸配列によって異なるため、本研究では、複数の異なる EGF ドメインを発現させた。その結果、図に示す通り、ヒト凝固因子 IX (hFA9)、マウス Notch2 の EGF12 (mN2EGF12)、そして、マウス Notch2 の EGF33 (mN2EGF33) が、本実験系では、最も収量が高いことが判明した (図 2)。その後の解析で、マウス Notch2 サンプルに含まれている正しく折りたたまれた分子種の割合が多かったこと、正しく折りたたまれた分子種は POGLUT1 により O-グルコース修飾を受けたこと、さらに、本グループの先行する研究成果により、細胞に発現させた Notch2 の EGF12 は、O-グルコース三糖構造でよく修飾されることが判明したことなどから、本研究の阻害剤スクリーニングにおいては、mN2EGF12 を使用することとした。



東京大学創薬機構の支援を受け、化合物ライブラリースクリーニングを実施した。熊谷らの方法に準じて酵素反応と活性測定を行った [Kumagai *et al.* 2014 *Anal Biochem*]. 反応条件を検討後、1536 ウェルプレートにて、約 1 万種類の化合物に対して、一次スクリーニングを行った結果、阻害活性を示す 51 種類の化合物が同定された (図 3)。また、数は少ないものの、POGLUT1 の酵素活性を上昇させるような化合物が含まれていることが判明した。残念ながら、一次スクリーニングで同定された 51 種類の化合物のうちの 6 種類は、複数ある反応産物の検出反応のうちの ADP 検出反応を阻害していることが分かった。残りの 45 種類のうち、さらなる解析により、少なくとも 10 種類程度は、化合物濃度依存的に POGLUT1 活性を阻害することが判明した。

これらの化合物の特異性の解析が今後の課題となる。例えば、ヒトの有するおよそ 200 種類の糖転移酵素に対して、これらの化合物が阻害活性を示すのか。特に、POGLUT1 と同じように、EGF ドメインに O-グルコースを転移する POGLUT2 や POGLUT3 に対して [Takeuchi *et al.* 2018 *PNAS*]、阻害活性を示すのか、示すとしたら、その親和性に違いがあるのか調べる必要がある。さらに、これらの化合物が、細胞に取り込まれて、実際に Notch やその他の EGF ドメイン

を有する糖タンパク質における O-グルコース糖鎖修飾を阻害し、それらのタンパク質の機能を変化させるのは興味深い課題である。Notch シグナルの活性化は、異なる種類のがんで報告されている。POGLUT1 による Notch 受容体の糖鎖修飾は、受容体が活性化されるために必須である。ゆえに、POGLUT1 の阻害剤は、がん細胞における Notch の活性化を抑制することが期待される。また、本スクリーニングでは、程度は弱いながらも、POGLUT1 の活性を上昇させる化合物も同定された。*POGLUT1* 遺伝子の変異によって、POGLUT1 の活性の減少することにより、Dowling-Degos 病や、ある種の筋ジストロフィーが引き起こされることが知られている [Urata and Takeuchi *et al.* 2020 *Dev Growth Differ*]。そういった変異を持つ POGLUT1 に対しても、今回のスクリーニングで用いた野生型の POGLUT1 に対する作用と同様に、活性を上昇させるのかどうか早急に調べる必要がある。なぜなら、POGLUT1 の「賦活剤」が、上に挙げた希少疾患の治療に有効である可能性を示唆するからである。



本研究では、ここまで記述した化合物のランダムハイスループットスクリーニングに加えて、POGLUT1 や XXYL1 の三次元立体構造情報に基づく、阻害化合物の探索も並行して行ったが、候補化合物は見出すことができたものの、実際に試験管内で阻害活性を示すものの同定には至らなかった。また、別のキシロース転移酵素 GXYL1 の構造解析も試みたが、主要な要因としてタンパク質の発現レベルが、POGLUT1 や XXYL1 よりもはるかに低いため、研究期間内での結晶化に至らなかった。

一般に糖転移酵素に対する阻害剤の開発は、キナーゼやグリコシダーゼに比べて、困難であることが知られている。したがって、糖転移酵素に対して働く阻害剤を見出した本研究の知見は、今後の応用面のみならず、学術的に非常に興味深いものであると考えられる。研究を進めることにより、さらなる糖質科学の発展に寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsukamoto Yohei, Ogawa Mitsutaka, Yogi Kentarou, Tashima Yuko, Takeuchi Hideyuki, Okajima Tetsuya	4. 巻 N/A
2. 論文標題 Glycoproteomics of NOTCH1 EGF repeat fragments overexpressed with different glycosyltransferases in HEK293T cells reveals insights into O-GlcNAcylation of NOTCH1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/glycob/cwac015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Piniello Beatriz, Lira-Navarrete Erandi, Takeuchi Hideyuki, Takeuchi Megumi, Haltiwanger Robert S., Hurtado-Guerrero Ramon, Rovira Carme	4. 巻 11
2. 論文標題 Asparagine Tautomerization in Glycosyltransferase Catalysis. The Molecular Mechanism of Protein N-Glycosylation by N-Glycosyltransferase 1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Catalysis	6. 最初と最後の頁 9926 ~ 9932
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscatal.1c01785	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Barua Rashu, Mizuno Kazuyuki, Tashima Yuko, Ogawa Mitsutaka, Takeuchi Hideyuki, Taguchi Ayumu, Okajima Tetsuya	4. 巻 26
2. 論文標題 Bioinformatics and Functional Analyses Implicate Potential Roles for EOGT and L-fringe in Pancreatic Cancers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 882 ~ 882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26040882	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yohei Tsukamoto and Hideyuki Takeuchi	4. 巻 1325
2. 論文標題 Other types of Glycosylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 117-135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-70115-4_5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saiki Wataru, Ma Chenyu, Okajima Tetsuya, Takeuchi Hideyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Current Views on the Roles of O-Glycosylation in Controlling Notch-Ligand Interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 309 ~ 309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom11020309	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ma Chenyu, Takeuchi Hideyuki, Hao Huilin, Yonekawa Chizuko, Nakajima Kazuki, Nagae Masamichi, Okajima Tetsuya, Haltiwanger Robert S., Kizuka Yasuhiko	4. 巻 21
2. 論文標題 Differential Labeling of Glycoproteins with Alkynyl Fucose Analogs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6007 ~ 6007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21176007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Urata Yusuke, Saiki Wataru, Tsukamoto Yohei, Sago Hiroaki, Hibi Hideharu, Okajima Tetsuya, Takeuchi Hideyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Xylosyl Extension of O-Glucose Glycans on the Extracellular Domain of NOTCH1 and NOTCH2 Regulates Notch Cell Surface Trafficking	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1220 ~ 1220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9051220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Alam Sayad Md. Didarul, Tsukamoto Yohei, Ogawa Mitsutaka, Senoo Yuya, Ikeda Kazutaka, Tashima Yuko, Takeuchi Hideyuki, Okajima Tetsuya	4. 巻 295
2. 論文標題 N-Glycans on EGF domain-specific O-GlcNAc transferase (EOGT) facilitate EOGT maturation and peripheral endoplasmic reticulum localization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 8560 ~ 8574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.012280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa M, Tashima Y, Sakaguchi Y, Takeuchi H and Okajima T	4. 巻 526
2. 論文標題 Contribution of extracellular O-GlcNAc to the stability of folded epidermal growth factor-like domains and Notch1 trafficking	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 184-190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Servian-Morilla E, Takeuchi H, Paradas C et al.	4. 巻 139
2. 論文標題 POGLUT1 biallelic mutations cause myopathy with reduced satellite cells, alpha-dystroglycan hypoglycosylation and a distinctive radiological pattern.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol	6. 最初と最後の頁 565-582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00401-019-02117-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ralser DJ, Takeuchi H, Betz RC et al.	4. 巻 139
2. 論文標題 Altered Notch signaling in Dowling-Degos disease: Additional mutations in POGLUT1 and further insights into disease pathogenesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol	6. 最初と最後の頁 960-964
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2018.10.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Urata Y and Takeuchi H	4. 巻 62
2. 論文標題 Effects of Notch glycosylation on health and diseases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dev Growth Differ	6. 最初と最後の頁 35-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12643	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yu H and Takeuchi H	4. 巻 56
2. 論文標題 Protein O-glycosylation: another essential role of glucose in biology.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Opin Struct Biol	6. 最初と最後の頁 64-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.sbi.2018.12.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 竹内英之
2. 発表標題 O-グルコース糖鎖修飾による Notch シグナル制御の意義
3. 学会等名 第 94 回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内英之
2. 発表標題 Notch O-グルコース糖鎖修飾の異常と筋病態との関連
3. 学会等名 第 44 回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内英之
2. 発表標題 O-グルコース糖鎖修飾による Notch 細胞間情報伝達の調節機構
3. 学会等名 第 18 回日本糖鎖科学コンソーシアム (JCGG) シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川光貴、田嶋優子、坂口大和、竹内英之、岡島徹也
2. 発表標題 細胞外 O-GlcNAc 修飾は EGF ドメインの安定性と Notch1 のトラフィッキングに寄与する
3. 学会等名 第 93 回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村澄香、小川光貴、竹内英之、岡島徹也、有森貴夫、高木淳一、相川京子
2. 発表標題 血液凝固第 XII 因子の活性化抑制における糖鎖修飾の役割
3. 学会等名 第 93 回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeuchi H, Urata Y, Tsukamoto Y, Saiki W, Senoo Y, Ma C, Wang WW, Aoki K, Tiemeyer M, and Okajima T
2. 発表標題 Significance of structurally diverse elongation of O-glucose glycans on Notch1 and Notch2
3. 学会等名 Annual Meeting of Society for Glycobiology (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 竹内 英之
2. 発表標題 O-グルコース糖鎖修飾による Notch シグナルの調節機構
3. 学会等名 第 92 回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 竹内 英之
2. 発表標題 O-グルコース糖鎖修飾による衛星細胞における Notch シグナル制御の重要性
3. 学会等名 日本筋学会第 5 回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 竹内 英之
2. 発表標題 Significance of protein O-glycosylation for regulation of Notch signaling in satellite cells
3. 学会等名 第 7 回若手による骨格筋細胞研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 北島健、佐藤ちひろ、門松健治、加藤晃一編	4. 発行年 2020年
2. 出版社 名古屋大学出版会	5. 総ページ数 295
3. 書名 糖鎖生物学 生命現象と糖鎖情報	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関