

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06038

研究課題名(和文) Notch受容体機能の膜組成への依存性の解析とシグナリング機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of Notch receptor signaling and its dependency on lipids

研究代表者

佐藤 毅 (Sato, Takeshi)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90403013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Notchシグナリングでは「異なるリガンドが同種受容体に結合し、その結果、同種タンパク質断片が細胞内に放出されるが、その放出様式が異なることで、異なる遺伝子発現が生じる」という context dependency が示されており、ここでの課題はこのメカニズムの詳細を知ることである。この事象に対し、リガンドが生体膜上の特異的脂質を認識しうることを計算科学の手法で見出し、これは、上述のメカニズムを語る上での基盤となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Notch受容体に関する基礎研究は発生学分野が中心となり、細胞生物学、生化学的研究が行われるようになった。疾患との関連も深く、医学、創薬的にも関心の高い研究対象であり、多くの研究がなされている。このシグナリングにおける context dependency 機構の解明は、受容体と脂質との協奏機構を解き明かす上で重要であり、本研究結果は今後の当該研究分野における道筋を示すものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：One of the most scientifically interesting phenomena in Notch signaling is its "context dependency". This context dependency can be explained as follow: Notch ligands activate distinct target through the same receptor. In this project we decided to get insight on the molecular mechanism of this phenomenon.

We have worked on molecular dynamics on looking at Notch ligand and certain lipids and found that each kind of ligand has preference in binding for a certain lipid such as GM1 or GM3. This selectivity, or specificity, may explain the context dependency. "Wet" experiments are in progress to verify the validity of results from the MD simulation.

研究分野：生物物理学

キーワード：Notchシグナリング Context dependency

1. 研究開始当初の背景

Notch シグナリングは、多細胞生物において進化的によく保存された経路で、発生過程において細胞の運命を決定し、成体組織の恒常性を維持する。その破綻は様々な発生異常や疾患を引き起こす。**Notch** シグナリングは隣接する細胞に発現する 1 回膜貫通型のリガンドと **Notch** 受容体の結合によって開始される。リガンド結合に続き、受容体は各種プロテアーゼによって 2 回の切断 (**ADAM**, γ -secretase による切断) を受ける。 γ -secretase による切断は膜貫通 (**transmembrane: TM**) 部位で生じ、膜内切断 (**RIP**) として知られる。その結果、細胞質内に放出される **Notch intracellular domain (NICD)** が直接核内へ移行、転写因子と相互作用し、下流遺伝子の転写を促進する。**Notch** シグナリングは、細胞の生存とアポトーシスといった二者択一の細胞運命の決定が細胞種によって異なることなどのように **context dependent** であるとされ、この **context dependency** 存在下でのシグナリング機構の解明が喫緊の課題となっている。最近、**Notch** 受容体リガンド **Delta-like(Dll)1** と **4** に関して、**Dll1** が **Notch1** 受容体に結合した時、細胞膜からの **NICD** の放出 (受容体の活性化) はパルス的に生じるが、一方、**Dll4** の同受容体への結合は **NICD** の放出を持続的に生じさせることが示された [**Nandagopal et al. Cell 2018**]。その結果、**Dll1** の結合は筋形成を示すが、**Dll4** の結合は筋形成を阻害する。つまり、異なるリガンドが同種受容体に結合し、その結果、同種タンパク質断片が細胞内に放出されるが、その放出様式が異なることで、異なる遺伝子発現が生じる。

2. 研究の目的

筆者らは上述の「異なるリガンドが同種受容体に結合し、その結果、同種タンパク質断片が細胞内に放出されるが、その放出様式が異なることで、異なる遺伝子発現が生じる」という事象に関して、受容体の **clustering** の違いが放出様式に違いをもたらすと推測しているが、その機構は未知である。この放出様式、ダイナミクスに差異を与える **context** とは何か、その機構はどのようなものか? これらの一端を明らかにすべく研究を行うこととした。

Notch 受容体リガンドには **Dll1**, **Dll4** を含む 5 種類が知られ、その **N** 末端には **C2** ドメインという脂質結合ドメインが存在する。この **C2** ドメインに関するリポソーム結合アッセイから、**C2** ドメインは膜に結合することが報告され [**Suckling et al.EMBO J. 2017**]、また、糖脂質が受容体機能に関与するという報告 [**Hamel et al. JCB, 2010**] も存在する。最近の総説 [**Henrique et al. Development 2019** 等] では **Notch** 機能における脂質の重要性が語られるようになったが、そのメカニズムは未知である。申請者は、リガンドの **C2** ドメインが受容体周辺の脂質を認識することで結合する受容体を選択していると推測している。つまり、近傍の脂質環境によって **Notch** 受容体の構造、会合状態は異なり、リガンドは個々に異なる脂質を認識し、その脂質環境に依存して異なった存在様式 (会合状態等) にある結合相手を見出すという仮説である。本研究の目的は脂質との協奏下における **Notch** 受容体の構造、存在様式、さらにはリガンド **C2** ドメインが特異的脂質を認識する機構を精査することから、上述 **context dependency** のメカニズム、特に膜上での事象の分子機構を解明することである。

3. 研究の方法

本研究においては、分子動力学 (**MD**) 計算によって、1) 上述の **C2** ドメインが特異的な脂質を検出する (特異的脂質と結合するのか) 可能性を見出す。膜タンパク質と脂質の協奏を解析する上での難関の一つは研究対象とする膜タンパク質の機能を制御する特異的な脂質を見出すところにある。この点に関して、上皮増殖因子受容体 (**EGFR**) に関しては、**lipid ordered (lo) phase** を形成する組成の膜への再構成 [**Coskun et al. PNAS 2011**] が達成され、ガングリオシドの一つである **GM3** が受容体活性を制御することが見出されている。この報告を参考にし、今回は **GM3** に関して **Notch** 受容体との相互作用をみていくこととした。実際は予備的な実験において、この 1) に関しては良好な結果を得ていた。2) 次に、各種脂質組成によって構成される脂質二重層の構造に関する知見を獲得し、さらに 3) そこにおける対象膜タンパク質の挙動に関する情報を得ることとした。2) における計算により、ラフト様構造が形成、再現される脂質分子組成を見出すことができ、その各種マイクロドメインの構造に関する物性を理論的に解析していくことができる。さらに 3) の計算では各種マイクロドメインと **Notch** 受容体の存在様式の相関に関する知見が得られる。

今回の報告においては主に **MD** 計算に関する結果を述べることとなるが、その手法に関して簡単に述べる。まず、脂質二重層に関しては、web サイト **CHARMM GUI** [Jo et al. Plos One 2007, Lee et al. J. Chem Theory Comput. 2019] において、各種脂質を選択、脂質二重層の形成を行った。また今回用いた膜タンパク質、**EGFR**, **Notch** 受容体の初期構造はそれぞれ、**Endres** ら (**Endres et al. Cell 2013**)、**Deatherage** ら (**Deatherage et al. Sci. Adv 2017**) の報告によるものとした。計算は基本的には **Martini** 力場における粗視化モデルの計算であり、計算は **GROMACS Package** の 2019 を用いた。全原子計算における力場は **CHARMM36m** を用いている。

4. 研究成果

1) C2 ドメインの脂質認識

用いた脂質二重層の組成は以下の3種類、POPC/POPS、POPC/POPS/GMI、POPC/POPS/GM3 である。今回の MD 計算によってわかったことは DII1、DII4 の C2 domain は GM を介して膜に結合することである。DII1 に関しては、C2 domain 中 1 番目と 2 番目の β strand の間の loop(BI-B2 loop)が GMI、GM3 それぞれに結合することがわかった。一方、DII4 に関して、GMI に対しては BI-B2 loop が相互作用することが観察されたが、GM3 に対しては C2 domain 中 2 番目と 3 番目の β strand の間の loop(B2-B3 loop)が相互作用し、膜に埋まることがわかった。この結果は興味深い。Hozumi らのグループの報告[Hirano et al. *ELife* 2020]によると、DII4 におけるこの B2-B3 loop (正確にはマウスの配列において相当する部位)は、Notch 受容体との結合に関与することが示されており I3、この loop が膜に埋まってしまうと、受容体とは相互作用しないとの推測が可能である。

2) 各種脂質によって形成される脂質二重層の構造

上述の 1) から Notch 受容体のリガンドである DII1、DII4 の脂質認識部位は GM と結合し、さらに DII4 においては、受容体との相互作用部位が、膜中の GM3 と相互作用し、膜に埋まってしまうことも示された。GM は「ラフト」に存在すると考えられていることから、ここでは、ラフト様の構造を形成し得る脂質組成から成る脂質二重層の構造を見ていくこととした。これから述べていくが、結果的にはここで行った計算スケール(10-100 μ s)では、ラフト様の構造を形成することが知られる脂質であってもその種類によって、ラフト様の構造が異なることがわかった。

まず、上述の EGFR の再構成実験で用いられていた膜組成における各種ドメインの解析を行った。主に ld 層を形成する脂質としては DOPC、主に lo 層を形成する脂質としては sphingomyelin (SM) そして、cholesterol から構成される膜(DOPC:SM:CHOL=33:33:33)である。温度 298 K において、10 μ s の計算を行ったところ、一応の phase separation は観察できた。しかし、形成されるマイクロドメインのうち 70%以上が SM と CHOL 合わせて 20 分子程度で形成される比較的小さなものであり、Marrink らのグループが DPPC/DLIPC/CHOL を用いて示した完全に 2 層に分かれる構造は得られなかった[Schafer et al. *PNAS* 2022]。そこで、DOPC の代わりに DLIPC を用いて、同様の計算を行ったところ、20 分子程度の脂質から構成される ld 層を形成するマイクロドメインは全体の 50%以下となり、60-100 の SM、CHOL 分子から構成される比較的大きなマイクロドメインの割合が増加した。Marrink らのグループが示したような完全に 2 層に分かれる時間帯もあり、lo 層の中に ld 層が存在する「Drop in Drop」とも表現できる構造体も観察された。

3) 各種マイクロドメインと EGFR の膜貫通—膜近傍部位配列の相関

上述の通り、Notch 受容体がラフトに存在する、そして GM3 と相互作用することに関しては、生化学的に示されていない。したがって、Notch 受容体に関する議論に入る前に、それらのことが調べられている EGFR を対象とした前段階の解析を行うこととした。

最初に EGFR 膜貫通—膜近傍部位に関して、各種膜組成における二次構造を全原子計算で解析した。DOPC (「柔らかい膜」を形成する脂質)のみから構成される膜中においては、Endres らによって報告された構造(活性型と考えられている)が維持されたが、DOPC/SM/CHOL/GM3(=33:33:33:1)から構成される膜中では、膜貫通ヘリックスの C 末端においてヘリックスがほどけた。つまり、膜貫通ヘリックスが短くなった。一方、DLIPC/SM/CHOL/GM3(=33:33:33:1)においては、DOPC と同様、長いヘリックスが維持されていた。この理由に関しては、次の粗視化モデル結果から考察が可能である。

次に粗視化モデルにおいて、EGFR 膜貫通—膜近傍配列の二量体形成に対しての脂質組成の影響を見ていくこととした。DOPC のみから形成される膜中においては、Endres らが報告した「活性型」二量体構造が維持された。一方、両 DOPC/SM/CHOL、DLIPC/SM/CHOL 組成による膜中においては、二つのペプチド鎖同士は相互作用をするものの、「活性型」二量体構造の形成は見られなかった。また、重要な点としては、各ペプチド鎖は比較的 ld 層に存在することがわかった。

さらに GM3 を混入させた系において解析を行った。EGFR の細胞外膜近傍部位には GM3 と相互作用することが知られる Lys が存在する。今回の計算においても計算開始時から GM3 はこの Lys と結合することが観察された。さらに EGFR は GM3 とともに lo 層の近傍に存在するが、ペプチド鎖自身は ld 層に存在していた。

ここで、前述の helix break に関する考察を行う。柔らかい脂質として DOPC を用いる場合と DLIPC を用いる場合の違いは lo、ld 層を形成するマイクロドメインの大きさである。DLIPC を用いた場合は層分離が十分であるため、lo、ld の各層が十分な大きさを確保でき、EGFR のペプチド鎖は自らが好む ld 層に応じた構造形成を達成すると考えている。一方、層分離が十分でない DOPC を用いた膜においては、近傍に存在する lo 層の影響を受けてしまうために、「硬い」膜中での構造形成が生じてしまうと考えられる。これは今回見出された二次構造の変化に関する考察であるが、層分離が不十分であるという発見は前述の再構成実験の結果にも理論的解釈を付け加える。すなわち、再構成実験における DOPC/SM/CHOL/GM3 中で、EGFR は二量体を形成しないのは、小さな lo 層が多く存在するために、本来 ld 層に存在し、二量体を形成すべき EGFR が、それを妨げられていると考えることができる。

計算による理論的な結果に基づく考察ではあるが、これらの知見をもとに Notch 受容体の膜貫通部位に関して解析は進行中であり、さらに、ここでの結果をもとに wet な系において物性解析を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sato Takeshi, Shinohara Akira	4. 巻 4
2. 論文標題 Characterizing interaction between the juxtamembrane region of the single transmembrane protein and membrane using chemically synthesized peptides	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 102454 ~ 102454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2023.102454	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 1)Yuki Takechi-Haraya, Takashi Ohgita, Mana Kotani, Hiroki Kono, Chihiro Saito, Hiroko Tamagaki-Asahina, Kazuchika Nishitsuji, Kenji Uchimura, Takeshi Sato, Ryuji Kawano, Kumiko Sakai-Kato, Ken-ichi Izutsu, Hiroyuki Saito	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of hydrophobic moment on membrane interaction and cell penetration of apolipoprotein E-derived arginine-rich amphipathic α -helical peptides.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 4959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 2)Ryo Maeda, Hiroko Tamagaki-Asahina, Takeshi Sato, Masataka Yanagawa, Yasushi Sako.	4. 巻 135
2. 論文標題 Threonine phosphorylation regulates the molecular assembly and signaling of EGFR in cooperation with membrane lipids.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 jcs260355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.260355	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 Hironobu Hojo, Toshiki Takei, Yuya Asahina, Nobuaki Okumura, Toshifumi Takao, Masatomo So, Isao Suetake, Takeshi Sato, Akihiro Kawamoto, Yoshio Hirabayashi	4. 巻 60
2. 論文標題 Total Synthesis and Structural Characterization of Caveolin-1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angew Chem Int Ed Engl .	6. 最初と最後の頁 13900-13905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202100826	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 Prasada Rao Hanumanthu BD, Sato Takeshi, Challa Kiran, Fujita Yurika, Shinohara Miki, Shinohara Akira	4. 巻 10
2. 論文標題 Phosphorylation of luminal region of the SUN-domain protein Mps3 promotes nuclear envelope localization during meiosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.63119	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Takeshi Sato
2. 発表標題 What's going on in the membrane, activation mechanism of receptor tyrosine kinase
3. 学会等名 International Symposium at National Taiwan University, School of Pharmacy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------