

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18502

研究課題名(和文)異なる2種類の先天性疾患で発見されたNotch1変異体の分子機能異常の解析

研究課題名(英文)The biochemically analyze Notch1 mutations linked to Adams-Oliver syndrome

研究代表者

小川 光貴(OGAWA, MITSUTAKA)

名古屋大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：70727429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：NOTCH1が先天性疾患 アダムズ-オリバー症候群(AOS)の原因遺伝子であることが報告されたが、AOS型 NOTCH1 遺伝子変異体の分子機能異常解析については行われていなかった。そこで本研究では、AOS型 NOTCH1 遺伝子変異体の分子機能異常を明らかにすることに主眼を置いて研究を進めた。その結果、AOS型 NOTCH1 遺伝子変異体はリガンドである DLL4 との結合性に異常が認められることが分かった。この結果から、アダムズ-オリバー症候群はDLL4-NOTCH1 シグナル異常症である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The mutations of NOTCH1 are found in the Adams-Oliver syndrome (AOS) patients. The aim of this study is to biochemically analyze Notch1 mutations linked to AOS and demonstrate that Notch1 mutations found in AOS is shown as the dysfunction of DLL4-Notch binding. Those results suggest that impaired DLL4-Notch1 signaling may be an alternative basis of the pathogenesis of AOS.

研究分野：糖質生物学

キーワード：NOTCH アダムズ-オリバー症候群

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまでに O-GlcNAc 修飾の細胞分化過程における分子機能の生化学的・分子遺伝学的解析により、O-GlcNAc 修飾は骨格筋終末分化に決定的な役割を果たす事を明らかにした。即ち、O-GlcNAc 修飾は、転写因子 Mef2D の DNA 結合能を介して骨格筋終末分化のマスター転写因子 Myogenin の発現を制御していることを明らかにしてきた [Ogawa et al., BBRC 2013; Ogawa et al., BBA. 2012]。このように、O-GlcNAc 修飾は細胞内タンパク質に特有な糖鎖修飾として細胞内機能の制御に関わる生体システムと位置づけられていた。

興味深いことに、申請者のグループは ER 局在型 O-GlcNAc 転移酵素 EOGT を介して起こる細胞外 O-GlcNAc 修飾の存在を Notch 受容体上皮成長因子 (EGF) リピート上に発見した [Ogawa et al., WJBC 2014; Sakaidani et al., Nat Commun 2011]。従来、O-GlcNAc 修飾は細胞内タンパク質に特有な糖鎖修飾として細胞内機能の制御に関わる生体システムと位置づけられていた為、細胞外での O-GlcNAc の存在は想定されておらず、本発見は糖鎖生物学の分野において前提を覆す重要な知見を提示するものである。

Notch シグナルは、細胞間コミュニケーションを司る主要なシグナル伝達経路であり、発生過程における多彩な細胞運命の決定プロセスに関与する。申請者は、Notch 受容体上の O-GlcNAc 修飾の欠損は、生まれながらにして手足や頭蓋骨の形成異常、脳に梗塞や血管の傷害が生じる先天性疾患アダムズ-オリバー症候群 (AOS) の原因となることを明らかにした [Ogawa et al., JBC. 2015]。即ち、ヒトを含めた哺乳動物の正常な発生に細胞外 O-GlcNAc 修飾は重要な役割をもつことを示している。

興味深いことに、EOGT の基質である NOTCH1 も AOS の原因遺伝子であることが報告された [Sittrich et al, Am J Hum Genet 2014]。しかし、NOTCH1 の異なるサイトの遺伝子変異は左室流出路狭窄症 (LVOT) の原因となるので、AOS で発見された NOTCH1 の変異と LVOT で発見された NOTCH1 の変異では、Notch シグナルに質的な違いがあるという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究は、AOS 変異と他の疾患で報告されている NOTCH1 変異の分子機能異常と比較することで、生体における厳密な Notch シグナルの制御が、いつ、どのような機能を持つかを明らかにすることを目的とした。つまり、2 種類の先天性疾患で発見された

NOTCH1 遺伝子変異体の分子機能異常を比較解析することにより、Notch シグナルの質的違いがヒトの組織形成や発生をどのように制御しているかを明らかにする。即ち、Notch1 の異なるサイトの変異により引き起こされる分子機能の異常を同定し、両 Notch1 遺伝子変異体の生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

まず、AOS と LVOT で発見された NOTCH1 遺伝子変異体を mutagenesis kit を用いて作成をした。哺乳類発現用ベクターには、pTracer/mouseNotch1 を元に Notch1 の遺伝子変異体を作製した。しかしながら、内在性の Notch1 が検出される為、過剰発現した Notch1 の解析が困難であった。そこで、N 末端に FLAG タグを、C 末端に Myc タグを導入した pTracer/FLAG-mouseNotch1-Myc を作製し、検出系を確立した。また、本研究開始直後に NOTCH1 遺伝子変異型 AOS 患者が報告され、当初の研究計画に加えて、新たに報告された NOTCH1 遺伝子変異体も解析対象とすることにした。よって、本研究では、合計 11 種類の NOTCH1 遺伝子変異体の分子機能異常解析を行うことにした。

次に、作成した NOTCH1 遺伝子変異体を使用して、以下の (1) から (6) に示した NOTCH シグナルに対する分子機能異常を解析した。(1) NOTCH1 遺伝子変異体のプロセッシングパターンの変化の有無を解析した。(2) NOTCH1 遺伝子変異体の局在性を明らかにした。(3) NOTCH1 遺伝子変異体の安定性を明らかにした。(4) Notch シグナリングに NOTCH1 遺伝子変異が与える影響を明らか

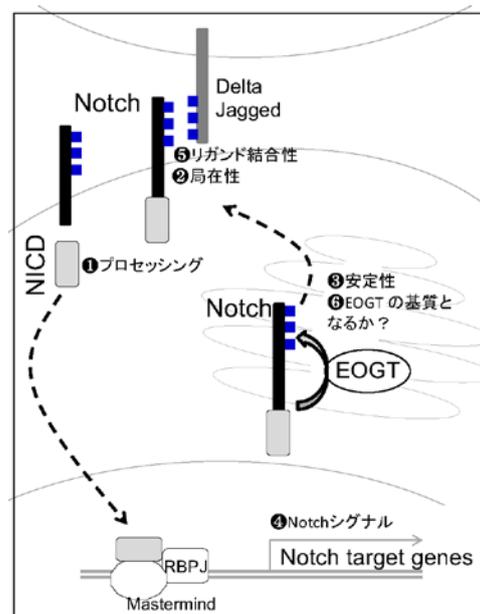


図1. NOTCH シグナルに対する NOTCH1 遺伝子変異体の分子機能解析。

にした。(5) Notch1 のリガンドである Jag1 や Dll4 とのリガンド結合性に与える影響を明らかにした。(6) NOTCH1 遺伝子変異体は EOGT の基質となりうるかを解析した (図 1)。

4. 研究成果

まず、研究に先立って作成した AOS 型 NOTCH1 遺伝子変異体 (pTracer/FLAG-mouseNotch1 変異体-Myc) を一過性発現させた HEK293T 細胞と DLL4-Fc とのリガンド結合性について FACS を用いて解析をした。その結果、AOS で発見された NOTCH1 遺伝子変異体は リガンドである DLL4 との結合性に異常があることが分かった (図 2)。しかしながら、抗 NOTCH1 抗体を用いて細胞膜上の NOTCH1 の発現量を解析した結果、細胞膜上の NOTCH1 の発現量に変化はなかった。これは、AOS 型 NOTCH1 遺伝子変異体の変異サイトが Dll4 との結合性に重要である EGF ドメインに集中していることから本研究で得られた結果を支持している。更に、特殊な抗 NOTCH1 抗体 (HMN1-12) との反応性も NOTCH1 遺伝子変異体で低下していた。本抗体の具体的なエピトープは分かっていないが NOTCH1 の立体構造を認識していることが示唆されている。同様に、LVOT で発見された NOTCH1 遺伝子変異体は、DLL4 との結合性に異常が認められた。

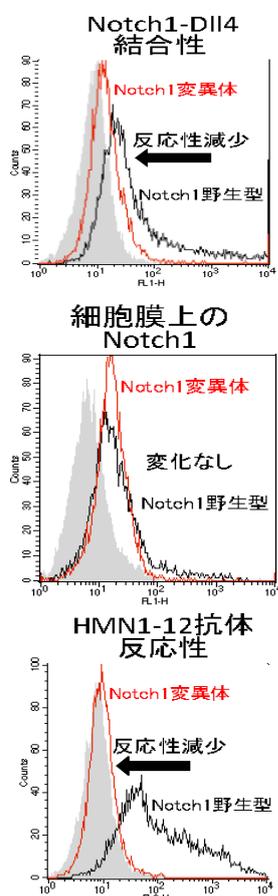


図 2. NOTCH1 遺伝子変異体は Notch1 と Dll4 との結合性に異常が生じる。AOS 型 NOTCH1 遺伝子変異体の代表例と野生型を比較した結果を示す。AOS 型 NOTCH1 遺伝子変異体では DLL4 との結合性が減少していることが分かる (上段)。しかし、細胞膜上の NOTCH1 の発現量は変化していなかった (中段)。抗抗体と NOTCH1 抗体 (HMN1-12) の反応性が AOS 型 NOTCH1 遺伝子変異体では低下していた (下段)。

AOS 型 NOTCH1 遺伝子変異体が DLL4 との結合性に異常が認められる原因としては、プロセッシングパターンの異常や局在性異常、安定性異常などが考えられる。そこで、AOS 型 NOTCH1 遺伝子変異体を一過性発現させた HEK293T 細胞を用いて AOS 型 NOTCH1 遺伝子変異体の局在性を免疫染色で解析した。その結果、NOTCH1 野生型は小胞体や細胞膜表面に局在しているのに対して、3 種類の AOS 型 NOTCH1 遺伝子変異体は、細胞質に凝集していた。この結果、3 種類の AOS 型 NOTCH1 遺伝子変異体は局在性に異常があることが分かった。次に、安定性とプロセッシングパターンを抗 FLAG 抗体と抗 MYC 抗体を用いたウエスタンブロッティングで解析した。その結果、局在性に異常が認められた 3 種類の AOS 型 NOTCH1 遺伝子変異体において、プロセッシングパターンの異常や安定性異常が認められた。一方、上記以外の AOS 型 NOTCH1 遺伝子変異体は、細胞膜表面上の発現量やプロセッシングに異常が無いことから、DLL4-NOTCH1 との分子間相互作用に異常が生じていることが予想された。

DLL4 と NOTCH1 との分子間相互作用は、EOGT による細胞外 O-GlcNAc 修飾により制御されているので [Sawaguchi, Varshney, Ogawa et al., eLife. 2017]、プロセッシングパターンの異常や安定性異常が認められなかった AOS 型 NOTCH1 遺伝子変異体は、細胞外 O-GlcNAc 異常が生じている可能性が示唆された。そこで、AOS 型 NOTCH1 遺伝子変異体の細胞外 O-GlcNAc レベルを抗 O-GlcNAc 抗体 (CTD110.6) を用いたウエスタンブロッティングで解析した。その結果、AOS 型 NOTCH1 遺伝子変異体上の細胞外 O-GlcNAc レベルは野生型 NOTCH1 と同レベルであった。即ち、AOS 型 NOTCH1 遺伝子変異体の細胞外 O-GlcNAc 修飾には異常が無く、EGF ドメイン上のアミノ酸に変異が入ることで立体構造が変化しており、DLL4 との結合性に異常が生じていることが予想された。現在、DLL4-NOTCH1 との分子間相互作用を解析しており、データが得られ次第、論文を投稿する予定である。

本研究成果から、先天性疾患アダムズ-オリバー症候群 (AOS) は DLL4-NOTCH1 シグナルの異常により生じていることが示唆された。即ち、先天性疾患アダムズ-オリバー症候群 (AOS) は、DLL4-NOTCH1 シグナルを活性化することで治療応用が可能である可能性も示唆された。現在、本研究で得られた成果を発展させ、糖代謝に着目した先天性疾患アダムズ-オリバー症候群 (AOS) の治療法開発に着手しているところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① *Shogo Sawaguchi, *Shweta Varshney, *Mitsutaka Ogawa, Yuta Sakaidani, Hirokazu Yagi, Kyosuke Takeshita, Toyooki Murohara, Koichi Kato, Subha Sundaram, Pamela Stanley and Tetsuya Okajima. (***equal contribution**) O-GlcNAc on NOTCH1 EGF Repeats Regulates Ligand-Induced Notch Signaling and Vascular Development in Mammals. *eLife*, 2017;6:e24419, 2017. 査読有
- ② Kei Kaneko, Yuki Ohkawa, Noboru Hashimoto, Yuhsuke Ohmi, Norihiro Kotani, Koichi Honke, Mitsutaka Ogawa, Tetsuya Okajima, Keiko Furukawa and Koichi Furukawa. Neogenin defined as a GD3-associated molecule by enzyme-mediated activation of radical sources confers malignant properties via intracytoplasmic domain in melanoma cells. *J. Biol. Chem.*, ASBMB, 291(32), 16630-43, 2016. 査読有
- ③ Mitsutaka Ogawa, Shogo Sawaguchi, Kazuo Kamemura, Tetsuya Okajima. Intracellular and extracellular O-linked N-acetylglucosamine in the nervous system. *Exp Neurol*, Elsevier, 274(Part B), 166-174. 2015. 査読有
- ④ Mitsutaka Ogawa, Shogo Sawaguchi, Koichi Furukawa, Tetsuya Okajima. N-acetylglucosamine modification in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta. Gen Subj.* Elsevier, 1850, 1319-1324. 2015. 査読有
- ⑤ Mitsutaka Ogawa, Shogo Sawaguchi, Takami Kawai, Daita Nadano, Tsukasa Matsuda, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Koichi Furukawa, and Tetsuya Okajima. Impaired O-linked N-acetylglucosaminylation in the endoplasmic reticulum by mutated EGF domain-specific O-linked N-acetylglucosamine transferase found in Adams-Oliver syndrome. *J. Biol. Chem.*, ASBMB, 290(4), 2137-2149, 2015. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① Mitsutaka Ogawa, Shogo Sawaguchi,

Tetsuya Okajima. Vascular development and Dll4-O-GlcNAc-Notch1 axis caused by Adams-Oliver syndrome. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016 年 12 月 4 日. (パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)).

- ② Mitsutaka Ogawa, Shweta Varshney, Shogo Sawaguchi, Yuta Sakaidani, Hirokazu Yagi, Kyosuke Takeshita, Toyooki Murohara, Koichi Kato, Pamela Stanley, Tetsuya Okajima. Extracellular O-GlcNAc is required for retinal vascular development and Dll4-Notch signaling. Society for Glycobiology 2016 ANNUAL MEETING. 2016 年 11 月 23 日. (アメリカ ニューオーリンズ/ USA New Orleans)
- ③ Mitsutaka Ogawa. O-GlcNAc regulates Dll4-Notch signaling and vascular development in mammals. The 10th Notch meeting. 2016 年 10 月 5 日. (遺伝学研究所 (静岡県三島市))
- ④ Mitsutaka Ogawa, Shogo Sawaguchi, Kyosuke Takeshita, Toyooki Murohara, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Koichi Furukawa, Tetsuya Okajima. Extracellular O-GlcNAc regulates Dll4-dependent Notch signaling in the endothelial cells and BBB/BRB maintenance. The 3th International Symposium on Glyco-Neuroscience. 2016 年 1 月 14 日. (淡路夢舞台 国際会議場 (兵庫県淡路市))
- ⑤ Mitsutaka Ogawa, Paweł Bieniasz-Krzywiec, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Jiro Usukura, Koichi Furukawa, Tetsuya Okajima. Analysis of the biological roles of extracellular O-GlcNAc using EOGT-deficient mice. Society for Glycobiology 2015 Annual Meeting. 2015 年 12 月 1 日. (アメリカ サンフランシスコ/ USA San Francisco)
- ⑥ Mitsutaka Ogawa, Shogo Sawaguchi, Tetsuya Okajima. Regulators for N-acetylglucosamine (GlcNAc) modifications in the endoplasmic reticulum. 第 5 回名古屋大学・生理学研究所合同シンポ. 2015 年 9 月 19 日. (生理学研究所 (愛知県岡崎市))
- ⑦ Mitsutaka Ogawa, Shogo Sawaguchi, Paweł Bieniasz-Krzywiec, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Jiro Usukura, Koichi Furukawa, Tetsuya Okajima. Biological roles of extracellular O-GlcNAc in Notch

signaling, vascular development, and blood brain barrier maintenance. 第38回日本神経科学大会. 2015年7月28日. (神戸国際会議場(兵庫県神戸市))

- ⑧ Mitsutaka Ogawa, Shogo Sawaguchi, Pawel Bieniasz-Krzywiec, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Jiro Usukura, Koichi Furukawa, Tetsuya Okajima. 脳血管における細胞外 O-GlcNAc 修飾の生物学的意義. 平成27年度神経糖鎖生物学夏の班会議. 2015年6月25日. (とりぎん文化会館 (鳥取県鳥取市))
- ⑨ Mitsutaka Ogawa, Shogo Sawaguchi, Pawel Bieniasz-Krzywiec, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Jiro Usukura, Koichi Furukawa, Tetsuya Okajima. Biological roles of extracellular O-GlcNAc in Notch signaling, vascular development, and blood retinal barrier maintenance. 生化学会中部支部例会シンポジウム. 2015年5月22日. (信州大学 (長野県松本市))

[その他]

ホームページ等

- ① http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20170411_med_1.pdf
- ② https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/research/pdf/elif_e_20170411.pdf
- ③ <https://www.med.nagoya-u.ac.jp/seika2/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 光貴 (OGAWA MITSUTAKA)
名古屋大学大学院医学系研究科
研究員
研究者番号 : 70727429

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 研究協力者

澤口 翔伍 (SAWAGUCHI SHOGO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・
大学院生・D4
研究者番号 : なし

Alam Sayed M.d Didarul

名古屋大学・大学院医学系研究科・
大学院生・D1
研究者番号 : なし