

令和 7 年 6 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22H02815・23K24077

研究課題名（和文）糖転移酵素群によるNOTCHタンパク質の分泌・分解の仕分け機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the sorting mechanism of NOTCH protein secretion and degradation mediated by glycosyltransferases

研究代表者

岡島 徹也（Okajima, Tetsuya）

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20420383

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、O型糖鎖がタンパク質のフォールディングのみならず、細胞内輸送や分泌にも重要な役割を果たすことを明らかにし、糖鎖生物学に新たな視点を提供した。DLK1の糖鎖修飾マップと機能解析により、関連疾患の理解や創薬への応用も期待される。さらに、O型糖鎖欠損がDLK1とNOTCH1で異なる輸送・分解経路を誘導することが示唆され、今後、O型糖鎖を介した分泌・分解の仕分け機構の解明が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、O型糖鎖がタンパク質フォールディングのみならず、細胞内輸送および分泌においても積極的に機能しているという新たな知見を提供し、糖鎖生物学の理解を一層深化させるものである。また、DLK1のO型糖鎖修飾マップの確立とそれに基づく機能解析により、DLK1関連疾患の病態解明や糖鎖を標的とした創薬への応用が期待される。今後、同様の解析をNotch1にも適用することで、O型糖鎖の分泌、もしくは、分解経路への仕分け機構の基本原理の理解と、O型糖鎖修飾が主役となるタンパク質の細胞内動態に関する新たなパラダイムが提示されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The present study provides a new perspective on glycobiology by demonstrating that O-glycans play important roles not only in protein folding but also in intracellular transport and secretion; the glycosylation map and functional analysis of DLK1 are also expected to have applications in understanding related diseases and drug discovery. Furthermore, it was suggested that O-glycan deficiency induces different transport and degradation pathways in DLK1 and NOTCH1, and it is expected that the sorting mechanism of O-glycan-mediated secretion and degradation will be elucidated in the future.

研究分野：生化学、糖鎖生物学

キーワード：O型糖鎖 DLK1 NOTCH 小胞体 輸送

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の翻訳後修飾の一つである糖鎖修飾は、細胞間相互作用や細胞シグナリング、タンパク質の安定性、局在、分泌など、さまざまな生命現象の制御において極めて重要な役割を果たしている。特に、上皮成長因子様 (EGF) ドメインを有する膜タンパク質には、O-フコース (O-Fuc)、O-グルコース (O-Glc)、O-GlcNAc などの O 型糖鎖が選択的に付加されることが知られている。Notch 受容体においては、これらの O 型糖鎖が適切なタンパク質の構造形成、リガンド結合、細胞表面への輸送に重要な役割を果たすことが明らかにされている。O 型糖鎖が EGF ドメインの安定化に寄与することも報告されているが、その安定化機構と分泌経路との関連性については未解明であった。

また、O 型糖鎖修飾を受ける複数の EGF ドメインを連続して有する膜タンパク質は、Notch 以外にも存在し、Notch 受容体リガンドもその一つである。中でも Delta-like 1 homolog (DLK1) は、O 型糖鎖の存在も以前から報告されており、脂肪細胞の分化制御、がんの進展、内分泌疾患など、多様な生理機能に関与する重要な分子である。しかし、DLK1 に対する O 型糖鎖修飾の機能的意義は他のリガンドタンパク質と同様に、これまでほとんど明らかにされてこなかった。

2. 研究の目的

本研究では、Notch 受容体およびリガンド様タンパク質 DLK1 の EGF ドメインに付加される O 型糖鎖が、細胞内輸送および分泌において果たす役割を明らかにすることを目的とした。具体的には、3 種類の糖転移酵素 (POFUT1、POGLUT1、EOGT) の欠損が O 型糖鎖修飾および分泌過程に与える影響を解析し、O 型糖鎖が EGF ドメインの安定化にとどまらず、細胞内の分泌経路における制御因子として機能する可能性を検証した。また、DLK1 においては、O 型糖鎖修飾マップを網羅的に解析することで、翻訳後修飾間の相互作用 (クロストーク) を含む新たな生化学的知見の発見も目指した。

3. 研究の方法

HEK293T 細胞に Notch1 または DLK1 の細胞外領域 (DLK1-ECD) を発現させ、トリプシンおよびキモトリプシンによる酵素消化後、質量分析 (LC-MS/MS) により EGF ドメインごとの糖鎖修飾を部位特異的かつ半定量的に同定した。次に、CRISPR/Cas9 システムを用いて、POFUT1 (O-Fuc 転移酵素)、POGLUT1 (O-Glc 転移酵素)、EOGT (O-GlcNAc 転移酵素) をそれぞれ欠損させた HEK293 細胞株を作製し、それぞれの酵素欠損が Notch1 または DLK1 の分泌および輸送に与える影響を解析した。分泌効率は、ウェスタンブロットにより細胞外 (培養上清) と細胞内タンパク質の比率を測定することで評価した。さらに、DLK1 の小胞体からの輸送効率を定量化するために RUSH (Retention Using Selective Hooks) システムを用

いた。また、特定の O 型糖鎖修飾部位に点変異を導入した DLK1 変異体を用いて、糖鎖の有無が輸送過程に及ぼす影響を詳細に検討した。

4. 研究成果

本研究により、DLK1 の O 型糖鎖修飾の詳細な様式が初めて明らかとなった。6 つの連続する EGF リピートのうち、EGF3、EGF4、EGF6 において O-Fuc もしくは O-Glc 修飾が存在することが質量分析により確認された。さらに、EGF4 においては EOGT 依存的な O-Hex 修飾が新たに同定され、この修飾は従来の O-GlcNAc 修飾と同一部位にあるものの、分子量としては異なっており、新たな O 型糖鎖のタイプである可能性があることが示された。これにより、DLK1 の網羅的な O 型糖鎖修飾マップが確立された (図 1)。

糖転移酵素欠損細胞を用いた解析では、POFUT1 または POGLUT1 の欠損により、Notch1 および DLK1 の細胞外領域の分泌が大幅に低下し、細胞表面への輸送も著しく抑制されることが明らかとなった。一方、EOGT の欠損は分泌過程に大きな影響を与えなかった。さらに、主要な O 型糖鎖修飾部位に点変異を導入した Notch1 および DLK1 変異体でも同様の分泌障害が見られ、これらの修飾が両タンパク質の分泌に必要であることが示された。

RUSH システムを用いた輸送解析では、Notch1 は小胞体にとどまり、ビオチン添加後も細胞表面への輸送は観察されなかった。一方、DLK1 は 1 時間後には細胞表面への輸送が確認され、POFUT1 または POGLUT1 欠損細胞では輸送効率が低下していた。興味深いことに、これらの欠損細胞における小胞体内に局在する DLK1 では、対応する O 型糖鎖修飾のみに異常が観察された。さらに、in vitro で欠損糖鎖が再構築可能であるかどうか評価した (図 2)。重要なことに、POFUT1 もしくは POGLUT1 との反応により、欠損していた O 型糖鎖がほぼ完全に回復することが示された (図 3)。O 型糖鎖付加は、正しくフォールドされた EGF ドメイン特異的に生じることから、これらの実験より、O 型糖鎖の欠損にもかかわらず、EGF ド

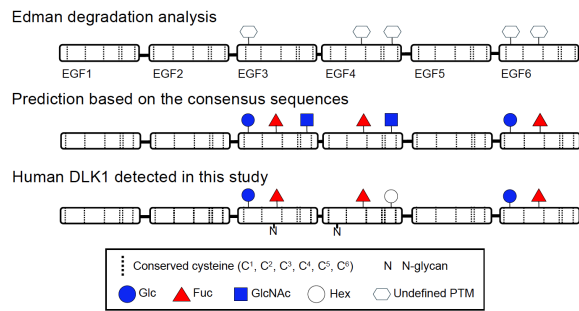


図 1 DLK1のEGFリピートを修飾するO型糖鎖の確認と未知のO型糖鎖の同定
これまでの研究および本研究により、ヒト DLK1 の EGF ドメインに特異的O型糖鎖修飾について、予測されていた糖鎖付加部位 (コンセンサス配列に基づく) と、ヒト羊水から単離された DLK1 に実際に観察された翻訳後修飾 (PTM) との間に見られる不一致が示された。(Tashima et al. FEBS J 2025より引用)

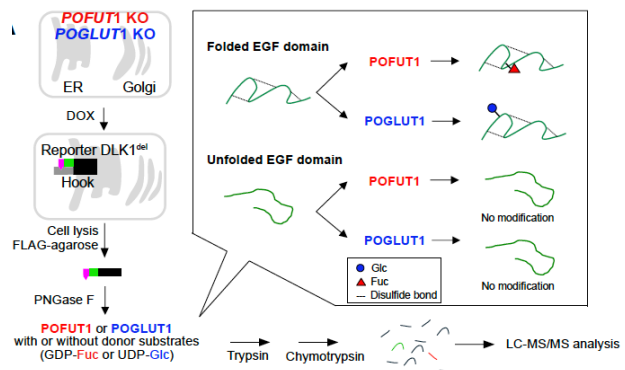


図 2 EGFドメインのフォールディング状態の評価

Reporter DLK1は、ビオチン非存在下でドキシサイクリン処理したPOFUT1欠損細胞またはPOGLUT1欠損細胞に発現させた。小胞体にReporter DLK1を、細胞溶解液から抗FLAG抗体アガロースビーズを用いて精製し、N型糖鎖除去酵素で処理した。POFUT1欠損細胞から得た脱N型糖鎖DLK1には、GDP-フコースの存在または非存在下でPOFUT1を加えて反応させ、同様に、POGLUT1欠損細胞から得たDLK1にはUDP-グルコースとPOGLUT1を加えて反応させた。これらの酵素 (POFUT1およびPOGLUT1) は、正しくフォールディングされたEGFドメインを認識して修飾を行うため、フォールディングが正常なEGFドメインには糖鎖が付加される。一方で、フォールディングに異常がある場合は修飾が起こらない。酵素反応産物はトリプシンとキモトリプシンで消化し、LC-MS/MS解析を行った。(Tashima et al. FEBS J 2025より引用)

メインのフォールディングには明確な異常を示さないことが明らかになった。

さらに、DLK1 の EGF3 において N 型糖鎖と O-Fuc 修飾が同一部位に排他的に存在することが明らかになり、翻訳後修飾間のクロストークの存在を示唆する重要な知見が得られた。加えて、EOGT 依存的な O-Hex 修飾が POFUT1 欠損細胞ではわずかに減少しており、異なる糖転移酵素間の協調的な機能や構造変化の影響が考えられた。

これらの成果により、EGF ドメインへの O 型糖鎖の付加がタンパク質の輸送経路選択や効率に直接関与していることが示され、O 型糖鎖の機能的意義を再定義する必要性が示された。DLK1 のような Notch 類似タンパク質においても、糖鎖修飾が細胞表面への輸送の制御にも重要であることが、本研究で初めて明らかになった (図 4)。

本研究は、O 型糖鎖がタンパク質フォールディングのみならず、細胞内輸送および分泌においても積極的に機能しているという新たな知見を提供し、糖鎖生物学の理解を一層深化させるものである。また、DLK1 の O 型糖鎖修飾マップの確立とそれに基づく機能解析により、DLK1 関連疾患の病態解明や糖鎖を標的とした創薬への応用が期待される。また、O 型糖鎖の欠損の結果、明確な EGF ドメインのミス

フォールディングが生じないことは、NOTCH1 においても確認されている。しかしながら、DLK1 の場合と異なり、NOTCH1 は O 型糖鎖の欠損により、輸送経路が完全に阻害され、一方で、分解経路でも効率的に分解を受けることがなく、比較的安定的に小胞体に留まっていた。今後は、DLK1 で得ら

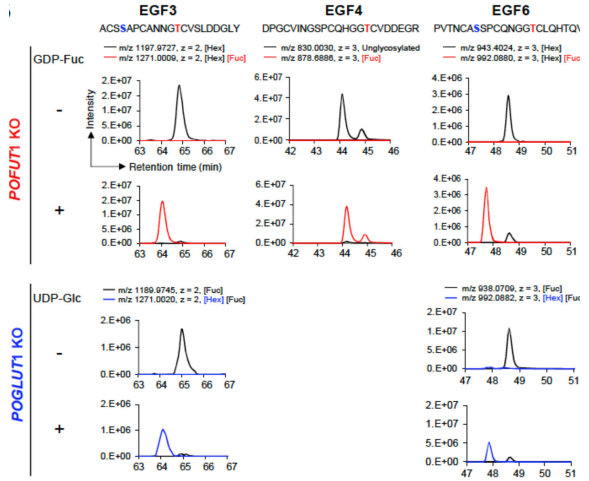


図3 in vitro O型糖鎖付加のLC-MS/MS解析による評価
図2で説明した手法に従って得られたReporter DLK1の酵素処理サンプルを分析した。未修飾ペプチド(黒線)と、in vitroでO型糖鎖が付加された糖ペプチド(色分けされた線)の抽出イオンクロマトグラムを示している。セリン(S)残基でO-Glcが修飾された部位は青で、スレオニン(T)残基でO-Fucが修飾された部位は赤で示した。(Tashima et al. FEBS J 2025より引用)

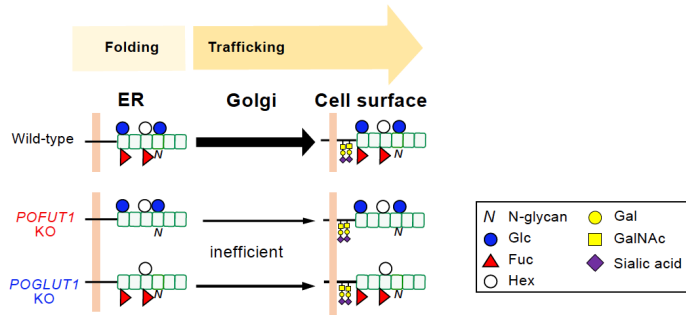


図4 DLK1の細胞表面への輸送におけるO型糖鎖の役割モデル
DLK1は、POFUT1、POGLUT1、EOGTという3つの酵素の働きにより、それぞれO-Fuc、O-Glc、そして新たに同定されたO-HexといったO型糖鎖で修飾される。POFUT1またはPOGLUT1を欠損しても、他のO型糖鎖の付加は失われておらず、これはDLK1の正しいフォールディングが完了していることを示している。輸送アッセイの結果、POFUT1またはPOGLUT1の欠損によってDLK1の小胞体からの輸送が阻害されることが明らかとなったが、EOGTの欠損では輸送には影響が見られなかった(Tashima et al. FEBS J 2025より引用)。

れた知見をもとに、Notch1 に焦点をあてることで、O 型糖鎖の分泌、もしくは、分解経路への仕分け機構の基本原理の理解に役立つことが期待できる。その結果、小胞体内における O 型糖鎖を介した相互作用タンパク質群の機能制御機構の理解が進み、O 型糖鎖修飾が主役となるタンパク質の細胞内動態に関する新たなパラダイムが提示されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsukamoto Yohei, Tsukamoto Natsumi, Saiki Wataru, Tashima Yuko, Furukawa Jun-ichi, Kizuka Yasuhiko, Narimatsu Yoshiki, Clausen Henrik, Takeuchi Hideyuki, Okajima Tetsuya	4. 巻 703
2. 論文標題 Characterization of galactosyltransferase and sialyltransferase genes mediating the elongation of the extracellular O-GlcNAc glycans	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149610 ~ 149610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2024.149610	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 Kondo Yuji, Li Yuxin, Okajima Tetsuya	4. 巻 29
2. 論文標題 Efficient Escorting Strategy for Aggregation-Prone Notch EGF Repeats with Sparcl1	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1031 ~ 1031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules29051031	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 Kondo Yuji, Okajima Tetsuya	4. 巻 173
2. 論文標題 Inhibitory machinery for the functional dystroglycan glycosylation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 333 ~ 335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad003	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 Tsukamoto Yohei, Ogawa Mitsutaka, Yogi Kentarou, Tashima Yuko, Takeuchi Hideyuki, Okajima Tetsuya	4. 巻 32
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 616 ~ 628
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 Wang Weiwei, Okajima Tetsuya, Takeuchi Hideyuki	4. 巻 27
2. 論文標題 Significant Roles of Notch O-Glycosylation in Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1783 ~ 1783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27061783	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 Zhang Ailing, Tsukamoto Yohei, Takeuchi Hideyuki, Nishiwaki Kimitoshi, Tashima Yuko, Okajima Tetsuya	4. 巻 656
2. 論文標題 Secretory expression of mammalian NOTCH tandem epidermal growth factor-like repeats based on increased O-glycosylation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 114881 ~ 114881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2022.114881	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 Kakuo Manami, Horii Takeshi, Tonomura Naoto, Sato Runa, Ogawa Mitsutaka, Okajima Tetsuya, Kamemura Kazuo	4. 巻 424
2. 論文標題 Evidence that only EWS among the FET proteins acquires a low partitioning property for the hyperosmotic stress response by O-GlcNAc glycosylation on its low-complexity domain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 113504 ~ 113504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2023.113504	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 Kondo Yuji, Okajima Tetsuya	4. 巻 173
2. 論文標題 Inhibitory machinery for the functional dystroglycan glycosylation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 333 ~ 335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad003	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 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Tetsuya Okajima, Yuji Kondo, Yuko Tashima
2. 発表標題 The structure and function of "extracellular" O-GlcNAc modification in mammals
3. 学会等名 TAIWAN Glyco26 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田島優子、大橋憲太郎、塚本庸平、岡島徹也
2. 発表標題 小胞体でのフォールディング管理におけるNOTCH受容体のO型糖鎖修飾の役割
3. 学会等名 第42回日本糖質学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 近藤裕史、河合香里、岡島徹也
2. 発表標題 Eogtは動脈内皮細胞特異的糖転移酵素である
3. 学会等名 第42回日本糖質学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 近藤裕史、河合香里、岡島徹也
2. 発表標題 Eogtは動脈内皮細胞特異的糖転移酵素である
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田嶋優子, 大橋憲太郎, 塚本庸平, 岡島徹也
2. 発表標題 小胞体での品質管理におけるNOTCH受容体のO型糖鎖修飾の役割
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田嶋優子、後藤和佳子、塚本庸平、小川光貴、竹内英之、岡島徹也
2. 発表標題 O-fucose修飾とO-glucose修飾はDLK1の効率的な輸送に大事である
3. 学会等名 第41回日本糖質学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yohei Tsukamoto, Kazuhiro Aoki, Yoshiki Narimatsu, Yusuke Urata, Wataru Saiki, Michael Tiemeyer, Henrik Clausen, Yuki Kurebayashi, Akira Minami, Tadanobu Takahashi, Tetsuya Okajima, and Hideyuki Takeuchi
2. 発表標題 3'-Sialyllactose on Notch: Notch1 functions as a scaffold of O-linked, 3'-sialyllactosylated glycans
3. 学会等名 Society for Glycobiology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuko Tashima, Wakako Goto, Yohei Tsukamoto, Mitsutaka Ogawa, Hideyuki Takeuchi, Tetsuya Okajima
2. 発表標題 Roles of POFUT1 and POGlut1 for the effective transport of DLK1 to the cell surface
3. 学会等名 Society for Glycobiology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤裕史、岡島徹也
2. 発表標題 細胞外O-GlcNAc転移酵素の組織発見分布解析と生体内における機能探索
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田嶋優子、後藤和佳子、塚本庸平、小川光貴、竹内英之、岡島徹也
2. 発表標題 O-fucoseとO-gIucose修飾はDLK1の効率的な輸送に重要である
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022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
研究分担者	近藤 裕史 (Yuji Kondo) (50644655)	名古屋大学・医学系研究科・講師 (13901)	
研究分担者	竹内 英之 (Takeuchi Hideyuki) (80361608)	静岡県立大学・薬学部・教授 (23803)	

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
---------	---------