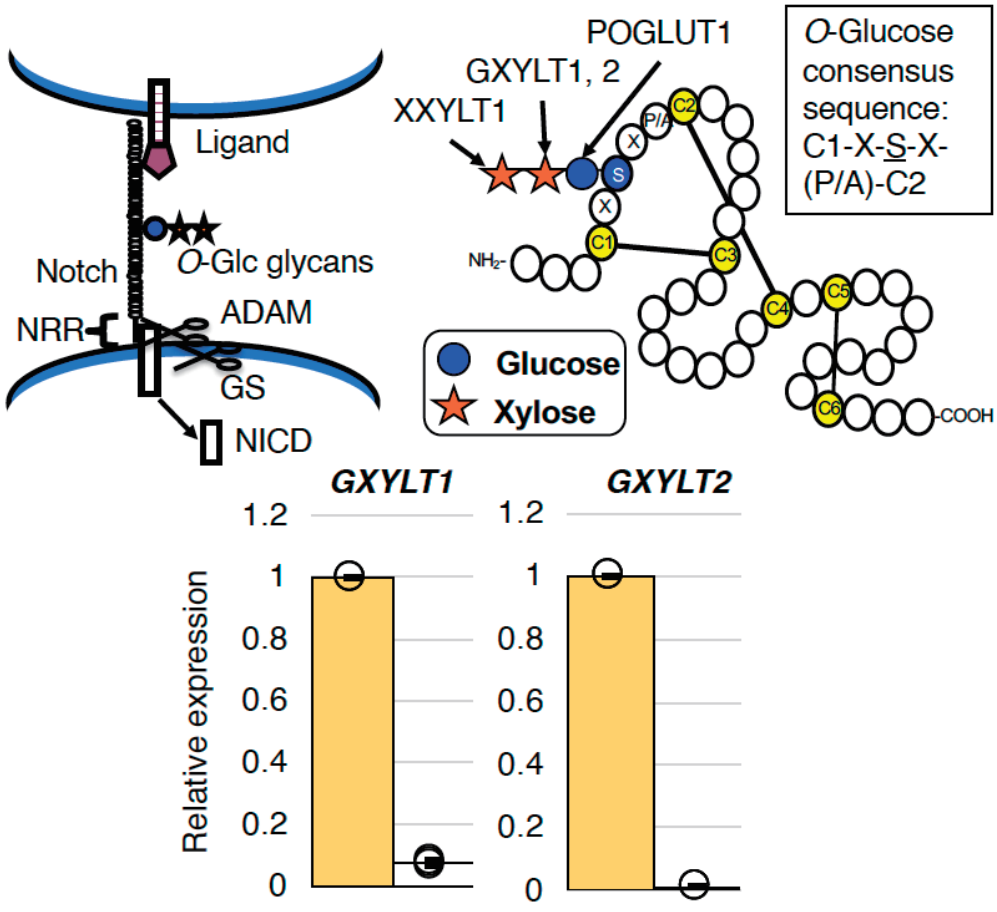
36　NOTCH糖鎖修飾による白血病細胞の増殖制御機構の解明	竹内　英之

【目的】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。急性骨髄性白血病（AML）においては、*NOTCH1* の不活性化が細胞増殖を促進する。AML では Notch リガンドも NOTCH1 受容体も発現しているにもかかわらず、NOTCH1 受容体は不活性化しており、その機序は不明である。著者らは、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、AML の細胞増殖の亢進は、キシロース伸長の亢進によって NOTCH1 の分子内相互作用が阻害されることによる NOTCH1 の不活性化に起因するという仮説を立て、研究に取り組んだ。

【方法】HL-60 細胞からゲノム DNA を抽出し、*GXYLT1* の当該領域を PCR により増幅、ベクターにクローニングしてシークエンス解析を行った。HEK293T 細胞と HL-60 細胞における GXYLT1 および GXYLT2 の遺伝子発現レベルを RT-qPCR 法により解析した。*O*-グルコース糖鎖のキシロースによる伸長の影響を解析するために、ヒト NOTCH1 の EGF8-13 に相当する組換えタンパク質を作製した。キシロース転移酵素阻害剤探索のための受容基質 NOTCH2EGF12 を大腸菌発現系にて作製し、さらに、*in vitro O*-glucosylation 法を用いて、酵素学的に *O*-グルコース単糖を付加した。

【結果】HL-60 細胞における *GXYLT1* のナンセンス変異（R295*）は、ヘテロ変異であることが強く示唆された。*GXYLT1* および *GXYLT2*、いずれの遺伝子も、HL-60 細胞において発現していること、そして、HEK293T 細胞における発現レベルに比べて、低いことが分かった。今後の相互作用解析に用いる NOTCH1EGF8-13 タンパク質を作製可能であることが分かった。精製度の高い *O*-グルコース単糖の付加された EGF 受容基質を作製することに成功した。

NOTCH 受容体糖鎖修飾と生合成の関わる糖転移酵素



36. NOTCH 糖鎖修飾による白血病細胞の増殖制御機構の解明

竹内　英之

静岡県立大学 大学院薬学研究院 生化学講座

Key words：糖鎖修飾，糖転移酵素，Notch シグナル，*O*-グルコース，キシロース

緒　言

Notch シグナルは、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。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［1］。Notch シグナルは、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生じる物理的な力によって、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寄与しているが、このことの分子機構は明らかになっていない。

著者らは、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［2］。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。著者らは、Notch の EGF ドメイン中のコンセンサス配列中のセリン残基に *O*-グルコースを付加する糖転移酵素 *POGLUT1* 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（図 1b）［3］。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 1b）［4，5］。興味深いことに、ショウジョウバエにおいては、詳細な分子機構は不明であるが、*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ことが報告されている。

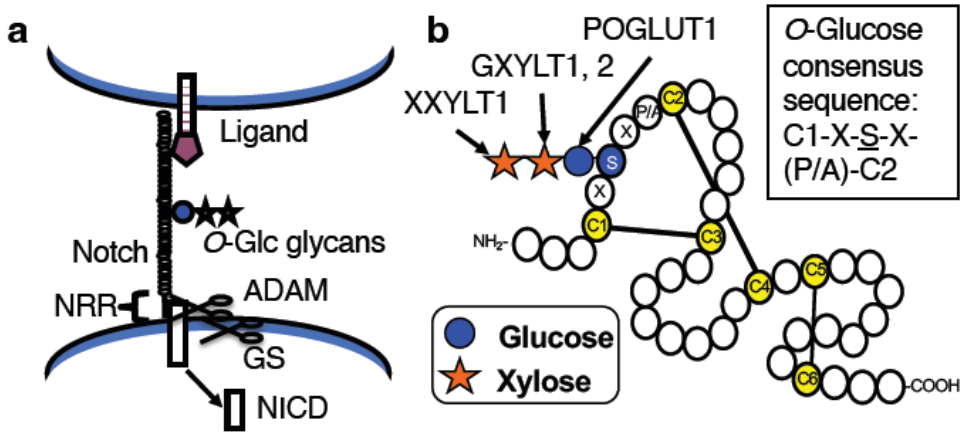


図1. Notch 受容体の構造と活性化の模式図

a）Notch受容体はリガンドとの相互作用により活性化する。

b）Notch受容体の細胞外部位に存在する上皮増殖因子様ドメインと *O*-グルコース糖鎖修飾。*O*-グルコース糖鎖は、キシロース二残基の伸長を受ける。

AML においては、NOTCH1 の不活性化が細胞増殖を促進する［6］。奇妙なことに、AML では Notch リガンドも NOTCH1 受容体も発現しているにもかかわらず、NOTCH1 受容体は不活性化しており、その機序は不明である。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。また、NOTCH1 の EGF8-13 と NRR とが分子内で相互作用することが報告された［7］。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。以上より、著者らは、AML の細胞増殖の亢進は、キシロース伸長の亢進によって NOTCH1 の分子内相互作用が阻害されることによる NOTCH1 の不活性化に起因するという仮説を立てた。この仮説を証明するために、本研究では AML の産生する NOTCH1 上の糖鎖修飾と細胞の増殖性との関連を調べ、その分子機構を明らかにし、さらに、後述する予備的知見に基づき、キシロース転移酵素の阻害剤の探索を行うこととした。

方法および結果

1. NOTCH1 上の *O*-グルコース糖鎖と Notch シグナル、そして AML 細胞の増殖性との関連の解析

本研究では、NOTCH1 の活性化に対するキシロース付加の影響を評価するシステムとして、*GXYLT2* は発現しているものの、ナンセンス変異（R295*）により *GXYLT1* を欠き、かつ、その細胞増殖が NOTCH1 シグナルに依存する特徴を有する AML 細胞株 HL-60 を主に用いることとした。初めに、TCGA データベースに記載されているナンセンス変異（R295*）が、ホモ変異であるのか、あるいは、ヘテロ変異であるのかを調べた（図 2a）。HL-60 細胞からゲノム DNA を抽出し、*GXYLT1* の当該領域を PCR により増幅、ベクターにクローニングしてシークエンス解析を行った。その結果、野生型の配列と変異型の配列の両方が検出された（図 2b）。さらに、HL-60 細胞を限界希釈法により、クローニング後、各クローンの *GXYLT1* の当該領域の配列を解析すると、野生型の配列と変異型の配列の両方が検出された。以上より、HL-60 細胞における GXYLT1 のナンセンス変異（R295*）は、ヘテロ変異であることが強く示唆された。次に、HL-60 細胞における GXYLT1 および GXYLT2 の遺伝子発現レベルを RT-qPCR 法により解析した。両遺伝子の発現レベルは、それぞれ、HEK293T 細胞におけるそれらの発現レベルと比較した。その結果、いずれの遺伝子も、HL-60 細胞において発現していること、そして、HEK293T 細胞における発現レベルに比べて、低いことが分かった（図 2c）。

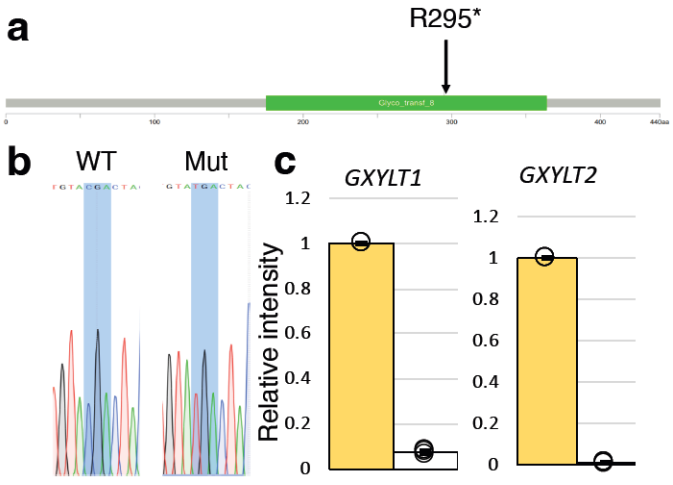


図 2. HL60 細胞におけるキシロース転移酵素 GXYLT1 と GXYLT2 の性状解析

a) TCGA データベースにおける *GXYLT1* のナンセンス変異 R295*。

b) HL60 細胞における R295 コード領域を含む *GXYLT1* ゲノム配列の解析結果。

c) HEK293T 細胞（黄色）と HL60 細胞（白色）における *GXYLT1* と *GXYLT2* mRNA 発現レベル。

2. NOTCH1 上のキシロース伸長型糖鎖が NOTCH1 の活性化を抑制する分子メカニズムの解析

最近、NOTCH1 の EGF8-13 と NRR とが分子内で相互作用することが報告された［7］。この分子間相互作用に対する、*O*-グルコース糖鎖のキシロースによる伸長の影響を解析するために、ヒト NOTCH1 の EGF8-13 に相当する組換えタンパク質を作製した。具体的には、pSecTag2C ベクターに NOTCH1 の EGF8-13 をコードする cDNA 配列をクローニングし、C 末端に MycHis タグが付加する形で発現させた。HEK293T 細胞に作製したベクターをトランスフェクションし、培地を OPTI-MEM I に交換後、3 日間培養し、培養上清を回収した。この培養上清から、Ni-NTA アガロースアフィニティークロマトグラフィーにて目的の NOTCH1EGF8-13 タンパク質を精製した。溶出画分から、競合溶出に用いたイミダゾールを除くために、1 mM $CaCl_2$ を含む TBS にて透析を行った。タンパク質の発現確認を、抗 His タグ抗体を用いたウェスタンブロッティングにて、また、精製度の確認をクマシー染色により行った（図 3）。さらに、プロテアーゼ消化産物の質量分析により、NOTCH1EGF8-13 上の糖鎖修飾を解析した。以上の実験から、今後の相互作用解析に用いる NOTCH1EGF8-13 タンパク質を作製可能であることが分かった。本実験では、野生型の HEK293T 細胞にて Notch タンパク質を作製したが、今後、キシロース転移酵素をノックアウトした細胞を用いて、NOTCH1EGF8-13 タンパク質を作製する。これにより、糖鎖修飾パターンの異なる組換えタンパク質を作製し、糖鎖修飾の Notch リガンド結合ドメインと NRR ドメインとの相互作用に対する影響を明らかにする。

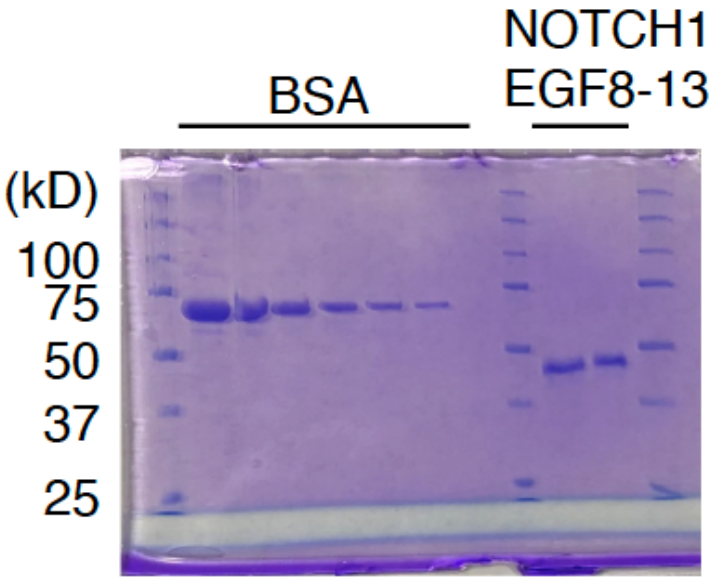


図 3. 組換えヒト NOTCH1EGF8-13 の発現と精製
精製したヒト NOTCH1EGF8-13 タンパク質を透析後、10% SDS-PAGE し、クマシー染色により検出した。BSA は定量のスタンダードで、1μg から 2 倍希釈系列。NOTCH1EGF8-13 の左は透析前、右は透析後のサンプルである。

3. キシロース転移酵素に対する阻害剤の探索

将来的な AML 治療薬の開発を志向し、*O*-グルコースにキシロースを転移する糖転移酵素に対する阻害剤の探索に取り組んだ。具体的には、糖転移酵素スクリーニングのための酵素と基質の調製を行った。そして、GXYLT1、GXYLT2、を対象とし、*in vitro* における糖転移酵素反応とその副産物である UDP を検出するアッセイシステムの構築を目指した。各糖転移酵素は、MycHis タグを付加した形で HEK293T 細胞に発現させ、培養上清から Ni-NTA アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。タンパク質の競合溶出に使用したイミダゾールを除去するために、20%グリセロールを含む TBS にて透析した。タンパク質の発現確認は抗 His 抗体を用いたウェスタンブロット解析で、また、精製度の確認と定量は、BSA をスタンダードとして SDS-PAGE 後のクマシー染色により行った。POGLUT1、GXYLT1、GXYLT2 の発現並びに精製度を上記の方法により確認した。受容基質として、マウス NOTCH2 の EGF12 を大腸菌

発現系にて作製した。これは、細胞に発現させた NOTCH2 上の EGF12 はキシロース伸長を効率よく受けた *O*-グルコース糖鎖で修飾されること、大腸菌は *O*-グルコース糖鎖修飾機構を持たないため、糖鎖修飾のない基質の作製が可能であり、さらに、大腸菌発現系における収率が高いためである。キシロース転移酵素の基質として、*O*-グルコース単糖を付加した EGF タンパク質が必要となるが、これは、著者らの既報通り、POGLUT1 を用いて作製した［8］。糖転移反応の反応産物は、逆相 HPLC にて精製後、質量分析計を用いて糖の付加を確認した。作製した EGF タンパク質が POGLUT1 の基質になることを確かめ、また、GXYLT1 および GXYLT2 の阻害剤スクリーニングを実施するための基質作製のために、EGF12 タンパク質を POGLUT1 および UDP-グルコースと反応させることにより、*O*-グルコースの付加反応を行った。反応産物を逆相 HPLC にて分析した結果を図 4 に示した。反応前に比べて、ピークが左にシフトしたことから、*O*-グルコースが付加されたことが強く示唆された。このことは、ピークに含まれる反応産物の質量分析によっても確かめられた。

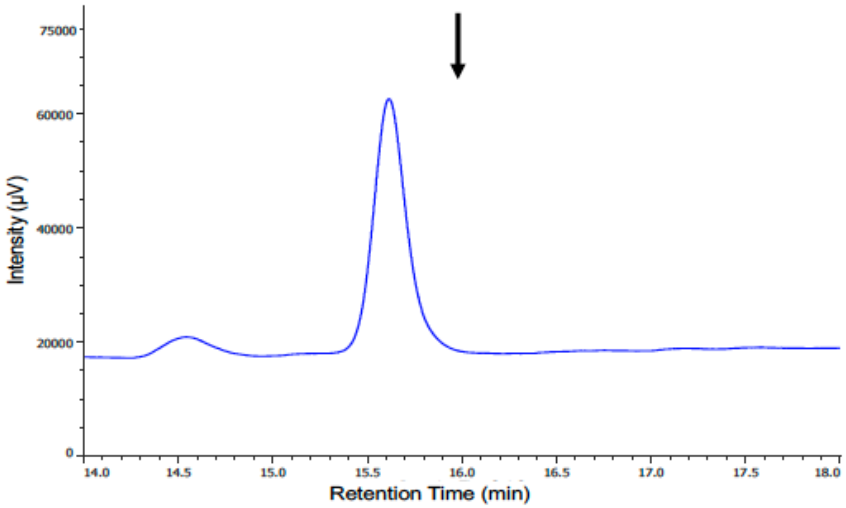


図 4. *O*-グルコース付加された EGF 受容基質の逆相 HPLC による解析結果
マウス NOTCH2EGF12 に相当するタンパク質を大腸菌にて作製し、それを *O*-グルコース転移酵素 POGLUT1 および供与基質 UDP-グルコースと反応させた後、逆相 HPLC にて分析した。矢印は、反応前の NOTCH2EGF12 タンパク質の溶出位置を示す。糖転移反応により、ピークの溶出位置がシフトした。

考　察

本研究では、Notch 受容体の糖鎖修飾が、白血病細胞の増殖を制御する機構を解明するために、AML 細胞株 HL60 細胞におけるキシロース転移酵素遺伝子の性状解析、Notch 細胞外ドメインの発現、そして、キシロース転移酵素阻害剤探索のための実験を行った。

TCGA データベースに収載されている情報に基づき、HL60 細胞の *GXYLT1* にはナンセンス変異 R295*が存在することに着目し、これが、ヘテロ変異であることを実験的に明らかにした。また、HL60 細胞には、*GXYLT1* のみならず、生化学的に基質特異性の類似している *GXYLT2* も発現していることが分かった。したがって、HL60 細胞の産生する Notch 受容体上の *O*-グルコース糖鎖のキシロース伸長を完全に除去するには、*GXYLT1* と *GXYLT2* の両方をノックアウトする必要があると考えられた。そのため、現在、この実験を遂行中である。さらに、*GXYLT1* と *GXYLT2* の過剰発現により、糖鎖修飾レベルを変化させ、その細胞増殖に対する影響を調べる実験も計画している。この目的のために、レンチウイルス発現系により、両キシロース転移酵素を発現させるためのベクターを作製した。データは割愛したが、これらのベクターが HEK293T 細胞において機能することは確かめられている。今後、*O*-グルコース糖鎖のキシロース伸長レベルの異なる細胞の挙動を比較解析していく。

O-グルコース糖鎖のキシロース伸長が Notch 受容体の活性化を制御する分子メカニズムは、未だに明らかとなっていない。これまでの研究で、この糖鎖修飾は、Notch 受容体の生合成時に小胞体においてその品質管理に寄与することが示唆されている。これは、糖鎖修飾が EGF ドメインの構造を安定化するためであると考えられている。また、著者らは、別の研究において、*O*-グルコース糖鎖のキシロース伸長が、Notch 受容体とリガンドとの相互作用を補助する作用があることを現在見出している。したがって、*O*-グルコース糖鎖修飾は複数の機能を有する可能性が高い。本研究では、上記二つの機能に加えて、糖鎖修飾が、Notch 受容体中のリガンド結合領域と膜貫通領域との相互作用に影響する可能性があるという仮説を立てて実験を遂行した。本研究で発現、精製したヒト NOTCH1EGF8-13 タンパク質は、リガンド結合領域を含むものであり、今後、この仮説を追求するための有用なツールになることが期待される。

糖転移酵素の阻害剤は、一般に同定することが困難であることが知られている。本研究では、*O*-グルコース糖鎖のキシロース伸長を担うキシロース転移酵素 GXYLT1 および GXYLT2 に対する阻害剤の探索に取り組んだ。*O*-グルコース転移酵素阻害剤探索に関する著者らの予備的実験結果に基づき、本研究でも、まずは、酵素の受容基質の作製を行った。その結果、精製度の高い *O*-グルコース単糖の付加された EGF 受容基質を作製することに成功した。今後、この基質を用いて、低分子化合物ライブラリーを対象として、GXYLT1 および GXYLT2 の阻害剤を探索する。

今後の糖鎖科学研究の発展により、Notch シグナルの活性化メカニズムの理解が進み、白血病細胞の増殖を制御するための糖鎖修飾を標的とする新しい治療法が開発されることが大いに期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行に尽力した静岡県立大学薬学部生化学分野の高橋忠伸准教授、南彰講師、紅林佑希助教、そして学生諸君に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Ntziachristos P, Lim JS, Sage J, Aifantis I. Cancer Cell. 2014 Mar 17;25(3):318-34. PMID:24651013 DOI: 10.1016/j.ccr.2014.02.018
2) Urata Y, Takeuchi H. Effects of Notch glycosylation on health and disease. Dev Growth Differ. 2020 Jan;62(1):35-48. Epub 2019 Dec 30. PMID: 31886522 DOI:10.1111/dgd.12643
3) Acar M, Jafar-Nejad H, Takeuchi H, Rajan A, Ibrani D, Rana NA, Pan H, Haltiwanger RS, Bellen HJ. Cell. 2008 Jan 25;132(2):247-58. PMID: 18243100 DOI: 10.1016/j.cell.2007.12.016
4) Sethi MK, Buettner FF, Krylov VB, Takeuchi H, Nifantiev NE, Haltiwnager RS, Gerardy-Schahn R, Bakker H. J Biol Chem. 2010 Jan 15;285(3):1582-6. Epub 2009 Nov 25. PMID:19940119 DOI: 10.1074/jbc.C109.065409
5) Sethi MK, Buettner FF, Ashikov A, Krylov VB, Takeuchi H, Nifantiev NE, Haltiwnager RS, Gerardy-Schahn R, Bakker H. J Biol Chem. 2012 Jan 20;287(4):2739-48. Epub 2011 Nov 23. PMID:22117070 DOI:10.1074/jbc.M111.302406
6) Kannan S, Sutphin RM, Hall MG, Golfman LS, Fang W, Nolo RM, Alers LJ, Hammitt RA, McMurray JS, Kornblau SM, Melnick AM, Figueroa ME, Zweidler-McKay PA. J Exp Med. 2013 Feb 11;210(2):321-37. Epub 2013 Jan 28. PMID:23359069 DOI:10.1084/jem.20121527
7) Zeronian MR, Klykov O, de Montserrat JP, Konijnenberg MJ, Gaur A, Scheltema RA, Janssen BJC. Proc Natl Acad Sci USA. 2021 Jul 27;118(30):e2102502118. PMID:34301900 DOI:10.1073/pnas.2102502118
8) Yu H, Takeuchi M, LeBarron J, Kantharia J, London E, Bakker H, Haltiwanger RS, Li H, Takeuchi H. Nat Chem Biol. 2015 Nov;11(11):847-54. Epub 2015 Sep 28. PMID:26414444 DOI:10.1038/nchembio.1927