

提 供 日 2026/08/25

タイトル 新たな O-型糖鎖修飾の発見

細胞運命を決定する Notch シグナル制御の新たな制御機構を解明

担 当 静岡県公立大学法人 静岡県立大学

連 絡 先 054-264-5130

新たな O-型糖鎖修飾の発見

細胞運命を決定する Notch シグナル制御の 新たな制御機構を解明

静岡県立大学薬学部生化学分野の竹内英之教授、塚本庸平助教、名古屋大学大学院医学系研究科分子細胞化学の岡島徹也教授、東海大学医学部医学科基礎医学生体防御学の細川裕之准教授、鎌裕一助教らの研究グループは他三機関との共同研究により、細胞の発生、分化に重要な Notch 受容体上に新たな糖鎖修飾を発見し、その新奇糖鎖修飾が Notch1 シグナルを抑制することを見出しました。本研究成果は 2025 年 10 月 28 日刊行の「Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America」第 122 巻 43 号に掲載されました。

Notch シグナルは多細胞生物の分化、発生に重要な役割を果たすシグナル伝達経路です。この Notch シグナルは細胞の表面に存在する巨大な受容体タンパク質 NOTCH に、他の細胞の表面に存在するリガンドタンパク質が結合することで開始され、最終的に遺伝子発現を変化させることで細胞内にシグナルを伝達します。この受容体の機能不全は多くの先天性疾患や癌を引き起こします。Notch 受容体の適切な機能発揮には、Notch 受容体の細胞外領域にグルコースやフコースといった糖が付加する、O-型糖鎖修飾が必要です。しかしながら、この O-型糖鎖修飾がどのように Notch 受容体機能を制御しているかは明らかになっていない部分が多くあります。本研究では、液体クロマトグラフィ質量分析法 (LC-MS) による最新の解析手法などを用いて、Notch 受容体上にこれまでに知られていない糖鎖修飾を発見し、その機能を明らかにしました。

【掲載論文】

Tsukamoto Y, Aoki K, Kama Y, Hosokawa H, Saiki W, Tsukamoto N, Kato K, Hosokawa Y, Sato R, Uesugi N, Fujita Y, Fukazawa K, Funada D, Suzuki F, Kurebayashi Y, Urata Y, Uchiyama S, Wang W, Minami A, Takahashi T, Tiemeyer M, Narimatsu Y, Okajima T, Takeuchi H.

Differential O-glucose elongation on a specific EGF repeat within the canonical ligand-binding domain regulates DLL1/4-NOTCH1 signaling.

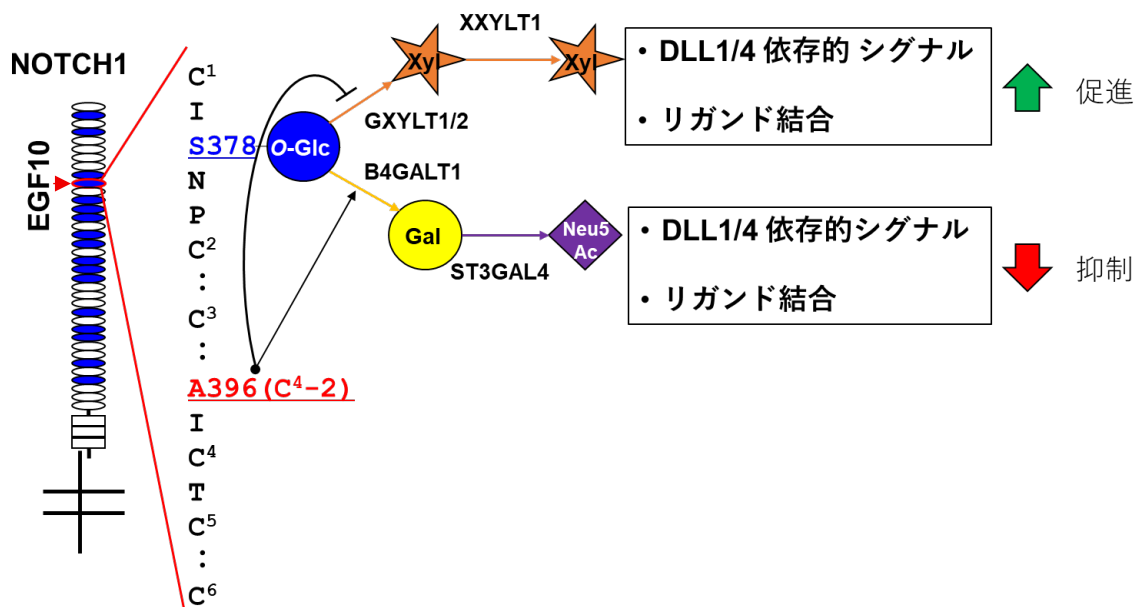
Proc Natl Acad Sci U S A. 2025 Oct 28;122(43):e2504827122.

DOI: [10.1073/pnas.2504827122](https://doi.org/10.1073/pnas.2504827122) Epub 2025 Oct 23.

PMID: 41129232; PMCID: PMC12582257.

【概要図】

NOTCH1 の EGF10 上にはアミノ酸配列に依存してキシロース伸長した *O*-グルコース糖鎖とガラクトース伸長した *O*-グルコース糖鎖が存在する。NOTCH1 のリガンド結合とシグナル伝達をキシロース伸長は促進し、ガラクトース伸長は抑制する。(Tsukamoto et al. 2025, Proc Natl Acad Sci U S A より一部改変)



【研究の概要】

Notch 受容体は細胞外領域に、アミノ酸配列や立体構造の類似性から上皮増殖因子様 (EGF) リピートと呼ばれる繰り返し構造を持っています。この EGF にコンセンサス配列と呼ばれる特定のアミノ酸配列がある場合、*O*-型糖鎖が糖転移酵素によって付加されます。*O*-グルコース (Glc) 糖鎖は EGF リピート中の C¹XSX(P/A)C² というアミノ酸配列の下線を付したセリン (S) 残基に付加されます。EGF に付加された *O*-グルコースはさらに別の糖によって伸長を受けます。これまでに知られていたのはキシロース (Xyl) と呼ばれる糖によって伸長した、S-Glc-Xyl-Xyl という三糖構造でしたが、質量分析計を用いた解析によりガラクトース (Gal) と *N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) という糖で伸長した S-Glc-Gal-Neu5Ac という新奇の構造を発見しました。この構造は糖脂質を修飾する糖鎖としてよく知られていましたが、糖タンパク質を修飾する糖鎖としては初めて発見されました。

これまでに *O*-グルコース糖鎖は Notch 受容体を安定化させることで細胞内から細胞表面への輸送を促進することや、Notch シグナルを変化させることが知られています。Notch 受容体には *O*-グルコースの付加部位が多数あり、その修飾割合や伸長度には修飾部位に固有の性質があることが分かっています。これまでの研究では糖転移酵素遺伝子の欠損により Notch 受容体上のすべての *O*-グルコースを欠損させた際の Notch 受容体機能の変化を調べたものが多く、部位特異的な糖鎖修飾の変化による Notch 受容体機能の変化を調べた研究はあまりありませんでした。

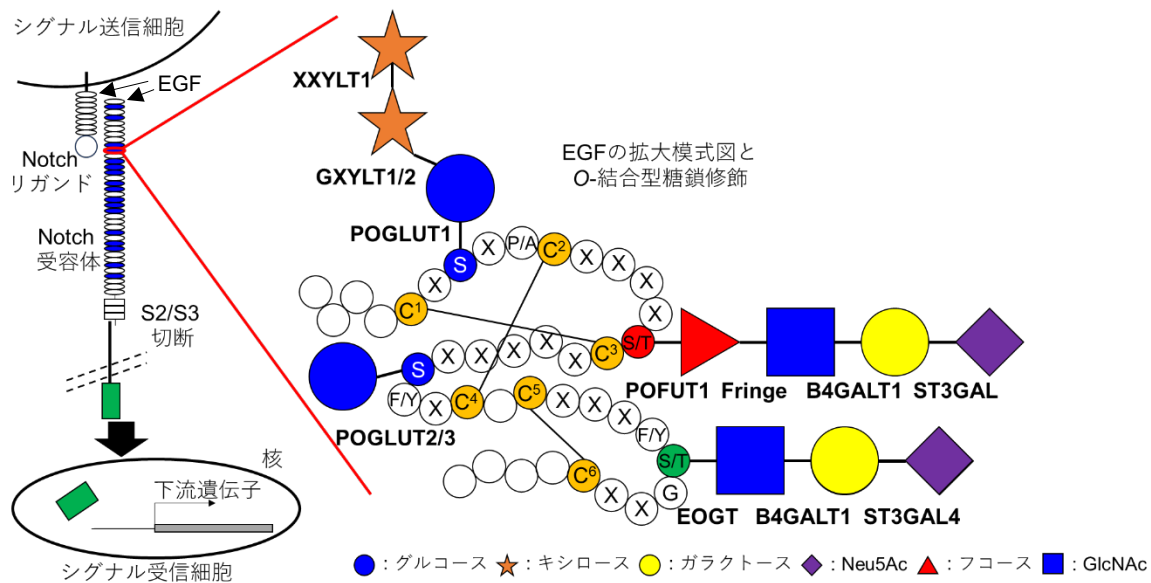


図1 Notch 受容体と EGF の模式図

細胞表面に存在する Notch 受容体は、他の細胞表面に存在するリガンドタンパク質と結合することで細胞内へのシグナル伝達を行う。Notch 受容体の細胞外領域には 40 アミノ酸前後からなる EGF の繰り返し構造 (図中 左、小楕円) が存在し、各 EGF にはシステインが六つ保存されている (図中 右、拡大模式図)。EGF はコンセンサス配列に従って、糖転移酵素依存的に三種類の糖鎖修飾を受ける。

新奇糖鎖修飾は NOTCH1 の細胞外領域に存在する 36 個の EGF のうち、10 番目の EGF (EGF10) にのみ存在することが質量分析の結果から見出されました。EGF10 上の *O*-グルコースは従来から知られるキシロースによっても、新奇のガラクトースによっても伸長することが明らかになりました。また、糖転移酵素欠損細胞由来の糖鎖を解析することで、糖鎖の生合成に必要な糖転移酵素を同定しました。その結果 *O*-グルコースに対してガラクトース伸長を担う糖転移酵素は Beta-1, 4-galactosyltransferase1 (B4GALT1) であり、ガラクトース伸長した *O*-グルコースに対して Neu5Ac 伸長を担う糖転移酵素は Beta-galactoside alpha-2, 3-sialyltransferase4 (ST3GAL4) であることが明らかになりました。これらの糖転移酵素は糖脂質上で Glc-Gal-Neu5Ac の構造を生合成する酵素とは異なっており、同様の構造であっても糖タンパク質と糖脂質では生合成に関与する因子が異なることが明らかになりました。また、B4GALT1 は *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、あるいはグルコースにガラクトースを付加する酵素として知られていました。しかし、基本的には GlcNAc を基質とし、グルコースを基質とするためには乳腺などに特異的に発現している α -ラクトアルブミンが補因子として必要であるとされてきました。本研究では、 α -ラクトアルブミンを発現しない細胞である HEK293T 細胞において B4GALT1 依存的に *O*-グルコースのガラクトース伸長が引き起こされることを明らかにしました。また、*O*-グルコース付加を受ける EGF のアミノ酸配列比較からガラクトース伸長において重要なアミノ酸として 396 番目のアミノ酸であるアラニン (A396) を特定しました。この部位を芳香族アミノ酸であるチロシン (A396Y) やフェニルアラニン (A396F) に置換すると *O*-グルコース糖鎖のガラクトース伸長は消失することを明らかに

しました。A396 は、ほぼすべての EGF に保存されている 6 つのシステインのうち、四つ目のシステインの二つ前の位置にあるアミノ酸です。これまでに、この部位には芳香族アミノ酸がよく保存されており、それが *O*-グルコース糖鎖の付加や伸長に重要であることが明らかになっていました。しかし、本研究により、芳香族アミノ酸でない場合 *O*-グルコース糖鎖の付加が低下するだけでなく、伸長パターンが変化することを明らかにしました。

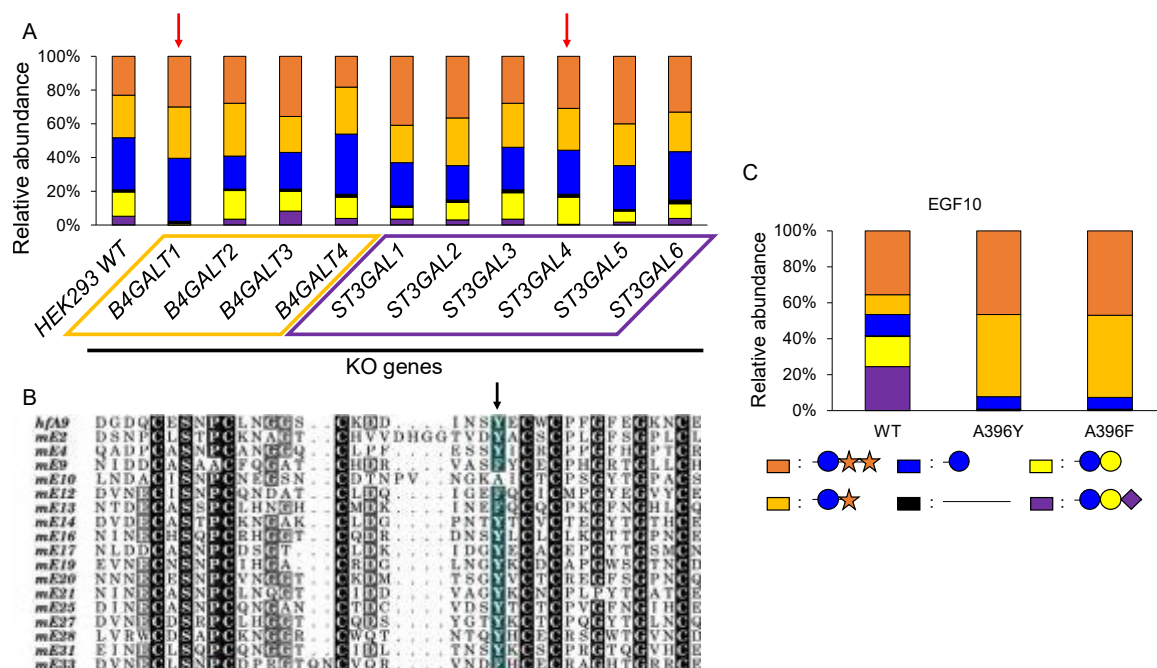


図2 新奇糖鎖の構造と生合成に関わる因子

A: 糖転移酵素遺伝子欠損細胞由来の NOTCH1 タンパク質上の糖鎖構造解析結果
赤矢印で示す *B4GALT1* 欠損細胞と、*ST3GAL4* 欠損細胞において紫と黄色で示した
新奇糖鎖が消失している。

B: EGF のアミノ酸配列比較

マウス NOTCH1 EGF10 (*mE10*) のみ黒矢印で示した四番目のシステインの二つ前のアミノ酸が芳香族アミノ酸でない。

C: 野生型 NOTCH1 と A396 部位変異体 NOTCH1 の糖鎖構造解析結果

黄色と紫で表される新奇糖鎖が野生型 NOTCH1 では確認できるが、A396 部位変異体では消失している。

(Tsukamoto et al. 2025, Proc Natl Acad Sci U S A、および Takeuchi et al. 2017 J Biol Chem より一部改変)

この新奇糖鎖修飾の Notch シグナルに対する影響も本研究では明らかにしています。A396 部位の変異体や糖転移酵素遺伝子欠損細胞、糖転移酵素遺伝子過剰発現細胞を用いて糖鎖修飾の異なる Notch タンパク質を用意し、糖鎖修飾の機能を調べました。NOTCH1 の組換えタンパク質をリガンド発現細胞と結合させた結果、キシロース伸長がリガンド結合を促進し、ガラクトース伸長がリガンド結合を抑制しました。さらに、

NOTCH1 全長の組換えタンパク質を発現した細胞を、リガンドの組換えタンパク質によって刺激することで発生する Notch シグナルを測定しました。その結果、ガラクトース伸長を欠く A396Y と A396F の変異体では、変異の無い野生型 NOTCH1 に比べてシグナル伝達が増強されました。最後に、Notch シグナル依存的に T 細胞前駆細胞に分化することが知られている、マウスのリンパ球前駆細胞に、野生型 NOTCH1、あるいは、A396Y と A396F の変異体 NOTCH1 を過剰発現し、リガンド発現細胞 (OP9) と共培養することで分化させました。このリンパ球前駆細胞 (Cas9-LPs) は B 細胞前駆細胞への分化に必要な *EBF1* 遺伝子を欠損しており、Notch シグナル依存的に T 細胞にのみ分化します。その結果、野生型 NOTCH1 を発現したリンパ球前駆細胞と比較して、ガラクトース伸長を欠く変異体を発現したリンパ球前駆細胞は非常に強く T 細胞への分化が促されました。これらの結果を総合すると、NOTCH1 とリガンドとの結合を、ガラクトース伸長は抑制し、キシロース伸長は促進します。その結果、ガラクトース伸長がない場合シグナル伝達が増進されます。この現象がリンパ球前駆細胞で起こった場合、増強された NOTCH1 シグナルの結果として、T 細胞への分化が強く促進されることが示唆されました。

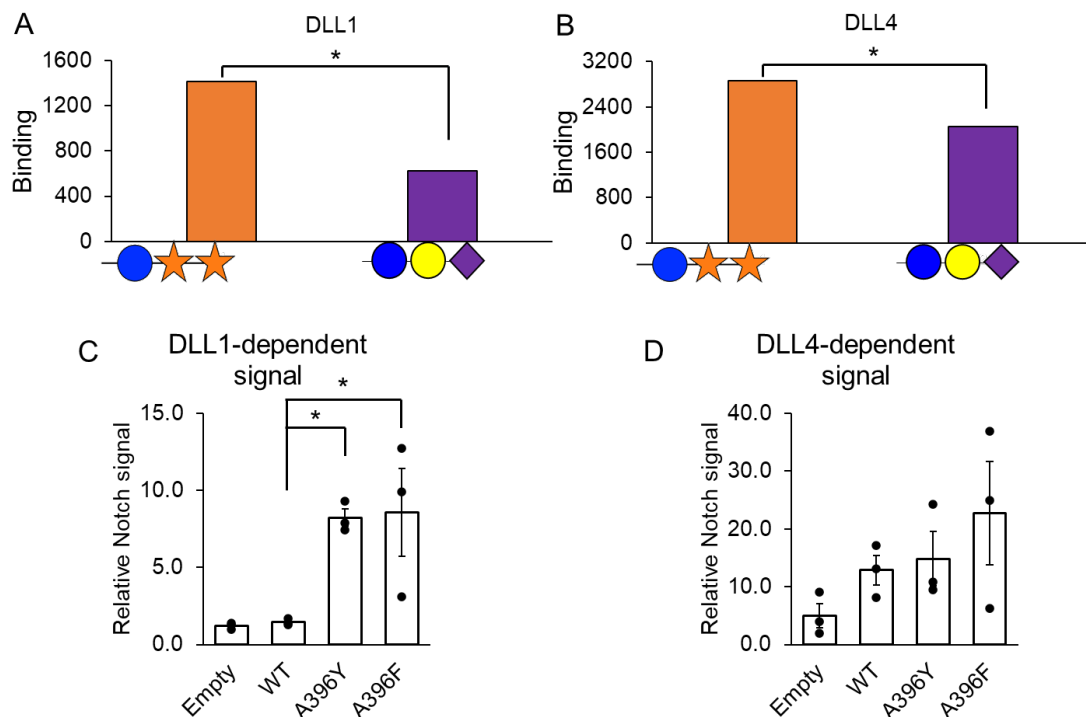


図3 糖鎖修飾によるリガンド結合と Notch シグナルの変化

A, B: 糖鎖修飾によるリガンド結合の変化

DLL1 および DLL4 の二種類のリガンドに対して、キシロース伸長した α -グルコース糖鎖が付加した NOTCH1 は結合性が高く、ガラクトース伸長した α -グルコース糖鎖が付加した NOTCH1 は結合性が低い。

C, D: 糖鎖修飾による Notch シグナルの変化

ガラクトース伸長を欠く変異体 NOTCH1 A396Y と A396F では、DLL1 依存的なシグナルが増強するが、DLL4 依存的なシグナルは有意に変化しない。

(Tsukamoto et al. 2025, Proc Natl Acad Sci U S A より一部改変)

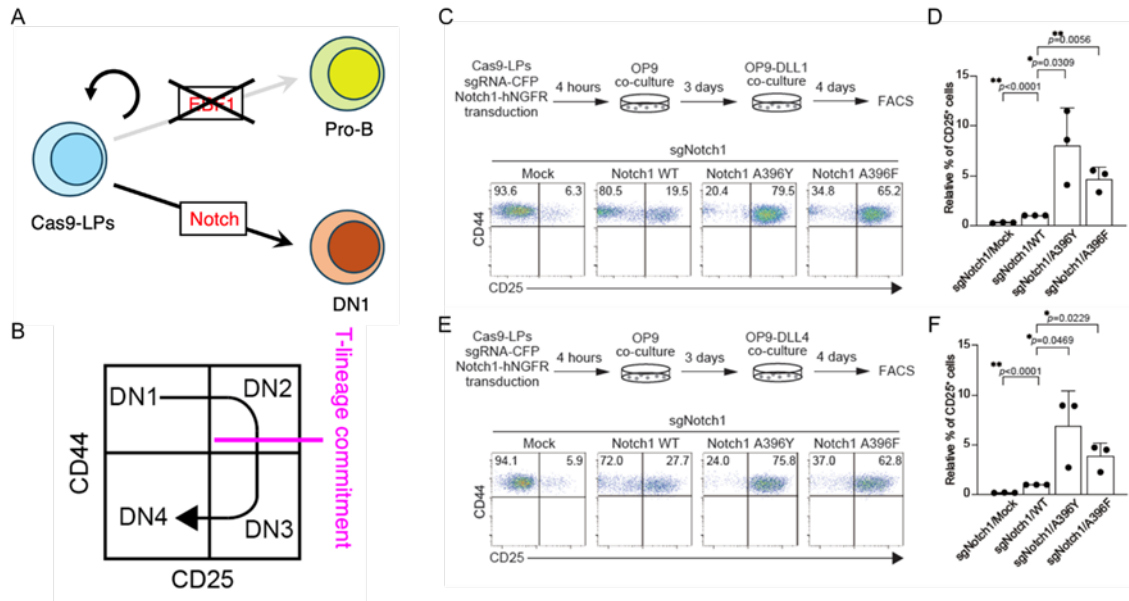


図4 糖鎖修飾によるリンパ球前駆細胞分化の変化

A: リンパ球前駆細胞 Cas9-LPs の概要

EBF1 遺伝子を欠いており、Notch シグナル依存的に T 細胞前駆体にのみ分化する

B: Cas9-LPs の分化指標

Cas9-LPs は分化すると細胞表面の CD25 と CD44 の発現量が変化する。

C-F: リガンド発現 OP9 細胞と共培養した NOTCH1 発現 Cas9-LPs の分化

リガンド発現 OP9 細胞と 4 日間共培養後、ガラクトース伸長を欠く A396Y および A396F 変異体を発現した Cas9-LPs は、野生型 NOTCH1 を発現した Cas9-LPs に対して有意に分化が促進した。

C: DLL1 発現 OP9 細胞と共培養した NOTCH1 発現 Cas9-LPs の分化

D: C の定量結果

E: DLL4 発現 OP9 細胞と共培養した NOTCH1 発現 Cas9-LPs の分化

F: E の定量結果

(Tsukamoto et al. 2025, Proc Natl Acad Sci U S A より一部改変)

本研究では、タンパク質上には存在しないとされていた構造を発見し、その生体内での合成に関与する糖転移酵素を同定しました。また、特定の場所にしか見られない理由をタンパク質側の特徴から説明しました。さらに、たった一か所のアミノ酸の違いが糖鎖の構造を大きく変化させ、その結果多細胞生物にとって非常に重要な Notch シグナルを制御することを明らかにしました。この発見は糖鎖生物学分野の基礎研究として糖鎖修飾の多様性の概念を拡張するほか、生物学一般として Notch 受容体の制御機構の一端を解明したと考えられます。本研究で明らかにしたような、糖鎖修飾による詳細な Notch シグナルの制御が明らかになりつつあることから、今後、Notch シグナル制御のために糖鎖修飾をターゲットとする創薬研究に繋がっていく可能性が期待されます。

【用語解説】

Notch シグナル

多細胞生物の細胞間シグナル伝達経路の一つ。細胞表面の Notch 受容体と他の細胞のリガンドが直接結合することで引き起こされる。発生、分化、恒常性維持など非常に重要な役割を果たす。

リガンド

受容体と結合する物質のこと。受容体と完全に 1 対 1 で対応している場合もあれば、一つの受容体に対して複数のリガンドがある場合や複数の受容体に対して一つのリガンドがある場合もある。Notch 受容体の主なリガンドとしては DLL1、DLL4、JAGGED1、JAGGED2 などが知られている。

糖鎖修飾

「第三の生命鎖」と呼ばれる、生物の生存に非常に重要な物質。グルコースなどの糖分子がグリコシド結合によって連なり鎖状をなしたもの。タンパク質や脂質、近年では核酸にも付加することが明らかになっている。糖鎖修飾が付加すると、付加した分子の機能が調節されたり、新たな機能、特性が追加されたりする。

O-型糖鎖

糖鎖修飾のうち、特にタンパク質のセリンまたはスレオニン残基などのヒドロキシ基を介して結合するものを指す。

O-グルコース糖鎖

O-型糖鎖修飾のうち、タンパク質に付加した β 結合のグルコースをコアとするもののこと。血液凝固因子に最初に見出された。糖転移酵素 POGLUT1 により付加されるものと、POGLUT2 と POGLUT3 により付加されるものの 2 種類がある。どちらも EGF 内の特定の配列を認識し付加される。POGLUT1 により付加される O-グルコース単糖は糖転移酵素 GXYLT1 と GXYLT2 によりキシロースを付加され、そのキシロースに XXYL1 によってさらにキシロースが付加されることで、最大で Xyl-Xyl-Glc の直鎖状の三糖構造をとる。

LC-MS

高速液体クロマトグラフィと質量分析計を接続した分析装置、およびそれにより物質を分析する手法のこと。溶液に溶かした物質を液体クロマトグラフィで分離し、質量分析装置でイオン化した後に質量を測定する。糖鎖生物学の分野では、抗体などの検出ツールの少ない糖鎖を直接的に分析する非常に有用なツールとして用いられている。

糖転移酵素

糖鎖修飾を実際に行う酵素群のこと。糖鎖修飾は糖転移酵素により、糖とヌクレオチドが結合した構造を有する糖ヌクレオチドを供与基質とし、タンパク質や脂質などといった受容基質に糖が転移されることで合成される。多くの糖転移酵素の活性中心は細胞内の小胞体やゴルジ装置の内腔に存在する。

HEK293T 細胞

培養細胞株の一つ。ヒト胎児腎臓由来の細胞にシミアンウイルス 40 由来の T 抗原が導入された細胞株。増殖が速く、遺伝子発現量とタンパク質発現量が高い。また、遺伝子導入の難易度も低いいため実験でよく使用される。

リンパ球前駆細胞

哺乳類の血液内で主に免疫を担うリンパ球の前駆体となる細胞。細胞外からの刺激を受けてリンパ球へと分化する。特に Notch シグナル依存的に T 細胞前駆へと分化し、初期 B 細胞因子 1 (EBF1) 依存的に B 細胞前駆へと分化する。

【研究内容に関するお問い合わせ先】

〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田52-1

静岡県立大学薬学部 生化学分野

竹内英之

(電話：054-264-5725、E-mail：htakeuchi[at]u-shizuoka-ken. ac. jp)

塚本庸平

(電話：054-264-5726、E-mail：tsukamoto.yohei[at]u-shizuoka-ken. ac. jp)

〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋143

東海大学医学部医学科基礎医学系生体防御学領域

細川裕之

鎌裕一

【報道に関するお問い合わせ先】

〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田52-1

静岡県立大学 経営企画室

(電話：054-264-5130、E-mail：koho[at]u-shizuoka-ken. ac. jp)

〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋143

東海大学医学部附属病院 事務部事務課広報

(電話：0463-90-2001、E-mail：prtokai[at]tokai. ac. jp)

※上記の[at]は@に置き換えてください。