

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研 究 テーマ	糖鎖修飾による Notch 受容体活性化機構の解析				
研究組織	代 表 者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	竹内 英之
	研究分担者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	高橋 忠伸
		所属・職名	薬学部・客員教授	氏名	南 彰
		所属・職名	薬学部・助教	氏名	紅林 佑希
	発 表 者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	竹内 英之

講演題目
糖鎖修飾による Notch 受容体活性化機構の解析
研究の目的、成果及び今後の展望
本研究では、申請者が開拓してきた独自の糖鎖科学研究を遂行し、生化学分野における教育の推進を図る。Notch シグナルは、細胞の運命決定を司る細胞間シグナル伝達経路である。哺乳類では、Notch 遺伝子は 4 種類存在する。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する。申請者は、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。申請者は、Notch の EGF ドメインに <i>O</i>-グルコースを付加する糖転移酵素 POGLUT1 を、Notch シグナルに必須の因子として同定した [Cell 2008]。申請者は、POGLUT1 のミスセンス変異により、筋肉の幹細胞である衛星細胞の数の減少と衛星細胞における Notch シグナルの低下が起こり、そのことが、肢帯型筋ジストロフィーの原因となることを見出した [Acta Neuropathologica 2020]。衛星細胞では、POGLUT1 は、発現している 3 種類全ての NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3 を糖鎖修飾することによって機能していると考えられる。しかしながら、NOTCH4 も含め、Notch の生体内における <i>O</i>-グルコース糖鎖修飾の付加と伸長度は明らかにされていない。これまでに、NOTCH1 と NOTCH2 の細胞外部位のみを、実験的に HEK293T 細胞に発現させ、精製後、質量分析計を用いて解析した結果、<i>O</i>-グルコース糖鎖修飾が予測されたほぼ全ての EGF ドメインで修飾が見られ、キシロース伸長の度合いには EGF ドメイン間で違いが見られた [Cells 2020]。本研究では、Notch 上の <i>O</i>-グルコース糖鎖修飾の全容を質量分析技術を用いて明らかにし、さらに、<i>O</i>-グルコース糖鎖修飾が Notch 受容体の活性化をどのように制御するか調べることを目的とした。レンチウイルス発現系を用いて、HEK293T 細胞およびマウス筋芽細胞 C2C12 細胞に FLAG タグを付加した全長型のマウス NOTCH2 を発現させ、特異抗体を用いた免疫沈降法により精製する。Notch タンパク質をプロテアーゼにより消化し、消化産物を Zip-Tip で精製後、Fusion LC-MS/MS (Thermo Fisher) にて解析した。その結果、二つの異なる細胞において発現させた NOTCH2 上の <i>O</i>-グルコース糖鎖修飾のパターンは非常によく似ていることが明らかとなった。今後、これらの糖鎖情報を用いて、それが Notch 受容体の活性化をどのように制御するのか調べていく。成果は、筋ジストロフィー発症メカニズムの解明と治療法の開発に大きく貢献する可能性がある。