

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

研 究 テーマ	Notch 受容体上における O-結合型糖鎖修飾の構造と機能の解析				
研究組織	代 表 者	所属・職名	薬学部・助教	氏名	塚本 庸平
	研究協力者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	竹内 英之
		所属・職名	薬学部・准教授	氏名	高橋 忠伸
		所属・職名	薬学部・講師	氏名	紅林 佑希
	発 表 者	所属・職名	薬学部・助教	氏名	塚本 庸平

講演題目
Notch 受容体上における O-結合型糖鎖修飾の構造と機能の解析
研究の目的、成果及び今後の展望 糖鎖は核酸、タンパク質と並ぶ第三の生命鎖と呼ばれる。様々な分子に付加することでその機能や細胞内外でのふるまいを変化させる。Notch 受容体は多細胞生物の発生、分化において重要な役割を果たすタンパク質受容体である。この Notch 受容体の正常な機能には O-結合型糖鎖修飾が重要であることが明らかになっている。Notch 受容体は I 型膜タンパク質受容体であり、哺乳類ではパラログとして Notch1-4 が存在する。Notch 受容体の細胞外領域には上皮増殖因子（EGF）様リピートが 29-36 個存在する。Notch 受容体上に付加する主な糖鎖修飾は非典型 O-結合型糖鎖修飾と呼ばれる O-グルコース、O-フコース、O-GlcNAc をコアとする修飾である。しかし、これらの糖鎖修飾の構造についての情報は依然として不足している。また部位特異的な糖鎖修飾の Notch シグナルへの機能も明らかになっていない部分が多い。研究代表者はこれまでに NOTCH タンパク質の質量分析による解析結果から、NOTCH1 上の O-グルコース糖鎖に、従来から知られる Xyl-Xyl-Glc とは異なる Neu5Ac-Gal-Glc からなる構造が部位特異的に存在することを見出し、その機能を明らかにした。質量分析を用いて Notch 受容体上に実際に存在する O-結合型糖鎖修飾の構造、および存在比を明らかにし、さらに部位特異的なそれらの機能を明らかにすることを本研究では目的とした。 培養細胞に発現させた NOTCH3 の EGF ドメイン全長を質量分析に供し糖鎖修飾を解析した結果、様々な EGF において多様な O-結合型糖鎖修飾が存在していた。また、NOTCH1 において発見された Neu5Ac-Gal-Glc の構造は NOTCH3 にも確認された。また NOTCH1 と同様の変異によりこの糖鎖構造の伸長は阻害できることを見出した。さらに、マウス血液から回収したタンパク質を特定の糖鎖を指標として濃縮し、質量分析により網羅的グライコプロテオミクスを行った結果、内在性の NOTCH3 においてもこの糖鎖構造は存在することが示唆された。 また、分泌型の野生型 NOTCH3 の細胞外領域の一部、若しくは糖鎖伸長の阻害される変異体の NOTCH3 の細胞外領域の一部を細胞に発現させ細胞外への分泌を比較した。その結果、分泌量に NOTCH1 の際と同様の変化が見られた。 このように NOTCH3 上の O-結合型糖鎖修飾を質量分析により調べた結果既知の NOTCH1 と類似した知見が得られた。今後の展望としてはこの Notch シグナリングにおいて重要な過程である、リガンドとの結合や下流遺伝子の転写活性化に対する糖鎖修飾の影響を解析していく。これにより Notch 受容体のリガンド選択性や組織特異性などに対する糖鎖修飾の寄与を明らかにする。さらに、最終的には血管平滑筋細胞株など、NOTCH3 が表現型に大きく影響することが知られている培養細胞株を用いて O-結合型糖鎖修飾の生物学的な重要性を明らかにすることを目標とする。