

糖転移酵素群の協調作用による NOTCH 受容体発現調節メカニズムの解明

Elucidation of the regulatory mechanism of NOTCH receptor expression by the cooperative action of glycosyltransferases

(生化学学会推薦)

代表研究者	名古屋大学	岡島 徹也	Nagoya University	Tetsuya OKAJIMA
協同研究者	名古屋大学	田嶋 優子	Nagoya University	Yuko TASHIMA
	名古屋大学	竹内 英之	Nagoya University	Hideyuki TAKEUCHI
	名古屋大学	小川 光貴	Nagoya University	Mitsutaka Ogawa

Glycosylation, one of the post-translational modifications of proteins, is vital for regulating protein expression and function. The NOTCH receptors represent glycoproteins, where glycans are involved in their fine-tuning. Previous studies have identified several glycosyltransferases that modify approximately a tandem repeat of epidermal growth factor-like (EGF) domains located in the extracellular region of the NOTCH receptor. Six cysteine residues are present in each EGF domain, forming three pairs of disulfide bonds. Notably, the glycosyltransferase that modifies the EGF domain specifically recognizes the EGF domain that has completed folding and then catalyzes the sugar modification. However, the molecular mechanism by which O-glycans mediate the regulation of NOTCH expression has not been thoroughly investigated. Our study addressed the novel roles of O-glycans by establishing HEK293T cells triple mutant for POFUT1/POGLUT1/EOGT. Detailed analysis of Notch glycosylation by mass spectrometry, aggregation assay, and biochemical analysis of the degradation pathway suggested that lack of O-glycans caused misfolding of Notch EGF domains, which hampered proteasome-dependent degradation. Isolation of interacting molecules of NOTCH receptors under the deficiency of major O-glycans further indicated a novel role of O-glycans in promoting NOTCH receptor folding by suppressing the inappropriate association of chaperon proteins with folded EGF domains.

研究目的

主要なタンパク質の翻訳後修飾である糖鎖修飾は、タンパク質の発現や機能の制御に重要である。糖鎖修飾の機能的な重要性を端的に示す基質タンパク質として、NOTCH 受容体がある(1)。この NOTCH 受容体は、発生や恒常性維持に必須な NOTCH シグナルを伝達するが、O 型糖鎖の異常は NOTCH シグナルの伝達不全につながるため、O 型糖鎖付加の制御は非常に重要であ

る(2,3)。

これまでの研究で、複数の O 型糖鎖の修飾酵素が同定されている(4)(5)。これらの酵素は、NOTCH 受容体の細胞外領域に存在する約 30 個の連続した上皮成長因子様ドメイン (以下、EGF ドメイン) を修飾する。EGF ドメインには6個のシステイン残基が存在し、3 組のジスルフィド結合を形成している (Figure 1)。重要なことに、EGF ドメインを修飾する O 型糖鎖の修飾酵素は、フォールディングを完了した EGF ドメインを特異的に認識し、糖修飾を触媒す

る。すなわち、ジスルフィド結合が形成される前の未フォールディング状態のEGFドメインには作用しない。O-フコース転移酵素 1 (POFUT1)や O-グルコース転移酵素 1 (POGLUT1)と呼ばれる糖転移酵素は、それぞれ、タンパク質に直接、フコース/グルコースを付加するが、これらの酵素の欠損により、細胞膜表面上への NOTCH 受容体の発現が妨げられる(6)。したがって、以下のシナリオが考えられている。① NOTCH 受容体の EGF ドメインが正しくフォールディングされる。② O 型糖鎖が付加される。③ O 型糖鎖の作用により、NOTCH 受容体の細胞膜表面へと輸送される。

しかしながら、O 型糖鎖がどのような分子メカニズムで NOTCH 受容体の発現調節に関わるのかは不明であった。我々は、主要な O 型糖鎖の欠損下における NOTCH 受容体の糖鎖修飾、タンパク質代謝、相互作用分子を詳細に解析することで、従来、考え

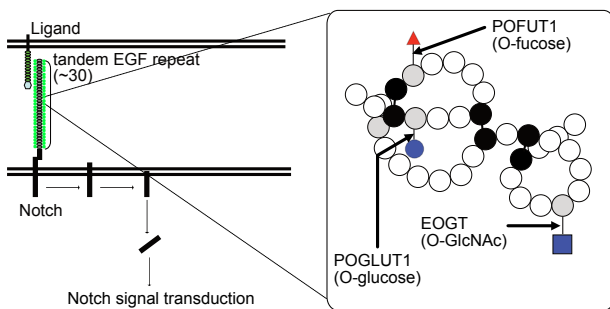


Figure 1. Notch receptor is modified with O-fucose, O-glucose, and EOGT by POFUT1, POGLUT1, and EOGT, respectively, at a tandem EGF repeat of Notch receptor.

られていなかった NOTCH 受容体のフォールディングを促進する O 型糖鎖の新たな役割が示唆された。

研究経過

(1) 3種類の異なる糖転移酵素による NOTCH 受容体の細胞膜発現の制御

NOTCH 受容体の O 型糖鎖修飾に関する主要な糖転移酵素である POFUT1、POGLUT1 に加えて、EGF ドメイン特異的 O-GlcNAc 転移酵素(EOGT)を欠損した HEK293 細胞を樹立した。この 3 重変異細胞では、Notch1 の細胞膜への発現が完全に消失した。一方、POFUT1 もしくは POGLUT1 を発現させることにより、Notch1 の細胞膜発現が部分的に回復した。また、

EOGT の共発現による協調作用も観察された。以上の結果より、3 重変異細胞は POFUT1/POGLUT1/EOGT に依存的な O 型糖鎖付加反応の分泌過程における機能を反映していることが確認できた。

(2) 糖転移酵素 3 重変異体における NOTCH 受容体の残留糖鎖の解析

3 重変異細胞では、O 型糖鎖を完全に欠損するのか、一部、残留する O 型糖鎖が存在するのかを確かめるために、内在性 Notch 受容体を免疫沈降により単離し、プロテアーゼを用いて生じた消化産物を Orbitrap Fusion を用いた質量分析を行った。その結果、予想していた POFUT1/POGLUT1/EOGT が触媒する O-フコース、O-グルコース、O-GlcNAc による修飾が消失した。一方で、POGLUT 2 や POGLUT 3 が修飾する O-グルコースの残存が示唆された。

(3) 糖転移酵素 3 重変異体における NOTCH 受容体の細胞内発現分布の解析

3 重変異細胞における NOTCH 受容体の局在の異常を明らかにするために免疫染色をしたところ、NOTCH 受容体の細胞内への蓄積が観察された。また、タンパク質凝集アッセイより、3 重変異細胞における凝集体の形成が観察された。こうした異常 NOTCH 受容体の分解機構を明らかにするために、プロテアソームやオートファジーの阻害剤を用いて解析したが、蓄積した NOTCH 受容体の発現レベルは、これらの阻害剤により大きな変化は認められなかった。一方で、岐阜大学の 大橋博士の実験結果から、還元剤を培養細胞に直接添加することで、NOTCH 受容体の細胞内蓄積が解消されることが明らかにされた。また、還元剤依存的な NOTCH 受容体の分解には、プロテアソーム経路に関わる分子の発現が必要であることが示された(大橋ら、未発表データ)。これらの結果より、プロテアソーム経路依存的な NOTCH 受容体の分解経路が存在すること、そして、細胞内に蓄積された NOTCH 受容体は、還元されない限り、プロテアソーム経路で分解を受け

ないことが示唆された。

(4) O 型糖鎖欠損 NOTCH 受容体と相互作用する分子の同定

NOTCH 受容体発現における O 型糖鎖の役割を分子レベルで理解するために、O 型糖鎖欠損 NOTCH 受容体との相互作用因子の探索を行った。1 つは、BioID 法を用いて糖鎖変異型 NOTCH1 と相互作用する分子を網羅的に同定した。別のアプローチとして、3 重変異細胞に発現する内在性 NOTCH に相互作用するタンパク質を免疫沈降法により単離し、質量分析により同定した。複数の分子が両グループに共通しており、その中に、ジスルフィド結合の形成に関わる PDI ファミリータンパク質が含まれていた。

考察

これまでに POFUT1/POGLUT1 を用いた糖転移酵素の変異実験より、O 型糖鎖が NOTCH 受容体の細胞表面発現に必要であること、さらには、EGF ドメインの安定性に寄与することが報告されている(6)。しかしながら、これら以外にも NOTCH 受容体を修飾酵素が存在し、その中でも特に EOGT による O-GlcNAc 修飾は、NOTCH 受容体 1 分子あたり、21 箇所の予想付加部位が存在している(7)。さらに、EOGT の過剰発現より NOTCH 受容体の細胞外領域の分泌量が増加することも見出している(8)。そこで、本研究課題では、POFUT1、POGLUT1、EOGT の 3 重変異により、大部分の O 型糖鎖を欠損させた際の NOTCH 受容体の発現様式について、検討を行った。その結果、内在性 NOTCH 受容体の細胞表面への発現が消失し、細胞内の蓄積が観察された。さらに、3 重変異細胞において凝集体形成の亢進が観察された。これらの結果より、O 型糖鎖欠損により、NOTCH 受容体の輸送よりむしろ、フォールディングの異常の可能性が示唆された。

O 型糖鎖欠損に伴う異常な NOTCH 受容体の分解経路を理解するために、プロテアソームやオートファジーの阻害実験を行ったが、細胞内の発現量に大きな変化は認められなかった。一方で、3 重変異細

胞に還元剤を添加することで、NOTCH 受容体の蓄積が解消された。さらに、プロテアソーム経路を遮断することで、還元剤存在下でも NOTCH 受容体の蓄積が観察された。以上のことより、3 重変異細胞では、ジスルフィド結合の異常を伴う NOTCH 受容体凝集体の形成を通じて、プロテアソーム経路を介した分解抵抗性を獲得したことが示唆された。

以上の結果は、NOTCH 受容体の O 型糖鎖修飾が EGF ドメインのフォールディングに間接的に関与することを示唆する。予備的な研究結果より、3 重変異細胞から単離した NOTCH 受容体に残存する O 型糖鎖の付加率が低下することが示された。この残存する糖鎖は POGLUT2/3 が付加するものと考えられ、他の糖転移酵素と同様に正しくフォールディングを受けた EGF ドメインに特異的に作用することから、EGF ドメインのフォールディングの異常を支持する。このことは、O 型糖鎖は、正しいフォールディングを受けた EGF ドメインに特異的に作用することと一見、矛盾する。一方で、3 重変異細胞では、NOTCH 受容体から主要な O 型糖鎖の欠損により、PDI ファミリータンパク質との相互作用が認められた。これらの結果より、EGF ドメインの O 型糖鎖は、フォールディングが完了した EGF ドメインが PDI ファミリー分子などのシャペロンタンパク質と相互作用することを抑制することで、フォールディング途中の EGF ドメインに選択的にシャペロンが作用することを保証する分子機序に関与することが考えられた (Figure 2)。この仮説に基づき、酵素活性を持たない糖転移酵素 (POFUT1) が EGF ドメインと相互作用することで、酵素活性非依存的に NOTCH 受容体のフォールディングを促進するメカニズムの一部を説明できる可能性がある(9)。

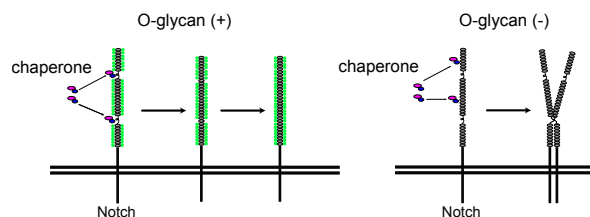


Figure 2. Schematic representation of a potential role of O-glycans on the folding of Notch EGF domains.

参考文献

1. Haltiwanger, R. S., Wells, L., Freeze, H. H., Jafar-Nejad, H., Okajima, T., and Stanley, P. (2022) Other classes of eukaryotic glycans. *Essentials of Glycobiology [Internet]. 4th edition*
2. Lo, P.-W., and Okajima, T. (2022) Eogt-catalyzed O-GlcNAcylation. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **34**, E1-E6
3. Stanley, P., and Okajima, T. (2010) Roles of glycosylation in Notch signaling. *Curr Top Dev Biol* **92**, 131-164
4. Takeuchi, H., and Haltiwanger, R. S. (2014) Significance of glycosylation in Notch signaling. *Biochemical and biophysical research communications* **453**, 235-242
5. Sakaidani, Y., Nomura, T., Matsuura, A., Ito, M., Suzuki, E., Murakami, K., Nadano, D., Matsuda, T., Furukawa, K., and Okajima, T. (2011) O-linked-N-acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interactions. *Nat Commun* **2**, 583
6. Takeuchi, H., Yu, H., Hao, H., Takeuchi, M., Ito, A., Li, H., and Haltiwanger, R. S. (2017) O-Glycosylation modulates the stability of epidermal growth factor-like repeats and thereby regulates Notch trafficking. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 15964-15973
7. Tsukamoto, Y., Ogawa, M., Yogi, K., Tashima, Y., Takeuchi, H., and Okajima, T. (2022) Glycoproteomics of NOTCH1 EGF repeat fragments overexpressed with different glycosyltransferases in HEK293T cells reveals insights into O-GlcNAcylation of NOTCH1. *Glycobiology* **32**, 616-628
8. Zhang, A., Tsukamoto, Y., Takeuchi, H., Nishiwaki, K., Tashima, Y., and Okajima, T. (2022) Secretory expression of mammalian NOTCH tandem epidermal growth factor-like repeats based on increased O-glycosylation. *Analytical Biochemistry* **656**, 114881
9. Okajima, T., Xu, A., Lei, L., and Irvine, K. D. (2005) Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase 1 promotes notch receptor folding. *Science* **307**, 1599-1603

研究の発表

口頭発表

1. 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: O-fucose 修飾と O-glucose 修飾は DLK1 の効率的な輸送に大事である、第 41 回日本糖質学会年会、2022 年 9 月
2. Yuko Tashima, Wakako Goto, Yohei Tsukamoto, Mitsutaka Ogawa, Hideyuki Takeuchi, Tetsuya Okajima. Roles of POFUT1 and POGLUT1 for the effective transport of DLK1 to the cell surface. Society for Glycobiology 2022, Dec
3. 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: O-fucose と O-glucose 修飾は DLK1 の効率的な輸送に重要である、第 95 回日本生化学会大会、2022 年 11 月
4. Yuko Tashima, Wakako Goto, Yohei Tsukamoto, Natsumi Tsukamoto, Shiori Go, Hiroyuki Kaji, Mitsutaka Ogawa, Hideyuki Takeuchi, Tetsuya Okajima. Roles of O-fucose and O-glucose for the effective transport of DLK1 to the cell surface. 2023 Glycobiology Conference GRC 2023, Mar.

誌上発表

1. Tsukamoto Yohei, Ogawa Mitsutaka, Yogi Kentarou, Tashima Yuko, Takeuchi Hideyuki, Okajima Tetsuya. Glycoproteomics of NOTCH1 EGF repeat fragments overexpressed with different glycosyltransferases in HEK293T cells reveals insights into O-GlcNAcylation of NOTCH1. *Glycobiology* **32** 616-628 (2022)
2. Lo Peiwen, and Okajima Tetsuya. (2022) Eogt-catalyzed O-GlcNAcylation. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **34**, E1-E6
3. Zhang Ailing, Tsukamoto Yohei, Takeuchi Hideyuki,

Nishiwaki Kimitoshi, Tashima Yuko, Okajima Tetsuya. Secretory expression of mammalian NOTCH tandem epidermal growth factor-like repeats based on increased O-glycosylation. *Analytical Biochemistry* **656** 114881 (2022)