



Title	Study on Conformational Characteristics of Human NOTCH1 EGF Domains Induced by Dynamic O-glycosylation [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	横井, 康広
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第14300号
Issue Date	2020-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80296
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yasuhiro_YOKOI_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士(生命科学) 氏 名 横井 康広

学 位 論 文 題 名

Study on Conformational Characteristics of Human NOTCH1 EGF Domains Induced
by Dynamic *O*-glycosylation
(動的な糖鎖修飾が誘起するヒト NOTCH1 レセプター-EGF 様ドメインの立体構造特性に
関する研究)

Notch シグナルは進化的に保存されたシグナル伝達システムであり、すべての後生動物種における細胞の運命決定プロセスを調節する。成体哺乳類では、Notch シグナルは神経や造血幹細胞の維持と分化、および多くの免疫系の発達と調節を担っており、Notch 経路の機能不全は、がんをはじめとするいくつかの疾患に関連している。ヒト NOTCH1 受容体の細胞外ドメインは 36 の上皮成長因子(epidermal growth factor; EGF)様リピートより構成され、中でも EGF8~12 ドメインはリガンドとの結合に関与していることが示唆されている。それぞれの EGF ドメインは 3 つのジスルフィド結合 (C1-C3、C2-C4 および C5-C6) を有し、また EGF ドメインの多くは 3 種類の *O*-結合型糖鎖修飾 (α -*O*-fucose [成熟型: Neu5Ac α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 3Fuc α 1 $\rightarrow$ Thr/Ser]、 β -*O*-glucose [Xyl α 1 $\rightarrow$ 3Xyl α 1 $\rightarrow$ 3Glc β 1 $\rightarrow$ Ser or Glc β 1 $\rightarrow$ Ser]、および β -*O*-GlcNAc [Neu5Ac α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 1 $\rightarrow$ Thr/Ser]) のうち 1 つ以上を受ける。それぞれの糖鎖修飾は 2 つのシステイン残基の間に固有のコンセンサス配列を有し、*O*-fucose 修飾では C2-X-X-X-X-(T/S)-C3、*O*-glucose 修飾では C1-X-S-X-(P/A)-C2 もしくは C3-X-N-T-X-G-S-F-X-C4、*O*-GlcNAc 修飾では C5-X-X-G-X-(T/S)-G-X-X-C6 であることがわかっている。これらの糖鎖修飾はリガンドとの結合能を調節するなど、Notch シグナルの機能に影響を与えることが知られている。先行研究において、EGF12 ドメインの化学合成および NMR 立体構造解析により、2 つの糖鎖修飾 (α -*O*-fucose および β -*O*-glucose) とカルシウム配位により EGF12 ペプチドの逆平行型 β -シートおよび β -ヘアピン構造が安定化されることが示された。特に、これらの糖鎖修飾は隣接するアミノ酸残基との相互作用 “sugar bridge” を形成することにより、立体構造を安定化するものと考えられる。さらに、linear 型 EGF12 ドメインにおける *in vitro* ジスルフィド結合形成反応によるフォールディングにおいて、糖鎖構造の違いがフォールディング効率に強く影響することも示された。しかしながら、ヒト NOTCH1 受容体の他の重要な EGF ドメイン、とりわけリガンド結合に関与するドメインで見られるいくつかの糖鎖修飾の変化が、EGF ドメインの構造や機能に与える影響については未知な部分が多い。そこで本学位論文では、リガンドとの結合ドメインを構成する EGF11 および EGF10 ドメインをターゲットとして、ヒト EGF ドメインの生合成過程で生じる様々な糖鎖構造のダイナミックな遷移状態がフォールディングや立体構造に与える影響を精査することを目的とした。

2 章では、EGF11 および EGF10 ドメインにおける様々な糖鎖構造の変化が、*in vitro* フォールディング反応の効率やそれぞれのドメインにおける立体構造に対してどう影響を与えるか確認することを目的として、様々な糖鎖構造をもつ EGF11 モジュール 4 種と EGF10 モジュール 5 種を設計し、化学合成を行った。EGF11 ドメインは Ser435 において β -O-glucose (コンセンサス配列: C3-X-N-T-X-G-S-F-X-C4)、Thr445 において β -O-GlcNAc 修飾 (C5-X-X-G-X-(T/S)-G-X-X-C6) を受け、EGF10 ドメインは Ser378 において β -O-glucose (C1-X-S-X-(P/A)-C2)、Thr405 において β -O-GlcNAc 修飾 (C5-X-X-G-X-(T/S)-G-X-X-C6) を受ける。まず、合成糖アミノ酸を用いて、microwave 照射下 Fmoc 糖ペプチド固相合成を行い、40 残基の linear 型糖ペプチド全 9 種を効率的に合成した。次に、合成した linear 型 EGF11 および EGF10 糖ペプチドアナログについて、グルタチオンを用いた *in vitro* フォールディング反応を行い、得られた生成物について HPLC を用いてフォールディング効率の評価を行った。EGF11 ドメインにおいてはすべての linear 型モジュールについてフォールディング反応は効率的に進行し、最終的には糖鎖修飾の様態に関係なく単一の主要ピークを得ることができた。また、カルシウムイオン存在下においてフォールド体の収量は劇的に向上した。一方それとは対照的に、EGF10 ドメインのフォールディングは、カルシウムイオンの有無とは無関係に複雑な混合物が生成し、その大部分はミスフォールド体であった。さらに、Ser378 における三糖 (Xyl α 1 $\rightarrow$ 3Xyl α 1 $\rightarrow$ 3Glc β 1 $\rightarrow$) の糖鎖修飾が、非修飾の場合と比較して、フォールディング効率を低下させることも示された。これらの結果から、EGF ドメインにおける *in vitro* でのフォールディング効率は、修飾される糖鎖構造やカルシウム配位により変化し、その程度はドメイン特異的に大きく異なることが示唆された。

3 章では、フォールドした EGF11 および EGF10 ドメインの構造的な特性を精査することを目的に、精製した各モジュールの NMR 立体構造解析を行った。すべての合成モジュールにおいて、EGF11・EGF10 各ドメインの中心部分で逆平行型 β -シートおよび β -ヘアピン構造をとることが示された。EGF11 ドメインにおいては、Thr445 における O-GlcNAc 修飾は EGF11 ドメインと EGF12 ドメインの間のヒンジ領域にある Ile451 と相互作用していることが示されたが、Ser435 における O-glucose 修飾においてはペプチド骨格との特徴的な相互作用は見られなかった。他方、EGF10 ドメインにおいても、Thr405 における O-GlcNAc 修飾について EGF10 ドメインと EGF11 ドメインの間のヒンジ領域にある Gln411 との相互作用が見られた。さらに、Ser378 における O-glucose 修飾においては三糖 (Xyl α 1 $\rightarrow$ 3Xyl α 1 $\rightarrow$ 3Glc β 1 $\rightarrow$) の非還元末端 Xyl 残基と β -シート上の Lys395 に相互作用が見られた。これらの結果から、2 つのシステイン C5-C6 間における O-GlcNAc 修飾についてはペプチド鎖との“sugar bridge”によって EGF ドメインの接続領域の柔軟性と剛性の調節に寄与していることが示唆され、O-glucose 修飾については、修飾部位ごとに相互作用の特異性が異なり、C3-C4 間の修飾においてはペプチド鎖との相互作用は見られなかったのに対し、C1-C2 間の修飾においては三糖構造が β -シート上のペプチド骨格と“sugar bridge”を形成することにより逆平行型 β -シートおよび β -ヘアピン構造を安定化させることが示された。これらをまとめると、EGF ドメインにおける種々の糖鎖修飾が、ドメイン内や 2 つのドメインを接続する領域に構造変化を引き起こすことにより、受容体とリガンドの相互作用の分子メカニズムに影響を与えることが示唆された。

本学位論文で、位置特異的に糖鎖修飾を受けたペプチド/タンパク質モジュールの化学合成が、タンパク質の糖鎖修飾における構造的および機能的役割の解明、ひいては治療および診断試薬に向けた分子プローブの新しいクラスの開発に有用であることが示された。