



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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 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

審査担当者	主 査	教 授	西村 紳一郎
	副 査	教 授	出村 誠
	副 査	教 授	相沢 智康
	副 査	教 授	門出 健次
	副 査	教 授	比能 洋

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)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

Notch シグナルは脊椎動物から節足動物まで多くの後生動物で進化的に保存されたシグナル伝達システムであり、細胞の運命決定プロセスを調節するほか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いる。一方、Notch 経路の機能不全はがんをはじめとする多くの疾患にも深く関連している。Notch シグナルは通常、細胞間における受容体・リガンド相互作用によって活性化されるが、受容体の細胞外ドメイン (extracellular domain; ECD) とリガンドとの相互作用をトリガーとして、受容体の細胞内ドメイン (intracellular domain; ICD) が化学量論的に放出され核に移行することにより標的遺伝子の発現を調節することがわかっている。このように、Notch シグナル伝達機構は非常にシンプルなものであるにもかかわらず、Notch シグナルがもたらす機能は多様であり、その活性を制御する分子的なメカニズムはほとんど未解明である。

学位論文の著者は、ヒト NOTCH1 受容体 ECD の動的で多様な糖鎖修飾による構造制御メカニズムに着目した。ECD は 36 の上皮成長因子 (epidermal growth factor; EGF) 様リピートより構成されており、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) を有している。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。これらの糖鎖修飾が Notch シグナルに与える影響は現在まで十分に解明されていないが、糖鎖修飾は生合成プロセスにおいて多様な構造を生じること、また糖鎖修飾部位がジスルフィド結合に関与する 2 つのシステイン残基の間に存在することなどを考慮すると、EGF 様ドメインの立体構造やジスルフィド結合の形成に基づくフォールディングは動的な糖鎖修飾によって

著しく影響を受けることが考えられる。

本論文は、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、有機化学的に調製された EGF 様モジュール糖ペプチドを用いて構造解析を行うことで、ヒト EGF 様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ものである。

まず、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 および EGF10 モジュールを設計し、効率的に化学合成を行った。合成 linear 型 EGF11 および EGF10 糖ペプチドアナログにおける、グルタチオンを用いた *in vitro* フォールディング反応の結果、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が得られたのに対し、EGF10 ドメインのフォールディングでは、多くのミスフォールド体が生成したばかりでなく、糖鎖修飾がかえってフォールディング効率を低下させることが示された。これらの結果は、EGF 様ドメインにおける *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を示しており、ECD のフォールディングの状態がリガンドとの相互作用を調節している可能性を示唆するものである。

次いで、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。その結果、EGF 様ドメイン C 端側に存在する O-GlcNAc 修飾は隣接する EGF 様ドメインとの間のヒンジ領域との相互作用が、ドメイン N 端側の O-glucose 修飾ではドメイン中央のβ-シート上との相互作用が確認された。これらのことから、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、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。本実験結果は、EGF 様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するものである。

これらの研究成果は、ヒト NOTCH1 受容体 EGF 様ドメインにおける、糖鎖修飾が立体構造のみならずフォールディングまでも制御するという新知見を得たものであり、これらの結果に基づき、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薬などの開発に大きく貢献するものとなると考えられる。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。