

大阪大学蛋白質研究所セミナー「深化する Notch シグナル研究」

日時：2025 年 3 月 16 日（日）13:00-19:30

会場：大阪大学 理学研究科 南部陽一郎ホール（大阪大学 豊中キャンパス）

<https://www.sci.osaka-u.ac.jp/ja/nambu-hall/#access>

オンライン URL：

<https://us02web.zoom.us/j/81218937674?pwd=oc5ZdM6I4bj5R5JhUptP8rQo2ojrC6.1>

ミーティング ID: 812 1893 7674, パスコード: 884354

プログラム

13:00-13:10 開会の挨拶（松野健治 大阪大学・大学院理学研究科、
高木淳一 大阪大学・蛋白質研究所）

13:10-13:40 竹内 英之（静岡県立大学院 薬学研究院）

13:40-14:10 岡島 徹也（名古屋大学大学院 医学系研究科）

14:10-14:30 塚本 庸平（名古屋大学大学院 医学系研究科）

14:30-14:50 コーヒーブレイク

14:50-15:20 北川 元生（国際医療福祉大学 医学部）

15:20-15:50 山川 智子（茨城工業高等専門学校 国際創造工学科）

15:50-16:20 深田 宗一朗（大阪大学大学院 薬学研究科）

16:20-16:40 コーヒーブレイク

16:40-17:10 伊藤 素行（千葉大学大学院 薬学研究院）

17:10-17:30 古谷 優樹（千葉大学大学院 薬学研究院）

17:30-18:00 細川 裕之（東海大学 医学部）

18:05-18:10 閉会の挨拶（竹内英之 静岡県立大学院 薬学研究院）

18:15-19:30 ミニ懇親会

世話人：松野健治（大阪大学・大学院理学研究科）

竹内英之（静岡県立大学院 薬学研究院）

高木淳一（大阪大学・蛋白質研究所）

参加者の皆様へのお願い

参加者名簿の集計のため、以下の Google フォームに入力をお願いいたします。

<https://forms.gle/KVHGTJoESTVoHEWh7>



所要時間は 1-2 分程度です。

回答期限：3 月 16 日（日）23：59 まで

回答者：参加者全員【必須】

Notch シグナルを制御する O-グルコース糖鎖修飾の 構造と機能的的重要性に関する研究

竹内英之

静岡県立大学・薬学部・生化学分野
e-mail: htakeuchi@u-shizuoka-ken.ac.jp

要旨

Notch シグナルの制御因子 Fringe が、Notch 受容体細胞外部位に連続して存在する上皮増殖因子様 (EGF) リピート上の O-フコースに N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を付加する糖転移酵素であることが報告されて以来、Notch シグナルは糖鎖生物学における重要な研究対象となっている。我々は、O-グルコース糖鎖が、O-フコース糖鎖と同様に、ショウジョウバエとマウスにおいて Notch 受容体活性化に必須であることを証明した。さらに、タンパク質 O-グルコース転移酵素 POGLUT1 の酵素活性を低下させる変異により、ヒトでは肢帯型筋ジストロフィーLGMDR21 を発症することも分かってきた。しかしながら、O-グルコース糖鎖を含め、Notch 受容体上の糖鎖修飾の付加位置、構造、それらの修飾割合などといった構造多様性は未だ明らかとされておらず、その機能的重要性や分子機能についても理解されていない。我々は、Notch 受容体における部位特異的な糖鎖修飾を明らかにするために、質量分析を用いた網羅的解析手法を開発してきた (1)。最近では比較的発現レベルの低い内因性 Notch 受容体タンパク質における糖鎖修飾を観測することも漸く可能となってきた。さらに、糖鎖の分子機能として、小胞体内腔を含む細胞内分泌経路におけるタンパク質の品質管理という観点から、O-グルコース糖鎖の付加とその後のキシロース伸長の果たす役割を明らかにしつつある。本発表では、Notch シグナルを制御する O-グルコース糖鎖の構造と機能に関する最新知見を紹介させて頂く。

References and Footnotes

(1) Tsukamoto *et al.* 2025. *bioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/2025.02.20.639268>

Aberrant Notch Proteostasis in the Absence of EGF Domain-Specific O-Glycans

岡島徹也、田嶋優子

名古屋大・医学系・iGCORE

e-mail: tokajima@med.nagoya-u.ac.jp

要旨

Notch 受容体の細胞外領域の大部分を占める EGF ドメインには、特徴的な O 型糖鎖が存在し、受容体機能の制御やタンパク質の細胞膜発現に重要な働きをする。O 型糖鎖修飾として、O-フコース、O-グルコース、O-GlcNAc の 3 種類が存在し、受容体の機能を複雑に制御すると考えられている。一方、これらの糖修飾は小胞体内腔で生じることから、Notch 受容体のプロテオスタシスへの関与が示唆されるが、詳細な分子機構は不明である。本研究では、3 種類の O 型糖修飾に関わる糖転移酵素 POFUT1、POGLUT1、EOGT の 3 重変異細胞を作成し、Notch 受容体のプロテオスタシスにおける役割を探索した。予想通り、3 重変異細胞では、Notch 受容体の細胞表面発現は消失し、3 種類の糖転移酵素を順次、再導入することで、ステップワイズに細胞膜発現が回復した。細胞染色の結果、NOTCH 受容体は小胞体に高度に蓄積し、プロセッシング異常を認めた。蓄積したタンパク質は還元剤存在下では減少したが、プロテアソーム分解経路を阻害すると減少が抑えられた。一方で、質量分析により、残存する O 型糖鎖を解析した結果、主要な O 型糖鎖の欠損では、EGF ドメインの明確な構造異常は裏付けされなかった。これらの結果より、3 重変異細胞における O 型糖鎖不全により、小胞体からの細胞膜輸送経路とタンパク質分解経路の双方が抑制された状態で、Notch 受容体が小胞体に蓄積していることが示唆された。3 重変異体における Notch 受容体の相互作用分子として、Bip や PDI ファミリーの分子を同定しており、これらの分子の Notch 受容体プロテオスタシスへの関与について研究を進めている。

EGF 特異的な二種類の O-グルコース糖鎖伸長は リガンド結合を介して NOTCH1 シグナルを制御する

塚本 庸平

名古屋大学大学院医学系研究科 分子細胞化学/機能分子制御学
e-mail: Tsukamoto.yohei.s1@f.mail.nagoya-u.ac.jp

要旨

Notch シグナルは多細胞生物の発生と恒常性維持に重要な役割を果たしている。Notch シグナル伝達の異常は、様々なヒトの病態を引き起こす。これまでの遺伝学的・生化学的研究により、Notch 受容体上の O-結合型糖鎖修飾が Notch シグナル伝達に重要であることが明らかにされてきた。我々はこれまでに HEK293T 細胞に過剰発現させた、マウス NOTCH の細胞外ドメインに存在する O-結合型糖鎖の解析を行ってきた。その解析結果から、リガンド結合領域の EGF である NOTCH1 EGF10 と NOTCH3 EGF9 の O-グルコース付加部位特異的に結合した、Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc の構造を持つ O-グルコース糖鎖を発見した。この単糖組成を持つ構造はこれまでに糖タンパク質上に報告されていない。この新奇糖鎖修飾は内因性 NOTCH1 の EGF10 上においても付加することが確認された。さらに、この新奇糖鎖は、糖鎖付加部位と立体構造上近接し、O-グルコース糖鎖伸長に重要なアミノ酸を変異させることにより消失することから、EGF のアミノ酸配列により、従来型の糖鎖も含めて、その生合成が制御されている可能性が高い。この糖鎖の機能を解析した結果、興味深いことに、リガンド結合を抑制することにより Notch シグナルを制御していることが明らかになった。このガラクトース伸長型の新奇糖鎖は、キシロース伸長を受けた従来型の O-グルコース糖鎖と同一箇所が存在することで、これまでの想定を超える、より細かい Notch シグナルの制御を行っている可能性がある。

References and Footnotes

(1) Tsukamoto *et al.* 2025. *bioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/2025.02.20.639268>

TM2D 群 (TM2D1、TM2D2、TM2D3) の Notch シグナル における機能

北川元生

国際医療福祉大学医学部生化学

e-mail: kitagawa@iuhw.ac.jp

要旨

我々は TM2D3 (Transmembrane 2 domain containing 3) が Notch の細胞表面での発現を正に制御することを見いだした(1)。*Tm2d3* ノックアウト (KO) マウスは胎生 14.5 日以降胎仔本体に浮腫と皮下出血を示して出生以前に死亡する。このマウスの大動脈は Notch2 と Notch3 を介するシグナルを必要とする中膜平滑筋層の低形成を示す。さらに野生型・KO の造血幹細胞を含む胎仔肝細胞を致死量放射線照射した野生型マウスにそれぞれ移植して 2-4 か月後検索したところ、赤血球系、骨髄球系、巨核球系、さらに Notch1 を介するシグナルを必要とする胸腺 T リンパ球の再構築には大きな差は見られなかったが、Notch2 を介するシグナルが発生に必須である脾臓辺縁帯 B 細胞数が KO 細胞を移植したマウスでは野生型細胞を移植したマウスの約半分だった。またこの時脾臓辺縁帯 B 細胞および胸腺 T リンパ球表面の Notch1 および Notch2 の発現には変化はみられなかった。以上 *Tm2d3* KO マウスは、Notch シグナルを部分的に欠失していると考えられた。

この KO マウスで Notch シグナルが残存する理由として、*Tm2d3* と構造上類似するタンパク質をコードする遺伝子が他に 2 つ (*Tm2d1*、*Tm2d2*) 存在するため、これらが redundant な役割を果たしている可能性が考えられる。ショウジョウバエもまた *TM2D3* (*almondex*) だけでなく *TM2D1* と *TM2D2* それぞれの相同体を有しているが、これら 3 遺伝子それぞれの KO ショウジョウバエはいずれも Notch シグナルの部分的欠失体に特徴的な表現型を示すことが報告されている。さらにこれらの交配等による遺伝学的解析の結果、3 遺伝子がそれぞれユニークな役割を果たしながら、単一の経路で機能していることが示唆されている (Salazar et al. PLOS Genetics 2021)。そこで我々は *Tm2d1* と *Tm2d2* それぞれの KO マウスについて検討したところ、いずれも胎生 14.5 から 15.5 日に *Tm2d3* KO マウスと類似した卵黄囊血管の低形成、胎仔本体の浮腫と皮下出血を示した。

References and Footnotes

- (1) Masuda W., Yamakawa T., Ajima R., Miyake K., Umemiya T., Azuma K., Tamaru J.-i., Kiso M., Das P., Saga Y., Matsuno K., Kitagawa M. TM2D3, a mammalian homologue of *Drosophila* neurogenic gene product Almondex, regulates surface presentation of Notch receptors. Sci. Rep. 2023;13:20913.

pecanex 突然変異マクロファージから分泌される因子は Notch シグナルを遠隔抑制する

山川 智子

茨城工業高等専門学校

e-mail: tyamakawa@ibaraki-ct.ac.jp

要旨

マクロファージは、昆虫の免疫システムで中心的な役割を果たすとともに、細胞外マトリクスをはじめとした様々な分泌を介して形態形成にも重要である。近年、私たちのグループでは、ある遺伝子の突然変異により、マクロファージが新たに Notch シグナル抑制因子を分泌できる能力を獲得することを発見した。Notch シグナル伝達は、細胞間の直接的な接触を介して、様々な細胞の運命決定を制御している。Notch シグナル伝達経路は進化的に広く保存されており、その異常はヒトにおいて重篤な疾患を引き起こすことが知られている。私たちのグループでは、Notch シグナルに重要であるものの、その分子機能が不明であったショウジョウバエ *pecanex* (*pcx*) 遺伝子に着目している。私たちは、*pcx* 突然変異体胚 (*pcx* 胚) では Notch シグナル伝達が不全となると同時に、*pcx* 胚のマクロファージで小胞体が肥大することを発見した¹⁾。そこで、野生型胚と *pcx* 胚から遺伝学的手法によってマクロファージを除去すると、マクロファージを除去した野生型胚は正常な神経系を示したものの、*pcx* 胚では失われた Notch シグナルが回復した。さらに、*pcx* 胚のマクロファージを野生型胚へ移植したところ、予定神経上皮域における Notch シグナルの不全を誘発することができた。これらの結果は、*pcx* 突然変異マクロファージから分泌される因子が離れた組織の Notch シグナルを遠隔抑制するという新しい制御メカニズムを示唆している。本発表では、この新しい細胞シグナル制御について議論したい。

References and Footnotes

(1) Tomoko Yamakawa, et al., Deficient Notch signaling associated with neurogenic *pecanex* is compensated for by the unfolded protein response in *Drosophila*., *Development*, 139, 558-567, 2012.

筋生物学と Notch シグナル

深田 宗一郎

大阪大学大学院 薬学研究科 再生適応学分野

e-mail: fukada@phs.osaka-u.ac.jp

骨格筋を構成する主たる細胞は、筋線維と呼ばれる我々の体の中で最も巨大な多核細胞である。骨格筋はその高い再生能力が知られているが、筋線維は最終分化した細胞であるため、哺乳類を始めとしたほとんどの脊椎動物では再び細胞周期に入ることはない。代わりに、筋サテライト細胞と呼ばれる骨格筋固有の幹細胞が存在し、増殖・分化・融合することで損傷した筋線維を成体組織においても再構築（再生）することができる。

骨格筋は、内的・外的要因に対して適応する能力も併せ持っている。適応の1つが筋肥大であり、これはレジスタンストレーニング（筋トレ）をすることで骨格筋が大きくなる現象として一般の方にも周知されている。筋肥大時にも筋サテライト細胞は増殖することは知られていたが、その増殖誘導は再生過程と同じように筋損傷が必要と考えられていた為、肥大時における筋サテライト細胞の動態を再生過程と区別して詳しく検討されてこなかった。

我々は、肥大時における筋サテライト細胞の増殖には、筋損傷は必須ではなく、骨格筋にかかる物理的な負荷の増大が関わっていることを報告してきた (1, 2)。また、物理的負荷依存的な筋サテライト細胞の増殖機構と、再生時の増殖機構とは Notch シグナルの要求性が異なることも示した (3, 4)。本研究会では、骨格筋分野における Notch シグナルが働く生理現象に関する最近の知見を紹介するとともに、未解明の Notch シグナルの課題について議論させて頂きたい。

References and Footnotes

- (1) Kaneshige A, et al., *Cell Stem Cell*. 2022 Feb 3;29(2):265-280.e6
- (2) Zhang L, et al., *Cell Rep*. 2024 Apr 23;43(4):114052.
- (3) Fukuda S, et al. *Elife*. 2019 Sep 23;8:e48284.
- (4) Iwamori K, et al. *Skelet Muscle*. 2024 Oct 24;14(1):25.

CADASIL 型 NOTCH3 変異体の JAG1 依存性分解機構 における Radical fringe の抑制的役割

鈴木翔大¹、益子大樹¹、塚本庸平²、大谷美優¹、古谷優樹¹、大川原沙樹¹、松本岳海¹、水江優貴¹、竹内英之³、岡島徹也²、伊藤 素行¹

¹ 千葉大学大学院薬学研究院, ² 名古屋大学大学院医学系研究科,

³ 静岡県立大学大学院薬学研究院

e-mail: mito@chiba-u.jp

遺伝性脳小血管病である大脳皮質下梗塞および白質脳症を特徴とする常染色体優性動脈症 (CADASIL) は、NOTCH3 変異タンパク質の加齢に伴う蓄積によって特徴付けられる。NOTCH3 は、隣接する細胞で発現する JAG1 や DLL4 などの Notch リガンドによるトランスエンドサイトーシスを介して分解されるが、変異タンパク質の蓄積を促進する特異的な細胞環境については未だ不明である。我々は、NOTCH3 と Radical fringe (RFNG) がマウスペリサイトおよび老化ヒトペリサイト細胞で高発現することを明らかにした。そこで、CADASIL 変異体である NOTCH3 C185R タンパク質への RFNG の影響を検討した。LC-MS/MS 分析により、RFNG による NOTCH3 野生型(WT)と C185R への糖鎖修飾が異なることが明らかになった。リガンドまたは Notch3 を発現する細胞の共培養実験により、RFNG は NOTCH3 C185R の JAG1 依存性分解を NOTCH3 WT と比較して有意に阻害することが示された。一方、DLL4 は RFNG の発現に関係なく、NOTCH3 WT および C185R タンパク質を同程度に分解した。これらの結果から、RFNG による糖鎖修飾と JAG1 との相互作用が NOTCH3 変異体の蓄積メカニズムに関与している可能性が示唆された。この発見は加齢により進行する NOTCH3 変異体の蓄積現象の生体条件の理解に役立つと考えられる。

References and Footnotes

- (1) Suzuki S, Mashiko T, Tsukamoto Y, Oya M, Kotani Y, Okawara S, Matsumoto T, Mizue Y, Takeuchi H, Okajima T, Itoh M. *J Biol Chem*. 2024, 300, 107787
- (2) Suzuki S, Itoh M. *Front Mol Biosci*. 2025, 12, 1550815.
- (3) Suzuki S, Hiura S, Mashiko T, Matsumoto T, Itoh M. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021, 557, 302-308.

Fringe による Notch3 シグナル制御のメカニズム解析

古谷優樹・鈴木翔大・伊藤素行

千葉大学大学院・薬学研究院

e-mail: ykotani8201@gmail.com

Fringe は Notch 受容体に N-アセチルグルコサミンを付加することで、Notch シグナルを制御する。先行研究により、Fringe が Notch1 および Notch2 シグナルに及ぼす影響が明らかにされている。例えば、Fringe のホモログである Lunatic Fringe (Lfng) は、Notch リガンドである Jagged1 (Jag1) を介した Notch1 シグナル (Jag1-Notch1 シグナル) を抑制する一方で、Radical Fringe (Rfng) は同シグナルを増強することが報告されている (1)。しかし、Fringe が Notch3 シグナルに及ぼす影響やその制御機構については、十分に解明されていない。

本研究では、Fringe が Notch3 シグナルをどのように制御するかを明らかにし、その分子メカニズムを解析することを目的とした。まず、Jag1-Notch1 シグナルとは異なり、Jag1-Notch3 シグナルは Lfng および Rfng のいずれによっても抑制されることが明らかとなった。次に、Rfng による Jag1-Notch3 シグナルの抑制機構を詳細に解析した。Jag1 と Notch の結合後、Jag1 のエンドサイトーシスにより Notch 細胞外ドメイン(N-ECD)に張力が加わることで、Notch シグナルの活性化に重要であることが知られている。Jag1 による N3-ECD のエンドサイトーシスを解析した結果、Rfng によりエンドサイトーシス量が低下することが分かった。さらに、Jag1 固相化ビーズにより Notch シグナルを張力のみで活性化した系でも、Rfng によるシグナル抑制が観察された。これらの結果から、Rfng による Notch3 の糖鎖修飾は、エンドサイトーシスそのものではなく、張力を介したシグナル活性の調節に関与する可能性が示唆された。

References and Footnotes

- (1) Kakuda S, LoPilato RK, Ito A, Haltiwanger RS. Canonical Notch ligands and Fringes have distinct effects on NOTCH1 and NOTCH2. *J Biol Chem.* 2020 Oct 23

T 細胞分化プログラムを始動する Notch シグナルの解明

細川 裕之

東海大学 医学部 基礎医学系 生体防御学

e-mail: hosokawa.hiroyuki.g@tokai.ac.jp

Notch signaling is essential for initiating T cell development in the thymus from lymphoid progenitors (LPs) (1). However, the molecular mechanisms underlying Notch-mediated triggering of the T-lineage program remain obscure. We found that while the earliest functional target gene of Notch signaling, *Tcf7*, is disrupted in Cas9-expressing LP cell lines (2, 3), they still retain a weak potential to differentiate into T cells. In addition, the introduction of *Tcf7* into LPs generated CD25^{int} proT-like cells but failed to activate many T-signature genes. Thus, other Notch target genes are required to initiate optimal T cell differentiation. To identify *Tcf7*-independent Notch target genes, we performed transcriptome analysis of *Tcf7*-deficient and *Tcf7*-introduced LPs and identified *Hes1* and *Etv6* as functional *Tcf7*-independent Notch targets. ChIP-seq analysis clearly showed that *Hes1* and *Etv6* are direct targets of Notch-IC as well as *Tcf7*. Introduction of *Tcf7/Hes1/Etv6* into LPs generated CD25^{high} proT-like cells more efficiently than *Tcf7* alone. Moreover, T cell differentiation was completely disrupted in *Tcf7/Hes1/Etv6* triple-deficient LPs. Our results indicate that *Tcf7*, *Hes1*, and *Etv6* are essential direct Notch target genes that initiate the earliest stages of T cell development.

References and Footnotes

- (1) **Hosokawa H** and Rothenberg EV.: How transcription factors drive choice of T cell fate. *Nat Rev Immunol.* 21(3): 162-176 (2021).
- (2) Hirano K*, **Hosokawa H***, Koizumi M, Endo Y, Yahata T, Ando K and Hozumi K.: LMO2 is essential to maintain the ability of progenitors to differentiate into T-cell lineage in mice. *eLife* 10: e68227 (2021) *Co-first authors
- (3) Koizumi M, Kama Y, Hirano K, Endo Y, Tanaka T, Hozumi K and **Hosokawa H**.: Transcription factor *Zbtb1* interacts with bridging factor *Lmo2* and maintains the T-lineage differentiation capacity of lymphoid progenitor cells. *J Biol Chem.*298(11): 102506 (2022)