

新規癌治療薬の開発に向けた Notch 糖鎖修飾を標的とする低分子化合物の探索

名古屋大学大学院

医学系研究科 准教授 竹内英之

名古屋大学大学院

医学系研究科 教授 岡島徹也

ジョージア大学

複合糖質研究センター 教授

Robert S. Haltiwanger

1. 研究の背景・目的

Notch シグナル伝達経路は、進化的に非常によく保存された、多細胞生物個体における細胞の運命決定に重要な役割を果たす細胞間情報伝達経路である (1)。Notch シグナルの破綻は、癌の発生、悪性度の進展、転移に関わっている (2)。多くの種類の癌で Notch シグナルの異常な亢進が観察される一方、急性骨髄性白血病や扁平上皮癌など、ある種の癌では、Notch シグナルの低下が発癌と悪性度の進展に関与している。研究代表者らは、糖鎖科学分野のフロントランナーとして、Notch の細胞外部位における糖鎖修飾が、その活性化に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた (3)。O-グルコース糖鎖の付加は、Notch の活性化に必須である一方、O-グルコース糖鎖のキシロースによる伸長は、Notch の活性化を抑制する (4-6)。肺、食道、および頭頸部由来扁平上皮癌を含む、多くの癌で *XXYL1* の増幅がみられる (7)。本研究では、O-グルコース糖鎖合成を担う糖転移酵素に照準を定め、Notch に O-グルコース単糖を付加する POGLUT1 の構造情報に基づいて低分子阻害薬を創生することを目的とした。

2. 研究の対象ならびに方法

(1) 糖転移酵素タンパク質の発現と精製

糖転移酵素 POGLUT1 タンパク質を発現、精製するために、C 末端に MycHis タグを付加した形で、ヒト POGLUT1 遺伝子 cDNA の ORF 全長を発現ベクター pcDNA4 に組み込んだ。この発現ベクターを HEK293T 細胞に遺伝子導入し、培養上清に分泌された POGLUT1-

MycHis タンパク質を Ni-NTA アガロースカラムを用いて精製し、精製タンパク質は抗 Myc タグ抗体を用いて分子量を確認し、精製純度と濃度は、BSA をスタンダードとしたクマシール染色により分析した。

(2) 受容基質 EGF ドメインタンパク質の発現と精製

糖転移酵素の受容基質としては、平行して行っていた Notch1 上の O-グルコース糖鎖の質量分析解析結果に基づいて、ヒト凝固因子 IX (hFA9) の EGF ドメイン、また、マウス Notch1 の EGF4、EGF10、EGF11、EGF28 を作製することとした。各 EGF ドメインをコードする cDNA を PCR 法により増幅し、大腸菌用発現ベクター pET20b(+) に、C 末端に His タグを付加した形でクローニングした。EGF ドメインタンパク質の発現は、IPTG を用いて誘導し、大腸菌の可溶性画分から Ni-NTA アガロースカラムを用いて精製した。さらに、正しくフォールディングされた EGF ドメインタンパク質を逆相 HPLC を用いて精製した。精製した EGF ドメインタンパク質は、凍結乾燥後、BSA をスタンダードとした BCA プロテインアッセイ法により定量した。

(3) *In vitro* における糖転移酵素活性阻害化合物の一次スクリーニング

既に確立している *in vitro* 酵素阻害活性測定法を用いてスクリーニングを行った (8)。

具体的には、POGLUT1、UDP-Glc アッセイ試薬 (プロメガ) を用いた。これは、従来の放射性供与基質を用いたアッセイに比べて、環境に優しく、かつ、安全に行えるという利点がある。候補化合物は、水溶性のものは水に溶解し、そうでないものは、DMSO に溶解し、最終濃度 50 μ M で反応を行い、阻害の程度を評価した。

3. 研究結果

(1) 糖転移酵素タンパク質の発現と精製

POGLUT1-MycHis タンパク質は、HEK293T 細胞に強制発現後、培養上清より Ni-NTA アガロースカラムより精製された (data not shown)。

(2) 受容基質 EGF ドメインタンパク質の発現と精製

従来用いていた hFA9 EGF ドメインタンパク質

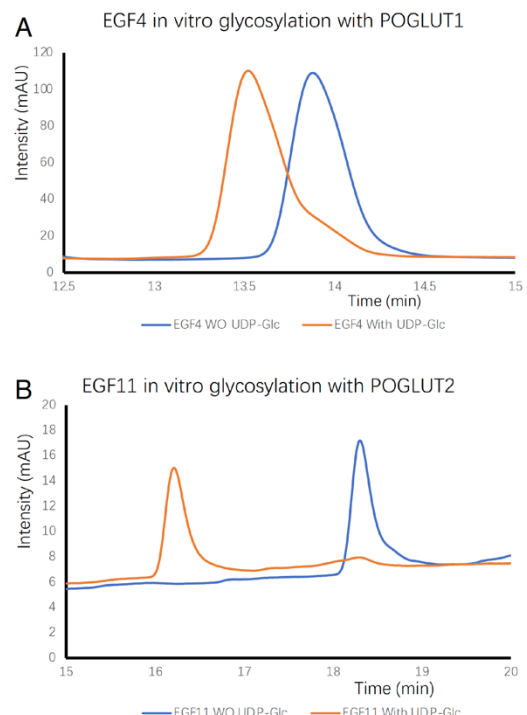


図 1. 一次スクリーニングのための受容基質の作製供与基質 UDP-Glc 存在 (オレンジ色)、あるいは、非存在下 (青色) にて、精製したマウス Notch1 EGF4 と POGLUT1 (A)、並びに、EGF11 と POGLUT2 (B) を 37 度で一晩反応させ、反応産物を逆相 HPLC にて解析した。保持時間が短縮され、基質への Glc の付加が確認された。

に加えて、本研究では、POGLUT1 に対する親和性が高いことが予想されたマウス Notch1 の EGF4 と EGF10、ならびに、親和性が低いことが予想された EGF11 と EGF28 の作製を試みた。EGF4 と EGF11 については、精製産物を POGLUT1-MycHis タンパク質および UDP-glucose とを 37°C にて一晩反応させた後、逆相 HPLC にて反応産物を分析した結果、ほぼ 100% ピークがシフトしたことから、正しくフォールディングされていることが示唆された (図 1)。一方、Notch1 の EGF10 と EGF28 については、大腸菌の可溶性画分にタンパク質として検出されなかった。さらに、不溶性画分をグアニジン塩酸で可溶化し、逆相 HPLC にて分画後、検出されたピークに含まれている物質の分子量を MALDI-TOF MS により解析したが、予想される EGF10 と EGF28 タンパク質の分子量とは一致しなかった (data not shown)。

(3) *In vitro* における糖転移酵素活性阻害化合物の一次スクリーニング

POGLUT1/Rumi と hFA9 の EGF ドメインとの複合体の結晶構造解析 (9) 構造情報をもとにした FINDSITE^{comb} による低分子化合物の *in silico* スクリーニングより選抜された候補化合物 50 μ M 存在下で行った POGLUT1-MycHis タンパク質のグルコース転移酵素活性の測定結果を図 2 に示した (9-11)。コントロールとしては、DMSO を用いた。調べた化合物は、いずれも有意に POGLUT1 の酵素活性を阻害しなかった。

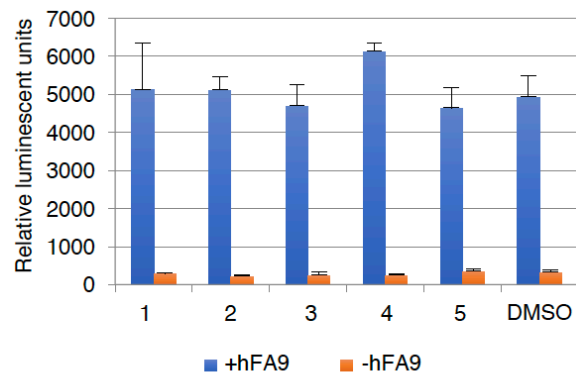


図 2. POGLUT1/Rumi 阻害化合物の一次スクリーニング化合物 (50 μ M) 存在下で、POGLUT1/Rumi のグルコース転移酵素活性を UDP-Glo アッセイキット (プロメガ) により定量した。受容基質 human factor IX EGF (hFA9) あり (青色)、hFA9 なし (オレンジ色)。

4. 考察

本研究では、POGLUT1 糖転移酵素の構造情報を基に、酵素に結合する可能性のある低分子化合物を検索し、それらが実際に生化学的に POGLUT1 を阻害するか調べたが、有効な低分子化合物の同定には至らなかった。今後、スクリーニング系は確立することができたので、さらに化合物の数を増やして、スクリーニングを行い、新規 Notch シグナル阻害薬の開発につなげたい。また、同様のシステムを用いて、キシロース転移酵素の阻害薬の探索を行い、Notch シグナルの活性化薬の開発も目指したい。

5. 文献

1. Bray, S. J. (2016) Notch signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 722-735
2. Ntziachristos, P., Lim, J. S., Sage, J., and Aifantis, I. (2014) From fly wings to targeted cancer therapies: a centennial for notch signaling. *Cancer Cell* **25**, 318-334
3. Takeuchi, H., and Haltiwanger, R. S. (2014) Significance of glycosylation in Notch signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **453**, 235-242
4. Acar, M., Jafar-Nejad, H., Takeuchi, H., Rajan, A., Ibrani, D., Rana, N. A., Pan, H., Haltiwanger, R. S., and Bellen, H. J. (2008) Rumi is a CAP10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling. *Cell* **132**, 247-258
5. Lee, T. V., Sethi, M. K., Leonardi, J., Rana, N. A., Buettner, F. F., Haltiwanger, R. S., Bakker, H., and Jafar-Nejad, H. (2013) Negative regulation of notch signaling by xylose. *PLoS Genet* **9**, e1003547
6. Lee, T. V., Pandey, A., and Jafar-Nejad, H. (2017) Xylosylation of the Notch receptor preserves the balance between its activation by trans-Delta and inhibition by cis-ligands in *Drosophila*. *PLoS Genet* **13**, e1006723
7. Yu, H., Takeuchi, M., LeBarron, J., Kantharia, J., London, E., Bakker, H., Haltiwanger, R. S., Li, H., and Takeuchi, H. (2015) Notch-modifying xylosyltransferase structures support an SNI-like retaining mechanism. *Nat Chem Biol* **11**, 847-854
8. Sheikh, M. O., Halmo, S. M., Patel, S., Middleton, D., Takeuchi, H., Schafer, C. M., West, C. M., Haltiwanger, R. S., Avci, F. Y., Moremen, K. W., and Wells, L. (2017) Rapid screening of sugar-nucleotide donor specificities of putative glycosyltransferases. *Glycobiology* **27**, 206-212
9. Yu, H., Takeuchi, H., Takeuchi, M., Liu, Q., Kantharia, J., Haltiwanger, R. S., and Li, H. (2016) Structural analysis of Notch-regulating Rumi reveals basis for pathogenic mutations. *Nat Chem Biol* **12**, 735-740
10. Zhou, H., and Skolnick, J. (2013) FINDSITE(comb): a threading/structure-based, proteomic-scale virtual ligand screening approach. *J Chem Inf Model* **53**, 230-240
11. Zhou, H., Gao, M., and Skolnick, J. (2015) Comprehensive prediction of drug-protein interactions and side effects for the human proteome. *Sci Rep* **5**, 11090