

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790270

研究課題名(和文) 上皮成長因子様ドメインに特徴的な新規翻訳後修飾の同定と修飾機構の解析

研究課題名(英文) Identification of a novel post-translational modification of epidermal growth factor domains and mechanistic analysis of the modification

研究代表者

岡島 徹也 (OKAJIMA TETSUYA)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20420383

研究成果の概要(和文)：上皮増殖因子(EGF)ドメインはユニークなO-結合型糖鎖による翻訳後修飾を受ける。EGFドメイン上のO-型糖鎖として知られるO-フコースやO-グルコースは、多くの血漿糖タンパク質やシグナリング分子に見出されており、とりわけNotchシグナリング経路における生物学的機能がこれまでに示されてきた。本研究課題において、EGFドメインにおける新規の糖鎖修飾としてO-GlcNAcを発見した。また、この修飾が、ショウジョウバエNotch受容体のEGFドメインにおける5番目と6番目のシステイン残基の間にある、保存されたSer/Thr残基に起こることを見出した。さらに、細胞外のO-GlcNAc修飾に関わる責任遺伝子Eogtを単離した。今後、Eogtの遺伝子機能を探ることで、細胞外領域におけるO-GlcNAc修飾の生物学的役割が明らかになることが期待された。

研究成果の概要(英文)：Epidermal growth factor (EGF) domains are posttranslationally modified with unique O-linked glycans. The classical types of O-glycans on EGF domains are O-fucose and O-glucose glycans, found on many plasma glycoproteins and signaling molecules, whose biological functions have been demonstrated especially in the context of the Notch signaling pathway. In this study, we have discovered O-GlcNAc modification as a new modification of the EGF domain that occurs on the conserved Ser/Thr residue located between the fifth and sixth cysteine residues within the EGF domains of Notch receptors in *Drosophila*. Moreover, we have succeeded in the isolation of a new gene, Eogt, responsible for the extracellular O-GlcNAcylation. Characterization of physiological function of Eogt will reveal the new biological roles for O-GlcNAcylation in the extracellular environment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：糖鎖生物学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：Notch受容体、糖鎖修飾、O-結合型糖鎖、O-GlcNAc

1. 研究開始当初の背景

蛋白質は翻訳後修飾により、遺伝情報を越えた新たな機能を獲得し、多彩な細胞機能を

発揮することができるようになる。翻訳後修飾の中心的なものの1つに糖鎖修飾があり、全タンパク質の半数以上が何らかの糖鎖付加を受け、その多くはタンパク質機能に必須な役割を果たしていることが知られている。糖鎖を介したタンパク質機能の制御の代表例として、近年、生体内でごく微量しか存在しないO-結合型糖鎖が注目を集めている。こういった新型糖鎖の多くはタンパク質ドメインに特異的な修飾であり、特定のタンパク質機能を調節しているものと考えられている。申請者はこれまで、EGFドメイン特異的O-結合型糖鎖であるO-フコース型糖鎖の生化学的・遺伝学的解析を行い、Notch受容体の機能を直接的に制御することを明らかにした (Okajima *T et al. Science* 2005; Okajima *T et al. BMC biology* 2008)。また、EGFドメイン特異的な糖鎖修飾として、その他にも、O-グルコース型糖鎖構造も知られており、米国 HaltiwangerらのグループによりO-フコース型糖鎖と同様にNotch受容体などのシグナル伝達分子の

機能制御に直接的に関与するものと考えられていた

(Okajima *T et al. J. Biochem.* 2008)。

申請者は、これまでにNotch受容体の20番目のEGFドメイン

(EGF20)の

MALDI-TOF-MSの解析を行った際、偶然にも、O-グルコースやO-フコース型のO-結合型糖鎖とは異なる、これまでに報告されていない質量203の翻訳後修飾の存在を見出した。この新規修飾構造は、beta-ヘキソサミニダーゼによって消化を受けること (図1)、さらに、非還元末端のGlcNAc特異的にガラクトースを付加するbeta1,4ガラクトース転移酵素により修飾を受けること (図2) よりO-beta-GlcNAc修飾であることが示唆された。従来、O-beta-GlcNAc修飾は細胞内の糖鎖修

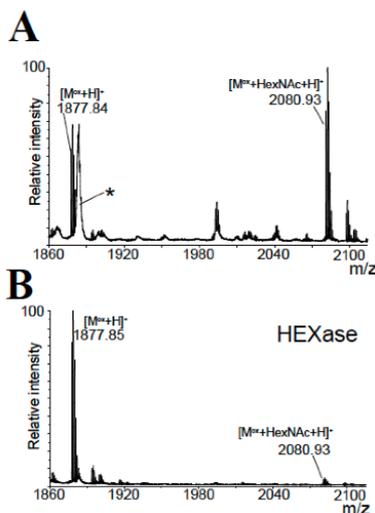


図1 EGF20のβ-ヘキソサミニダーゼ処理コントロール(A)に比べて質量203の減少が見られる(B)。

飾として知られており、もし、細胞外にも生理的条件下

で存在するとすれば、初めての報告例となり、非常に特殊な糖鎖修飾であることが考えられた。

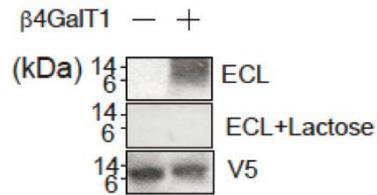


図2 EGF20へのβ1,4ガラクトース転移酵素によるガラクトース付加をレクチンプロット(ECL)により検出した。また、ラクトースの添加により、特異性を確認した。

2. 研究の目的

(1)内在性Notch受容体における

O-beta-GlcNAc修飾の検出

今回解析を行なった新規修飾構造は、beta-ヘキソサミニダーゼによって消化を受けること、さらに、非還元末端のGlcNAc特異的にガラクトースを付加するbeta1,4ガラクトース転移酵素により修飾を受けることより

O-beta-GlcNAc修飾であることが示唆された。

そこで、EGFフラグメント上に同定されたO-beta-GlcNAc修飾が、生理的な条件下でもNotch受容体の細胞外ドメインに存在することを検証した。また、Notch受容体以外のタンパク質も細胞外領域にO-GlcNAc修飾を受けるか否かを、DeltaやSerrateといったNotch受容体のリガンドを用いて検討した。

(2)細胞外領域へのO-GlcNAc修飾のメカニズムの解明

O-beta-GlcNAc修飾は、細胞内ではOGTと呼ばれる糖転移酵素により触媒される。また、EGFドメインを特異的に修飾する糖転移酵素がFringeを含め複数知られている。これらの既知の糖転移酵素が細胞外のO-beta-GlcNAc修飾に関与する可能性について検討した。

(3)細胞外O-beta-GlcNAc修飾に関わる新規糖転移酵素遺伝子の同定

上記の研究で、既知の糖転移酵素が細胞外O-beta-GlcNAc修飾に関与しないことが明らかになったため、新規糖転移酵素遺伝子の特定と酵素活性の検出を行なった。

3. 研究の方法

(1)内在性Notch受容体上のO-GlcNAc構造の検出

O-GlcNAc修飾が組換えタンパク質のみならず、内在性のNotch受容体の細胞外ドメインにも実際に存在していることを確認するため

に、ショウジョウバエ由来Kc細胞からNotch受容体を免疫沈降させ、O-GlcNAc抗体(CTD110.6抗体やRL2抗体)によるWestern blotting解析を行なった。Notch受容体の細胞内領域にもO-GlcNAc修飾が生じうることを考慮に入れて、トリプシン消化により、O-GlcNAc修飾が消失することも合わせて確認することにした。また、EDTA処理により、Notch受容体の細胞外ドメインがsheddingを受けるを利用して、細胞外領域のみを精製し、O-GlcNAc修飾の存在を確かめることを検討した。

(2)Notch受容体の以外のEGFドメインにおけるO-GlcNAc修飾

O-GlcNAc修飾がNotch受容体のみならず、他のEGFドメインを有するタンパク質にも存在するか否かを明らかにするために、DeltaやSerrateの細胞外ドメイン融合タンパク質をS2細胞に発現させ、精製後、O-GlcNAc抗体によるWestern blotting解析を行なった。

(3)O-GlcNAc修飾部位の決定

Notch受容体のEGF20フラグメントを用いて、MALDI-TOF-MS/MS解析を行ない、O-GlcNAc修飾を持ったフラグメントイオンを観察することにより、O-GlcNAc付加部位の決定を試みた。また、独立したアプローチとして、予想修飾部位のセリン/スレオニン残基のアラニンへの置換を行なった変異体を作製し、O-GlcNAc修飾の消失することを確認することを試みた。

(4)細胞外O-GlcNAc型糖鎖の生合成機構

細胞内に存在するO-GlcNAc修飾は、OGTと呼ばれる酵素により、細胞質や核において、修飾が起きることが知られている。そこで、EGFドメインにおけるO-GlcNAc修飾がOGT依存性か否かを検討するために、S2細胞においてOGTのRNAiを行なった際のEGFドメインのO-GlcNAcレベルの変化を調べた。また、EGFドメイン特異的に作用する糖転移酵素として、OFUT1、Rumi、Fringeが知られている。これらの既知の糖転移酵素による修飾機構が関与するか否かを検討するために、上記遺伝子のRNAiを行ない、同様に、O-GlcNAcレベルの変化を調べた。RNAiの効果の確認は、リアルタイムPCRを用いて評価した。

(5)EGFドメインに作用するO-GlcNAc転移酵素の同定と酵素活性の確認

上記実験により、細胞外O-GlcNAc修飾が既知の糖修飾機構に依存しない新たなメカニズ

ムによると考えられた。そこで、EGFドメインに作用する新規O-GlcNAc転移酵素の同定を試みた。これまでに、EGFドメインに対するO-GlcNAc転移活性は膜画分に存在し、Mn²⁺依存性であるという予備データを得た(図3)。よって、ゴルジ体などに局在する一般的な糖転移酵素が細胞外領域のO-GlcNAc修飾に関与することが考えられた。以上を踏まえ、機能が不明の糖転移酵素遺伝子を中心に、RNAiスクリーニングを行ない、O-GlcNAc転移酵素の同定を試みた。

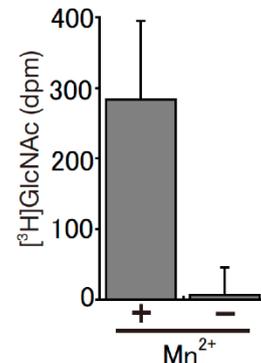


図3 S2細胞から調製した膜画分のEGF20への酵素活性とMn²⁺依存性

4. 研究成果

(1)内在性Notch受容体上のO-GlcNAc構造の検出

Kc細胞からNotch受容体を免疫沈降させ、O-GlcNAc抗体によるWestern blotting解析を行なった結果、Notch受容体のO-GlcNAc修飾が検出された。また、トリプシン消化により、O-GlcNAc修飾が消失することから、細胞内領域ではなく細胞外領域にO-GlcNAc修飾が生じることが確認できた。また、EDTA処理により、細胞外領域のみを単離し、細胞外領域のO-GlcNAc修飾の存在を直接確かめることに成功した。

(2)Notch受容体の以外のEGFドメインにおけるO-GlcNAc修飾

DeltaとSerrateの細胞外ドメイン融合タンパク質(DI:AP/Ser:Ap)を、O-GlcNAc抗体によるWestern blotting解析を行ない、O-GlcNAc修飾がNotch受容体のみならず、他のEGFドメインを有するタンパク質にも存在することが明らかになった。

(3)O-GlcNAc修飾部位の決定

EGF20のMALDI-TOF-MS/MS解析により、O-GlcNAc付加部位の決定を試みた結果、保存されたシステイン残基の5番目と6番目の間のスレオニン残基にO-GlcNAcの付加が検出された。また、修飾部位のセリン/スレオニン残基のアラニンへの置換を行なった変異体

を作製した結果、O-GlcNAc修飾の消失することを確認できた。

(4)細胞外O-GlcNAc型糖鎖の生合成機構

S2細胞におけるOGTのRNAiによる発現抑制の結果、細胞外O-GlcNAc修飾は、OGT非依存的に起きることが明らかになった。また、OFUT1、Rumi、FringeのRNAiによる発現抑制の結果、これらのEGFドメイン特異的に作用する糖転移酵素も、細胞外O-GlcNAc修飾には関与しないことが明らかになった。これらの結果より、EGFドメインにおけるO-GlcNAc修飾には、新規の糖転移酵素が関与することが明らかになった。

(5)EGFドメインに作用するO-GlcNAc転移酵素の同定と酵素活性の確認

機能が不明の糖転移酵素遺伝子を中心に、RNAiスクリーニングを行ない、細胞外O-GlcNAc転移酵素の同定を試みた結果、新規の糖転移酵素EOGTの同定に成功した。EOGTを、S2培養細胞に遺伝子導入後、膜画分を調製し、*in vitro*のO-GlcNAc転移アッセイを行なったところ、フォールディングを受けたEGFドメイン特異的なO-GlcNAc転移活性の確認が検出できた。また、酵素活性には2価カチオンを要求することが明らかになった。さらに、ショウジョウバエのEOGTのアミノ酸配列を元にして、マウスやヒトなどの哺乳動物ホモログを同定し、その酵素活性の検出することに成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Sakaidani Y, Furukawa K, Okajima T. O-GlcNAc modification of EGF domains of Notch receptors. *Methods Enzymol.* 480 355-373 (2010) 査読有
- ② Okajima T., Furukawa K and Sakaidani Y. O-GlcNAc modification of the extracellular domain of Notch receptors *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 22:247-255. (2010) 査読有
- ③ Stanley, P and Okajima, T. Roles of glycosylation in Notch signaling. *Current topics in developmental biology* 92:131-164. (2010) 査読有

④ Nakatani H, Aoki N, Okajima T., Nadano D, Flint D, Matsuda T. Establishment of a Mammary Stromal Fibroblastic Cell Line for In Vitro Studies in Mice of Mammary Adipocyte Differentiation. *Biol. Reprod.* 82(1):44-53. (2010) 査読有

⑤ Hino S, Matsubara T, Urisu A, Aoki N, Sato C, Okajima T., Nadano D, Matsuda T. Periodate-resistant carbohydrate epitopes recognized by IgG and IgE antibodies from some of the immunized mice and patients with allergy. *Biochem Biophys Res Commun.* 380:632-637 (2009) 査読有

⑥ Furukawa K, Tsuchida A, Okajima T., Furukawa K. Glycoconjugate glycosyltransferases. *Glycoconj. J.* 26(8): 987-998 (2009) 査読有

[学会発表] (計2件)

① 岡島 徹也 OGT-independent O-GlcNAcylation of EGF domains of Notch receptors. 内藤カンファレンス 2010年7月28日湘南

② Okajima T. O-GlcNAc modification on EGF domains of Notch receptors. Glycobiology meeting 2009 2009年11月13日 米国サンディエゴ

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/biochemII/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡島 徹也 (OKAJIMA TETSUYA)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 20420383

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし