

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(A)	
研究期間：2006～2008	
課題番号：18689011	
研究課題名（和文）	Ofut1によるNotch受容体の構造・機能の調節機構
研究課題名（英文）	Regulatory mechanisms for the structure and function of Notch receptors by Ofut1
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・講師	
研究者番号：20420383	

研究成果の概要：

Notch受容体のEGFリピートは、特徴的なO-結合型糖鎖修飾を受け、その修飾にはO-フコース転移酵素1 (OFUT1)など特異的な糖転移酵素が関与する。これまでの研究で、OFUT1には、糖転移活性の他にシャペロン活性があり、この活性がOFUT1の機能に中心的な役割を果たすこと、さらにOFUT1の作用の分子機序として、多数の連続したEGFリピートのフォルディングにOFUT1が必須な役割をすることを明らかにした。また、Notch受容体の細胞外領域における新たな翻訳後修飾として、O-HexNAc修飾の存在を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2007年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
総計	16,100,000	4,830,000	20,930,000

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-フコース転移酵素

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の糖鎖修飾は最も一般的な翻訳後修飾の一つであり、細胞レベル、個体レベルで重要な機能を持っている。近年、N-結合型糖鎖やムチン型糖鎖として一般的に見出される糖鎖以外に、新型糖鎖が次々と明らかになってきている。そのような糖鎖は特定の

ドメインに特異的なため、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。

ドメイン特異的な糖鎖修飾の一つであるEGF(epidermal growth factor)ドメイン特異的なO-結合型糖鎖は、細胞機能に強く関連している代表例としてよく知られている。EGFドメインは30-40アミノ酸により構成されて

おり、3つのジスルフィド結合によってN末端とC末端にアンチパラレル型 β シート構造を一つずつ持つ構造を保っている。このEGFドメイン上の異なる位置にO-グルコース型糖鎖、O-フコース型糖鎖という特異的な糖鎖修飾が見つかっている。EGFドメインに特徴的な糖鎖構造の生合成には、いくつかの特異的な糖転移酵素遺伝子が関与する。

O-フコース転移酵素1 (OFUT1) は小胞体に局在する可溶性糖転移酵素で、EGFドメイン上のO-フコース型糖鎖修飾の最初のプロセスで働く。O-フコシル化されるタンパク質の最初の例は、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ (u-PA) である。uPAのO-フコシル化の有無は、細胞表面上の受容体との結合には関与しないが、受容体を活性化するのに必要とされる。その後、組織プラスミノゲンアクチベータ (tPA)、血液凝固因子VII、IX、XIIに含まれるEGFドメインにも同定されている。血液凝固因子VIIはO-フコース単糖しか付加されないのに対し、血液凝固因子IXはフコース- β 1,3-GlcNAc- β 1,4-Gal- α 2,3/2,6-シアル酸という四糖による修飾を受ける。近年の研究により、EGFドメイン特異的なO-結合型糖鎖は、シグナル伝達に関わる細胞膜タンパク質でも見つかっている。このようなタンパク質として、Notch受容体とそのリガンド (Delta、Serrate/Jagged) がある。Notchシグナルは進化的に保存されており、発生の各段階を広く制御している。Notch受容体の細胞外領域はタンデムに並んだEGFドメインにより構成されており、その多くがO-フコース型修飾を受けると考えられている。リガンド結合領域にあたるEGF12のO-フコース型修飾部位は進化的に保存されており、O-フコース型修飾の重要性を示唆している。O-フコシル化の機能的な重要性はPofut1/Ofut1変異体の研究により確認された。ショウジョウバエと哺乳類両方について、Pofut1/Ofut1が欠損するとNotchの機能欠損体と同じ特徴を示した。この結果は

Pofut1/Ofut1がNotchシグナルに必須なことを示している。

2. 研究の目的

本研究では、Notch受容体の糖鎖修飾に関わる糖転移酵素O-フコース転移酵素1 (OFUT1) によるNotch受容体の構造と機能の調節機能を明らかにすることを主な目的とする。同時に、OFUT1と協調的に働くと考えられる新規糖転移酵素遺伝子の同定も試みる。

3. 研究の方法

(1) **O-フコース転移酵素1のシャペロン活性** OFUT1には、酵素活性以外にもシャペロン活性があるという我々の発見は、OFUT1のNotchシグナル伝達における役割に再考を促すものである。すなわち、O-フコシル化がNotch受容体の活性化に必須なのか、それともシャペロン活性が必要であるのか、という点を明らかにする必要がある。この問題に対して、ショウジョウバエの系で、シャペロン活性のみを持ったOFUT1変異体 (R245A) によるOFUT1機能喪失型変異体のレスキュー実験を行う。

(2) **OFUT1のNotch受容体に対する作用の分子機序** 申請者の従来の研究により、OFUT1にはシャペロン活性があり、Notch特異的な分泌に関与することが明らかになった。その分子機序として、以下2つの可能性を考えている。第一は、NOTCHのEGFリピートは他の分子にはない立体構造を取っており、その特異構造を形成するのにOFUT1が必要である可能性である。この仮説によれば、NOTCHのEGFリピートの分泌には、OFUTを必要とする領域とOFUT1を必要としない領域とに分類できる。この可能性を検証するために、アルカリフォスファターゼ (AP) タグをつけたNOTCHのEGFリピート (NOTCH:AP) に対する欠失変異体を複数作製する。具体的には、EGF1からEGF12ま

でのみを含むNOTCH[1-12]:AP、EGF1からEGF24までのみを含むNOTCH[1-24]:AP、EGF13 から EGF36 までを含むNOTCH[13-36]:APを作製する。各コンストラクトにおけるS2培養細胞での分泌能を細胞培養液中に分泌されたAP活性を測定することにより定量する。OFUT1依存性は、OFUT1の過剰発現により分泌量が増加するか、もしくは、OFUT1に対するRNAiにより分泌量が減少するかを調べることにより、予想される特異構造のマッピングを試みる。もし、特定の領域が絞り込めない場合は、OFUT1はEGFリピート全体の適切な構造をとるのに必要であると考えられる。

4. 研究成果

(1) Notch受容体の細胞膜輸送におけるO-フコース転移酵素1の役割 OFUT1がNotch受容体に対する役割を明らかにするため、Ofut1変異クローンにおけるNotch受容体の局在を調べた。界面活性剤を用いて、膜透過処理をした場合、Ofut1変異クローンにおいて著明なNotch受容体の蛋白質発現の増加が認められた。また、その局在も異常を示し、野生型細胞に見られるadherens junctionへの局在が失われ、垂直断面において、apical側から、basal側に渡り、強い染色像が認められた。これらの、染色パターンは、部分的にERマーカーと一致したことから、Ofut1変異細胞では、細胞膜上への輸送に異常があることが示唆された(図1A)。次に、細胞膜上へのNotch受容体の発現の有無を確かめるため、膜透過処理をしない場合のNotch受容体の局在を調べた。Apical側の水平断面において、Ofut1変異クローンにおけるNotch受容体の染色像が失われた。また、垂直断面においても、その染色像は認められなかった(図1B)。以上の結果より、Ofut1変異細胞において、Notch受容体は細胞表面上に発現できないことが明らかになった。

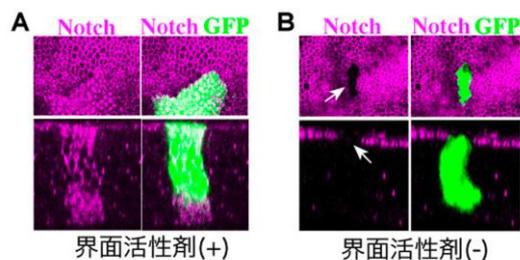


図1. Ofut1 は, Notch 受容体の細胞表面への発現に必要である. Ofut1 変異クローン(緑)を含むショウジョウバエ翅の成虫原基のNotch 受容体抗体を用いた染色像(マゼンタ)を示す. 上段:水平断面(apical 側), 下段:垂直断面. (A) 界面活性剤を用いて、膜透過処理をした場合のNotch 受容体の染色像を示した. Ofut1 変異クローンにおいて著明なNotch 受容体の蛋白質発現の増加が認められる. また、その局在も異常を示し、野生型細胞に見られるadherens junction への局在が失われている(上段). また、垂直断面において、apical 側から、basal 側に渡り、強い染色像が認められた. これらの、染色パターンは、部分的にER マーカーと一致した. (B) 膜透過処理をしない場合のNotch 受容体の染色像を示した. Apical 側の水平断面において、Ofut1 変異クローンにおけるNotch 受容体の染色像が失われた. また、垂直断面においても、その染色像は認められなかった. 以上の結果より、Ofut1変異細胞において、Notch 受容体は細胞表面上に発現できないことが明らかになった.

(2) O-フコース転移酵素1のシャペロン活性 OFUT1は、元々、EGFドメインとの結合能をもとに精製された。このことは、OFUT1の酵素活性のみならず、OFUT1の物理的相互作用がNotch受容体のフォルディングに関与する可能性も示唆される。そこで、OFUT1の糖転移活性を消失した変異体を作成し、Notch受容体のフォルディングにおける糖転移活性の寄与が調べた。OFUT1^{R245A}は、in vitroにおいて、酵

素活性を完全に消失していた。しかしながら、ショウジョウバエ翅の成虫原基 *Ofut1* 変異クローンに、OFUT1^{R245A} の発現を誘導した場合、adherens junction への Notch 受容体の局在の回復が観察された。また、OFUT1^{R245A} は S2 細胞における Notch 受容体 EGF リピートの分泌の促進や、そのリガンドとの結合能を亢進させた。これらの結果より、OFUT1 の糖転移活性以外に、酵素活性非依存的なシャペロン活性があることが示唆された。また、OFUT1^{R245A} のみを発現させた胚や変異クローンにおいては、Notch シグナルの回復が認められた。以上の結果は、OFUT1 のシャペロン活性による Notch 受容体のフォールディングの促進が Notch シグナルに重要な役割を果たしており、OFUT1 による Notch 受容体の O-フコシル化は Notch シグナルに必須ではないことが示唆された。OFUT1 は、Notch 受容体のフォールディング特異的に作用する初めての分子であり、EGF リピートの高次構造の形成の重要性が示唆された。

(3) OFUT1 の Notch 受容体への作用の分子機序 以上の研究より、EGF ドメインの O-結合型糖鎖の修飾に関わる糖転移酵素により、Notch 受容体の構造や機能が制御されていることが明らかになってきた。しかしながら、Notch 受容体の EGF リピート構造がどのような形を取っているのか明確な知見がないため、その分子機構は未だ、不明瞭である。OFUT1 のシャペロン活性については、以下のようなモデルが提唱されている。Notch 受容体の EGF リピートのフルディングには、個々の EGF ドメインのフォールディングと、EGF リピート全体の正しい高次構造の形成が必要であると仮定している。OFUT1 は、正しくフォールディングを受けた EGF ドメインに結合し、EGF リピート全体のフォールディングを促進する。O-フコシル化は、フォールディングの途中もしくは、フォールディング完了後のいずれかに起きると考えられる。OFUT1 がいない場合、個々の EGF ドメインの形成

は正しく起きるが、EGF リピート全体の構造がミスフォールドすると考えられる。酵素活性のない OFUT1^{R245A} は EGF ドメインに結合できるため、酵素活性がなくても EGF リピート全体のフォールディングを促進することができる。

OFUT1 が EGF リピートの分泌を促進する作用の分子機構を検討するために、EGF リピートの欠失変異体を複数作製し、それらの分泌能の OFUT1 依存性を検討した。EGF リピートの長さ と OFUT1 依存性の間に相関性が認められたことから、O-フコース転移酵素 1 は連続した多数の EGF ドメインの分泌に必須な役割を果たすことが明らかになった。そこで、O-フコース転移酵素 1 が、EGF リピートのフォールディングにおける役割を分子レベルで検討するためのモデル分子として、FLAG タグを付加した EGF リピートのコンストラクト (EGF:FLAG、EGF:FLAG-TM) を作製した。今後、これらのコンストラクトを用いて、O-フコース転移酵素 1 の発現抑制をした際の構造の変化を、ネイティブ PAGE の手法などを用いて、解析を行うことが必要であると考えられた。また、実際に、生体内でも同様な構造異常が生じるかどうかを検討するために、O-フコース転移酵素 1 の変異体を利用して、内在性の Notch 受容体の構造の変化の有無を調べる実験に関しても、今後の検討課題の 1 つとして考えられた。

(4) EGF ドメインの新たな O-結合型糖鎖修飾の同定 EGF ドメインを修飾する O-結合型糖鎖修飾として、O-フコースや O-グルコースが知られていたが、本研究課題を遂行する中で、これら既存の糖鎖修飾とは異なる、新規の O-結合型糖鎖修飾が存在することを示唆するデータが得られた。この新規の翻訳後修飾は分子量 203 であることから、O-GlcNAc もしくは O-GalNAc 修飾であることが考えられた。

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 14 件)

1. Matsubara T, Aoki N, Hino H, Okajima T, Nadano D, Matsuda T: Serum and monoclonal IgE antibodies from NC/Nga mice with severe atopic-like dermatitis recognize an autoantigen, histone H3. *Clin. Exp. Allergy in press.* (2009) 査読有
2. Matsuura A, Ito M, Sakaidani Y, Kondo T, Murakami K, Furukawa K, Nadano D, Matsuda T, and Okajima T: O-linked GlcNAc is present on the extracellular domain of Notch receptors. *J. Biol. Chem.* 283:35486-35495 (2008) 査読有
3. Okajima T, Reddy B, Matsuda T and Irvine KD: Contributions of chaperone and glycosyltransferase activities of O-fucosyltransferase 1 to Notch signaling. *BMC biology* 6:1 (2008) 査読有
4. Okajima T, Matsuura A, Matsuda T: Biological functions of glycosyltransferase genes involved in O-fucose glycan synthesis. *J. Biochem.* 144:1-6 (2008) 査読有
5. Furukawa K, Tsuchida A, Okajima T, Furukawa K: Glycoconjugate glycosyltransferases. *Glycoconj. J. in press* (2008) 査読有
6. Hashizume F, Hino S, Kakehashi M, Okajima T, Nadano D, Aoki N, and Matsuda T: Development and evaluation of transgenic rice seeds accumulating a type II-collagen tolerogenic peptide *Transgenic Research* 17:1117-1129 (2008) 査読有
7. Hashizume F, Hino S, Okajima T, Nadano D, Aoki N and Matsuda T : Suppressive expression of the glutelin A1-collagen peptide fusion gene in hybrid rice lines with the mutant line, Low Glutelin Content-1 (LGC-1) *Plant Biotechnol.* 25: 465-471 (2008) 査読有
8. Chigira Y, Oka T, Okajima T and Jigami Y. Engineering of a mammalian O-glycosylation pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: production of O-fucosylated epidermal growth factor domains. *Glycobiology* 18:303-314 (2008) 査読有
9. 松浦愛子・松田幹・岡島徹也: 糖転移酵素のNotch受容体フォールディングにおける役割 *蛋白質核酸酵素* 53: 1480-1485 (2008) 査読有
10. Matsubara T, Aoki N, Honjoh T, Mizumachi K, Kurisaki JI, Okajima T, Nadano D, Matsuda T: Absorption, Migration and Kinetics in Peripheral Blood of Orally Administered Ovalbumin in a Mouse Model. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72:2555-2565 (2008) 査読有
11. Okumura H, Okajima T, Nadano D, Matsuda T. Association of chicken zona pellucida glycoprotein (ZP) B1 with ZPC induces formation of ZPB1-ZPC fibrous aggregates containing disulfide-bridged ZPB1 dimer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364: 682-688 (2007) 査読有
12. Miyoshi M, Okajima T, Matsuda T, Fukuda MN, Nadano D. Bystin in human cancer cells. Intracellular localization and function in ribosome biogenesis. *Biochem. J* 404: 373-381 (2007) 査読有
13. 岡島徹也: EGFドメインに見いだされる新型糖鎖と生体機能制御 *化学と生物* 44: 802-804 (2006) 査読有

14. Okajima T, Matsuda T: Roles of fucosyltransferase and fucose in Notch signaling. *Methods Enzymol.* 417:111-26 (2006) 査読有

[学会発表] (計 8 件)

1. 伊藤麻紀子、岡島徹也ら Notch受容体細胞外ドメインにおけるO-GlcNAc修飾 BMB2008 2008年12月9日-12日 神戸
2. 堺谷祐太、岡島徹也ら EGFリピートのフォルディングにおけるO-フコース転移酵素1の役割の解明 BMB2008 2008年12月9-12日 神戸
3. Matsuura A, Okajima T et al. O-linked GlcNAc is present on the extracellular domain of Notch receptors Glycobiology meeting 2008年11月14日 Fort Worth (USA)
4. 松浦愛子、岡島徹也ら EGFドメイン特異的O-結合型糖鎖と糖転移酵素遺伝子 日本糖質学会 2008年8月18日-20日 筑波
5. Okajima T et al. Contributions of chaperone and glycosyltransferase activities of O-fucosyltransferase 1 to Notch signaling. BMB2007, 2007年12月11-15日 横浜
6. Okajima T et al. Contributions of chaperone and glycosyltransferase activities of O-fucosyltransferase 1 to Notch signaling. Notch研究会 2007年7月5-6日 三島

7. Okajima T et al. Genetic and biochemical analysis of O-fucosyltransferase 1 for Notch receptor structure and function. 日本農芸化学会, 2007年3月24-27日 東京

8. Okajima T et al. Requirement of O-fucosyltransferases for Developmental Processes. GlycoT 2006, 2006年6月25-28日 筑波

[図書] (計1件)

1. Taniguchi T et al. Springer Experimental Glycoscience 33-35 2008

[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・講師

研究者番号: 20420383