

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16073

研究課題名（和文）EGFRリガンドの性質を決定するO-GlcNAc glycanの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of O-GlcNAc glycan to determine the properties of EGFR ligands

研究代表者

小川 光貴（Ogawa, Mitsutaka）

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70727429

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、O-GlcNAc glycan が Notch シグナルだけでなく、EGFR シグナルも制御する糖鎖である可能性を示した世界初の研究である。本研究で見出された O-GlcNAc glycan の多様性がEGFR シグナルを制御することが実証できれば、O-GlcNAc glycan の新たな生物学的意義の解明に繋がるであろう。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、癌の悪性化や個体発生に重要な機能をもつEGFRシグナルを制御する新しい糖鎖修飾を見出すことができた。このことは、癌の成り立ちや生物の成り立ちを理解する上で、非常に重要な発見であり、創薬研究への応用や再生医療分野への貢献が期待でき、学術的にも社会的にも非常に意義がある研究成果である。

研究成果の概要（英文）：This is the first study in the world to demonstrate that O-GlcNAc glycan may be a glycan that regulates not only Notch signaling but also EGFR signaling. If the diversity of O-GlcNAc glycan found in this study can be demonstrated to regulate EGFR signaling, it will lead to a new understanding of the biological significance of O-GlcNAc glycan.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 EGFR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究は、O-GlcNAc glycan が Notch シグナルだけではなく、EGFR シグナルも制御する糖鎖であることを実証することを目的とする。O-GlcNAc glycan は、Notch1 などの EGF ドメインに生じる非典型的な糖鎖修飾である。O-GlcNAc glycan の異常は Notch シグナルの破綻を引き起こし、その結果、先天性疾患や異常な血管新生の原因となる。本研究で O-GlcNAc glycan の多様性が EGFR シグナルを制御することが実証できれば、糖鎖多様性の基本原理を初めて明確に証明することになる。

2. 研究の目的

EGF 受容体は、上皮系や神経系などの細胞膜表面に発現する受容体型チロシンキナーゼである。上皮成長因子(リガンド)は EGFR に結合することで、EGFR の 2 量体形成が誘発され、EGFR シグナルが惹起される。興味深いことに、EGFR に結合するリガンドの種類によって、EGFR シグナルの量的違いだけではなく質的違いも生じていることが報告された。即ち、EGF が EGFR に結合した場合は一過性に強いシグナルが下流に伝達されて MCF-7 細胞が増殖するのに対して、Epiregulin が結合した場合には持続的に弱いシグナルが伝達されて MCF-7 細胞が脂肪細胞様に分化転換する。しかし、EGFR シグナルの強度は、リガンドを分泌するガン細胞ごとに多様性があるので、EGFR リガンドの性質を制御する未知の因子がある可能性が高いことが示されている。そこで本研究では、EGFR リガンドの性質を制御する未知の因子を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

EGFR リガンドの質量分析による解析と生化学的・細胞生物学的機能アッセイ

EGFR リガンドに、ガン細胞ごとに特徴的なパターンを示す因子の存在を質量分析装置を用いた解析で見出した。また、それぞれの特徴的なパターンを示す因子の生化学的・細胞生物学的機能アッセイを実施した。

リコンビナント EGFR リガンドの調整

大腸菌にてリコンビナント EGFR リガンドの作成を予定していたが、不溶性となり高純度で精製することが困難であった。そこで、ペプチド合成にてリコンビナント EGRF リガンドを合成する方針に転換した。その結果、ペプチド合成にて高純度のリコンビナント EGRF リガンドの合成に成功した。

リコンビナント EGFR リガンドによる生物物理的解析

NMR や X 線構造解析、細胞によるバイオアッセイで機能解析を実施している。

4. 研究成果

EGFR リガンドの質量分析による解析と生化学的・細胞生物学的機能アッセイ

EGFR リガンドに、ガン細胞ごとに特徴的なパターンを示す因子の存在を明らかにする為に、質量分析装置を用いた解析した。その結果、O-GlcNAc glycan が EGFR リガンドに生じていることを見出した。また、O-GlcNAc glycan の糖鎖パターンは、細胞毎に特色があることを見出

した。特に、悪性度も高いガン細胞由来の EGFR リガンドに特徴的な O-GlcNAc glycan が生じていることを見出した。

次に、悪性度が高いガン細胞由来の EGFR リガンドと正常細胞由来の EGFR リガンドを MCF-7 細胞で刺激した。正常細胞由来の EGFR リガンドで MCF-7 細胞を処理した場合は、MCF-7 細胞が 脂肪細胞様に分化転換した。一方、悪性度も高いガン細胞由来の EGFR リガンドで MCF-7 細胞を刺激した場合は、MCF-7 は分化転換せず、細胞は増殖した。この結果から、EGFR リガンドに存在する O-GlcNAc glycan は、細胞の運命決定を司る可能性が示された。

リコンビナント EGFR リガンドの調整

悪性度が高いガン細胞由来の EGFR リガンドに存在する O-GlcNAc glycan と正常細胞由来の EGFR リガンドに存在する O-GlcNAc glycan の機能を明らかにするために、大腸菌にてリコンビナント EGFR リガンドの調整を試みた。しかしながら、正しくフォールディングした EGFR リガンドを調整できなかった。そこで、ペプチド合成後、リフォールディングすることで正しく折りたたまれた EGFR リガンドを調整することに成功した。また、O-GlcNAc glycan の糖転移酵素で O-GlcNAc glycan を付加した EGFR リガンドを得ることに成功した。

リコンビナント EGFR リガンドによる生物物理的解析

O-GlcNAc glycan が EGFR リガンドの構造を制御している可能性を検証した。まず、ペプチド合成で生成した EGFR リガンドの構造を解析する為に、X線構造解析に向けた結晶化スクリーニングを実施した。しかしながら、結晶化条件を最適化することは出来ず、X線構造解析による構造解析は断念した。一方、NMR による解析では、O-GlcNAc glycan の有無で構造変化が誘導されることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ogawa Mitsutaka, Tashima Yuko, Sakaguchi Yamato, Takeuchi Hideyuki, Okajima Tetsuya	4. 巻 526
2. 論文標題 Contribution of extracellular O-GlcNAc to the stability of folded epidermal growth factor-like domains and Notch1 trafficking	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 184 ~ 190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Alam Sayad Md. Didarul, Tsukamoto Yohei, Ogawa Mitsutaka, Senoo Yuya, Ikeda Kazutaka, Tashima Yuko, Takeuchi Hideyuki, Okajima Tetsuya	4. 巻 295
2. 論文標題 N-Glycans on EGF domain-specific O-GlcNAc transferase (EOGT) facilitate EOGT maturation and peripheral endoplasmic reticulum localization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 8560 ~ 8574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.012280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Barua Rashu, Mizuno Kazuyuki, Tashima Yuko, Ogawa Mitsutaka, Takeuchi Hideyuki, Taguchi Ayumu, Okajima Tetsuya	4. 巻 26
2. 論文標題 Bioinformatics and Functional Analyses Implicate Potential Roles for EOGT and L-fringe in Pancreatic Cancers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 882 ~ 882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26040882	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hashiguchi Hiroki, Tsukamoto Yohei, Ogawa Mitsutaka, Tashima Yuko, Takeuchi Hideyuki, Nakamura Masanao, Kawashima Hiroki, Fujishiro Mitsuhiro, Okajima Tetsuya	4. 巻 695
2. 論文標題 Glycoproteomic analysis identifies cryptdin-related sequence 1 as O-glycosylated protein modified with 1,2-fucose in the small intestine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108653 ~ 108653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2020.108653	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mitsutaka Ogawa, Yuko Tashima, Yamato Sakaguchi, Hideyuki Takeuchi, Tetsuya Okajima	4. 巻 184-190
2. 論文標題 Contribution of extracellular O-GlcNAc to the stability of folded epidermal growth factor-like domains and Notch1 trafficking	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.066.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsukamoto Yohei, Ogawa Mitsutaka, Yogi Kentarou, Tashima Yuko, Takeuchi Hideyuki, Okajima Tetsuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Glycoproteomics of NOTCH1 EGF repeat fragments overexpressed with different glycosyltransferases in HEK293T cells reveals insights into O-GlcNAcylation of NOTCH1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/glycob/cwac015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計27件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Yohei Tsukamoto, Kazuhiro Aoki, Yoshiki Narimatsu, Yusuke Urata, Wataru Saiki, Mitsutaka Ogawa, Henrik Clausen, Michael Tiemeyer, Tetsuya Okajima, Hideyuki Takeuchi
2. 発表標題 3'-Sialyllactose on Notch: NOTCH1 functions as a scaffold of O-linked, 3'-sialyllactosylated glycans
3. 学会等名 Virtual 2020 Society of Glycobiology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mitsutaka Ogawa, Yohei Tsukamoto, Kenntarou Yogi, Yuya Senoo, Kazutaka Ikeda, Hideyuki Takeuchi, Tetsuya Okajima
2. 発表標題 Comprehensive O-GlcNAc glycoproteomics on NOTCH1 EGF repeats refined the sequons for O-GlcNAcylation and uncovered unique Lewis X epitopes in mammals
3. 学会等名 Virtual 2020 Society of Glycobiology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sayad Md. Didarul Alam, Yohei Tsukamoto, Mitsutaka Ogawa, Yuya Senoo, Kazutaka Ikeda, Yuko Tashima, Hideyuki Takeuchi, Tetsuya Okajima
2. 発表標題 N-glycans on EGF domain-specific O-GlcNAc transferase (EOGT) facilitate EOGT maturation and peripheral endoplasmic reticulum localization.
3. 学会等名 Virtual 2020 Society of Glycobiology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 澄香, 小川 光貴, 竹内 英之, 岡島 徹也, 有森 貴夫, 高木 淳一, 相川 京子
2. 発表標題 血液凝固第XII因子の活性化抑制における糖鎖修飾の役割
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川 光貴, 田嶋 優子, 坂口 大和, 竹内 英之, 岡島 徹也
2. 発表標題 細胞外O-GlcNAc修飾はEGFドメインの安定性とNotch1のトラフィッキングへの寄与する
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ogawa Mitsutaka, Tashima Yuko, Sakaguchi Yamato, Takeuchi Hideyuki, Okajima Tetsuya
2. 発表標題 Contribution of extracellular O-GlcNAc to the stability of folded epidermal growth factor-like domains and Notch1 trafficking
3. 学会等名 GlycoT2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sayad Md. Didarul Alam, Yohei Tsukamoto, Mitsutaka Ogawa, Yuya Senoo, Kazutaka Ikeda, Yuko Tashima, Hideyuki Takeuchi, Tetsuya Okajima
2. 発表標題 N-glycans on EGF domain-specific O-GlcNAc transferase (EOGT) facilitate EOGT maturation and peripheral endoplasmic reticulum localization.
3. 学会等名 GlycoT2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sayad Md. Didarul Alam, Yohei Tsukamoto, Mitsutaka Ogawa, Yuya Senoo, Kazutaka Ikeda, Yuko Tashima, Hideyuki Takeuchi, Tetsuya Okajima
2. 発表標題 N-glycans on EGF domain-specific O-GlcNAc transferase facilitate protein maturation and peripheral endoplasmic reticulum localization
3. 学会等名 第 84回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuko Tashima, Wakako Goto, YuyaSenoo, Yohei Tsukamoto, Kazutaka Ikeda, Mitsutaka Ogawa, Hideyuki Takeuchi, Tetsuya Okajima
2. 発表標題 Regulation of transport of Delta-like1 homolog from endoplasmic reticulum mediated by O-glycans
3. 学会等名 第 84回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川光貴, 田嶋優子, 坂口大和, 竹内英之, 岡島徹也
2. 発表標題 細胞外 O-GlcNAc 修飾は EGF ドメインの安定性と Notch1 のトラフィッキングへの寄与する
3. 学会等名 第 84回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塚本庸平, 青木一弘, 成松由規, 浦田悠輔, 齊木颯, 小川光貴, Tiemeyer, Henrik Clausen, 岡島徹也, 竹内英之
2. 発表標題 Notch 受容体上の O-結合型糖鎖修飾の質量分析計を用いた網羅的解析
3. 学会等名 第 84回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mitsutaka Ogawa, Kentarou Yogi, Yuya Senoo, Kazutaka Ikeda, Hideyuki Takeuchi, Tetsuya Okajima
2. 発表標題 Identification of fucose-containing novel O-GlcNAc glycan
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 与儀賢太郎, 小川光貴, 妹尾勇弥, 池田和貴, 竹内英之, 岡島徹也
2. 発表標題 Notch1 受容体上のO-GlcNAc glycan は細胞外環境に応答する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田嶋優子, 後藤和佳子, 妹尾勇弥, 塚本 庸平, 池田和貴, 小川光貴, 竹内英之, 岡島徹也
2. 発表標題 Delta-like1 homologのO型糖鎖修飾による細胞膜発現制御機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡島徹也,小川光貴,竹内英之
2. 発表標題 Notch受容体糖鎖による生体機能の精密制御機構の理解を目指したグライコプロテオミクス研究
3. 学会等名 第9回 名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川光貴,与儀賢太郎,妹尾勇弥,池田和貴,竹内英之,岡島徹也
2. 発表標題 Notch1 受容体上のO-GlcNAc glycan は細胞外環境に応答する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本庸平,妹尾勇弥,浦田悠輔,齊木颯,小川光貴,池田和貴,竹内英之,岡島徹也
2. 発表標題 Notch 受容体上の O- 結合型糖鎖修飾の質量分析計を用いた網羅的解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sayad Md. Didarul Alam,Mitsutaka Ogawa,Yuko Tashima,Hideyuki Takeuchi,Tetsuya Okajima
2. 発表標題 Effect of N-glycan on ER localized O-GlcNAc transferase (EOGT) and O-GlcNAcylation on Notch1 extracellular domains
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田嶋優子, 後藤和佳子, 妹尾勇弥, 塚本庸平, 池田和貴, 小川光貴, 竹内英之, 岡島徹也
2. 発表標題 Delta-like 1 homolog の細胞膜発現の制御機構の解析
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村澄香, 小川光貴, 竹内英之, 岡島徹也, 有森貴夫, 高木淳一, 相川京子
2. 発表標題 血液凝固第 XII 因子の活性化における EGF 様ドメインの O-結合型糖鎖修飾 の役割
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川光貴, 矢木宏和, 田嶋優子, 妹尾勇弥, 池田和貴, 加藤晃一, 竹内英之, 岡島徹也
2. 発表標題 構造学的なアプローチによる 細胞外 O-GlcNAc 修飾の分子機能解析
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本庸平, 浦田悠輔, 齊木颯, 小川光貴, 竹内英之, 岡島徹也
2. 発表標題 Notch 受容体上の O-結合型糖鎖修飾の質量分析計を用いた網羅的解析
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sayad Md. Didarul Alam, Mitsutaka Ogawa, Hideyuki Takeuchi, Tetsuya Okajima
2. 発表標題 Effect of N-glycan on EOGT and O-GlcNAcylation on Notch extracellular domains
3. 学会等名 第83回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 与儀寛太郎, 小川光貴, 妹尾勇弥, 池田和貴, 竹内英之, 岡島徹也
2. 発表標題 Notch1 受容体上のO-GlcNAc glycan は細胞外環境に応答する
3. 学会等名 第83回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川光貴, 坂口大和, 竹内英之, 岡島徹也
2. 発表標題 O-GlcNAc は Notch 受容体 EGF20 の安定性を増強する
3. 学会等名 第83回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本庸平, 妹尾勇弥, 浦田悠輔, 齊木颯, 小川光貴, 池田和貴, 竹内英之, 岡島徹也
2. 発表標題 Notch 受容体上のO-結合型糖鎖修飾の質量分析計を用いた網羅的解析
3. 学会等名 第83回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田嶋優子, 後藤和佳子, 妹尾勇弥, 塚本庸平, 池田和貴, 小川光貴, 竹内英之, 岡島徹也
2. 発表標題 NOTCH受容体リガンドDelta-like 1 homologの細胞膜発現の制御機構についての解析
3. 学会等名 第83回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 北島 健、佐藤 ちひろ、門松 健治、加藤 晃一	4. 発行年 2020年
2. 出版社 名古屋大学出版会	5. 総ページ数 306
3. 書名 糖鎖生物学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関