

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011 ~ 2012  
 課題番号：23790328  
 研究課題名（和文）  
 新奇O-GlcNAc修飾の生物機能探索を目指したショウジョウバエ変異体の解析  
 研究課題名（英文）  
 Biological and biochemical analyses of *Drosophila* mutants lacking a novel O-GlcNAc 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）：細胞質のタンパク質や核タンパク質のO結合型N-アセチルグルコサミン（O-GlcNAc）修飾は基本的な細胞機能を調節しており、また糖尿病や神経変性疾患の病因にかかわっている。この細胞内で起こるO-GlcNAc修飾は、単一のO-GlcNAcトランスフェラーゼ、OGTによって触媒される。本研究課題では、新規なOGTであるEOGTが細胞外でのO-GlcNAc修飾にかかわっていることを報告する。OGTとEOGTはどちらもヘキソサミン経路によって調節されているが、EOGTは小胞体内腔に局在していて、OGTに非依存的にGlcNAcを上皮増殖因子様ドメイン転移する。*Eogt*が失われると、頂端側細胞外マトリックスの異常が引き起こすものと似た表現型が見られるようになる。膜に係留されている細胞外タンパク質のDumpyはO-GlcNAc修飾されており、EOGTはDp依存性の上皮細胞-マトリックス相互作用に必要な。したがって、分泌型糖タンパク質や膜糖タンパク質のO-GlcNAc修飾は、細胞表面で起こる細胞間相互作用、あるいは細胞とマトリックスの間の相互作用の今まで知られていなかったメディエーターである。

研究成果の概要（英文）：The O-linked- N -acetylglucosamine (O-GlcNAc) modification of cytoplasmic and nuclear proteins regulates basic cellular functions and is involved in the aetiology of diabetes and neurodegeneration. This intracellular O-GlcNAcylation is catalyzed by a single O-GlcNAc transferase, OGT. Here we report a novel OGT, EOGT, responsible for extracellular O-GlcNAcylation. Although both OGT and EOGT are regulated by hexosamine flux, EOGT localizes to the lumen of the endoplasmic reticulum and transfers GlcNAc to epidermal growth factor-like domains in an OGT-independent manner. Loss of *Eogt* gives phenotypes similar to those caused by defects in the apical extracellular matrix. Dumpy, a membrane-anchored extracellular protein, is O-GlcNAcyated, and EOGT is required for Dp-dependent epithelial cell - matrix interactions. Thus, O-GlcNAcylation of secreted and membrane glycoproteins is a novel mediator of cell - cell or cell - matrix interactions at the cell surface.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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・生体分子医学

キーワード：Notch受容体、糖鎖修飾、O-結合型糖鎖、O-GlcNAc転移酵素

- |                                    |   |
|------------------------------------|---|
| 1. 研究開始当初の背景<br>タンパク質の多彩な翻訳後修飾は、タン | パク質機能の発現、調節に重要な働きをすることが知られている。その中で、O-GlcNAc |
|------------------------------------|---|

修飾は、細胞内に特有な翻訳後修飾として、リン酸化と協調・拮抗しながら、シグナル伝達、転写、翻訳、タンパク質分解などの基本的な細胞機能に重要な働きをする。O-GlcNAcは細胞内の栄養センサーとしても働くとともに、細胞分化の際のエピジェネティック制御にも関与することも報告されている。また、O-GlcNAc修飾の異常は、糖尿病やアルツハイマー病などの神経変性疾患の病因と関連があらと考えられている。

O-GlcNAc修飾は、Gerald Hartらのグループにより発見されてから25年以上経過するが、細胞内に特異的な翻訳後修飾であると、これまで長く信じられており、唯一のO-GlcNAc転移酵素であるOGTがO-GlcNAc修飾を担っているとされてきた。しかしながら、我々は、ショウジョウバエNotch受容体の細胞外ドメインの翻訳後修飾を解析する過程で、O-GlcNAc型糖鎖修飾が細胞外に存在する新たな知見を得た(Matsuura A et al. J. Biol. Chem. 2008)。さらに、研究代表者を中心とした研究グループは、細胞外のO-GlcNAc修飾に関する新規の遺伝子(*Eogt*)を単離することに成功した。

このことは、以下の2つの興味深い仮説を提供する。第一に、細胞外O-GlcNAcも栄養センサーとして働き、細胞がその栄養状態に応じて、細胞外タンパク質のO-GlcNAcレベルを変動させ、細胞外環境を適切な状態に調節する新たな生命システムが存在する可能性が示唆される。第二に、O-GlcNAcに栄養センサーとは独立した働きがあり、細胞外のタンパク質機能を調節し、発生、分化プロセスを含む多様な生体機能を調節する新規の分子メカニズムが存在する可能性が示唆された。実際に、生化学的解析とバイオインフォマティクスによる予測により、EOGTは、Notch受容体のみならず、Notch受容体のリガンド(DeltaやSerrate/Jagged)、細胞外マトリックスタンパク質のDumpyなど多様な細胞外タンパク質の翻訳後修飾に関与すると予想された。また、哺乳動物においてもEOGTホモログ分子が存在していることより、細胞外O-GlcNAc修飾は、進化的に保存された新規翻訳後修飾として、多様な生体機能の調節に重要な役割担っており、ヘキソサミン経路の異常と関連のある糖尿病、神経変性疾患における細胞外O-GlcNAc修飾レベルの異常が、これらの疾患の病態に関与している可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

以上の背景をふまえ、細胞外O-GlcNAc修飾の機能解明へ向けた第一段階として、本研

究課題では (1)ショウジョウバエEOGT変異体の表現型の解析、(2)*Eogt*変異体の表現型に関連したO-GlcNAc修飾タンパク質の同定、(3)O-GlcNAc付加によるタンパク質機能の制御機構の解明を試みることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)ショウジョウバエ*Eogt*変異体の表現型の解析

EOGTにより修飾を受けるNotch受容体は、神経発生を始めとした発生や細胞分化の多様なプロセスに関与することが知られている。細胞外O-GlcNAc修飾のNotchシグナルにおける役割を明らかにするため、Notchシグナルを解析するために最適なモデル生物であるショウジョウバエを用いて変異体の解析を行った。予備的研究に述べたように、ショウジョウバエ*Eogt*のzygotic変異体は、2齢幼虫から3齢幼虫の段階で致死となり、細胞外O-GlcNAcが発生過程で必須な役割を果たすことが明らかになった。そこで、モザイク解析により、Notchシグナルの消失に特徴的な表現型(rough eye、wing margin loss、thickened wing veinなど)の有無を検討した。また、胚発生過程においては、Neurogenic phenotypeの有無を、ELAVやHRP染色を行なうことで、発生過程における*Eogt*のNotchシグナルへの関与を検討した。

予備的研究の結果、*Eogt*変異体のモザイク解析をすると、翅の形成に異常(wing blister)が認められ、細胞接着の異常を示唆するデータが得られた。よって、EOGTは、Notchシグナル依存的プロセスとともに、細胞と細胞外マトリックス相互作用に関与している可能性が示唆された。ショウジョウバエの翅の形成には、細胞と細胞外マトリックス間の正常な相互作用が必要であるが、少なくとも以下の2つの独立した機序の関与が提唱されている。第一に、インテグリン等の接着分子は、上皮細胞と基底膜側の細胞外マトリックスの接着に必要とされる。第二に、上皮細胞とapical側の細胞外マトリックス(apical extracellular matrix: ECM)との接着も重要であり、詳細な分子機序は不明であるが、膜貫通タンパク質のDumpyやPiopioが関与すると考えられている。そこで、細胞外O-GlcNAc修飾が上記のいずれのプロセスに関与するか検討するために、EOGTの変異体を用いて以下の表現型の有無について検討を行った。第一に、インテグリン依存的な細胞接着は、muscleとtendon cellsとの接着に必要であることから、その異常は胚発生の過程でmuscle detachmentの表現型を呈する。よって、EOGT変異体のトロポミオ

シン染色などを行うことにより、筋構築が正常か否かを調べた。一方、Dumpy や Piopio の異常は、cuticle が上皮から剥離する cuticle detachment の表現型を示す。そこで、EOGT の変異体の胚もしくは幼虫を用いて、電子顕微鏡観察をすることにより、cuticle の形成に異常がないか検討した。

## (2) EOGT 変異体の表現型に関連した O-GlcNAc 修飾タンパク質の同定

### ① O-GlcNAc 修飾をうける細胞外マトリックスタンパク質の同定

上述した実験結果に基づき、細胞・マトリックス相互作用に關与するO-GlcNAc修飾分子を同定した。インテグリン依存的な細胞・マトリックス相互作用に關与する分子の中で、EGFドメインを有し、かつO-GlcNAc修飾部位をもつ分子として、インテグリンやラミニンが考えられた。一方、aECMを構成する分子の中では、Dumpyが候補分子として考えられた。そこで、第一に、EOGTがインテグリンやラミニン、Dumpyとの遺伝的相互作用により、wing blisterなどの表現型が増強するか検討した。

また、独立したアプローチとしてCTD110.6抗体による免疫ブロットにより、O-GlcNAc修飾分子の同定を試みた。特に、EOGTの過剰発現により、約2メガダルトン付近のタンパク質のO-GlcNAc修飾レベルが上昇することを見出しており、約2万アミノ酸からなるDumpyが、基質としての有力候補の1つとして考えられた。野生型の2齢幼虫より抽出したCuticleタンパク質を用いて、Dumpy抗体による免疫沈降後、O-GlcNAc抗体で検出することにより、DumpyのO-GlcNAc修飾の検出を行った。

### ② Notch 受容体の O-GlcNAc 修飾

生体内における Notch 受容体の O-GlcNAc 修飾の確認のためには、野生型と Eogt 変異体の2齢幼虫の抽出液を調製し、Notch 受容体の細胞内領域に対する抗体で免疫沈降を行ない、野生型のサンプルにおける Notch 受容体の O-GlcNAc 抗体によるシグナルが、Eogt 変異体のサンプルでは消失することを示すことを試みた。

### (3)GlcNAc 付加によるタンパク質機能の制御機構の解明

インテグリン、ラミニンの機能は、過去の報告に基づき、内在性のインテグリンを発現する S2R+細胞を利用し、Eogt の RNAi による発現抑制により、S2R+細胞のインテグリン依存的な細胞接着が阻害されるかなどの検討を

行なった。一方、Dumpy を介した細胞接着を検討する実験系はこれまでに、報告されておらず、分子機能も不明である。そこで、Eogt 変異体を用いて Dumpy の局在の検討を行った。

## 4. 研究成果

O-GlcNAc 修飾を触媒する糖転移酵素遺伝子 Eogt のショウジョウバエ変異体を作成し、EGF ドメインの O-GlcNAc 修飾の生理機能の解明を目指した。Eogt 変異体の表現型の解析を行なったところ、Notch 受容体の O-GlcNAc 修飾は消失したものの、Notch シグナルに関連した表現型は認められなかった。一方、電子顕微鏡観察より Eogt 変異体において、Cuticle が上皮から剥離する表現型が観察された。実際、Cuticle から抽出したタンパク質を用いて O-GlcNAc 抗体で免疫ブロットを行なった所、高分子量のタンパク質が選択的に O-GlcNAc 修飾を受け、Eogt の変異体では、その O-GlcNAc 修飾が消失していることが明らかになった。免疫沈降の結果、O-GlcNAc 修飾を受けるタンパク質としてアピカル側の細胞外マトリックスタンパク質である Dumpy が同定された。Eogt 変異体では、Dumpy の局在の変化が認められ、Eogt と Dumpy は遺伝学的相互作用を示した。以上の結果より、O-GlcNAc は Dumpy 依存的な細胞・細胞外マトリックス間相互作用に必要であることが示唆された。一方、インテグリン依存的な細胞間相互作用には異常を認めなかった。以上の結果より、O-GlcNAc 修飾は、細胞内で機能するのみでなく、細胞間もしくは、細胞と細胞外マトリックス間の相互作用に關与する新規のメディエーターとして働くことが明らかになった。

## 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 4 件)

1. Matsumoto Y, Zhang Q, Akita K, Nakada H, Hamamura K, Tokuda N, Tsuchida A, Matsubara T, Hori T, Okajima T, Furukawa K, Urano T, Furukawa K. pp-GalNAc-T13 induces high metastatic potential of murine Lewis lung cancer by generating trimeric Tn antigen. Biochem Biophys Res Commun. 2012 419:7-13. 査読有

2. Sakaidani Y, Ichiyangi N, Saito C, Nomura T, Ito M, Nishio Y, Nadano D, Matsuda T, Furukawa K, Okajima T.

O-linked-N-acetylglucosamine modification of mammalian Notch receptors by an atypical

O-GlcNAc transferase Eogt1. *Biochem Biophys Res Commun.* 421:329-334. 2012 (2012) 査読有

3. Sakaidani Y, Nomura T, Matsuura A, Ito M, Suzuki E, Murakami K, Nadano D, Matsuda T, Furukawa K, Okajima T.

O-linked-N-acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interactions.

*Nature Commun.* 2:583 (2011) 査読有

4. 岡島 徹也 上皮成長因子ドメインを修飾する特異的 O-結合型糖鎖 生化学 83 813-821 (2011) 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. Tetsuya Okajima: Biochemical and biological analysis of O-GlcNAc modification of extracellular proteins. Glycobiology Gordon Research Conference 2013 年 3 月 6 日 (米国 Ventura)

2. 中倉真之、堺谷祐太、大海雄介、近藤裕史、西尾洋介、増田達也、八木宏和、加藤晃一、古川鋼一、岡島徹也 マウス O-GlcNAc 転移酵素遺伝子 Eogt1 のクローニングと遺伝子欠損マウス。第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 16 日 (博多)

3. Tetsuya Okajima: O-GlcNAc modification of EGF-like domains by a novel O-GlcNAc transferases, EGOT. Commemorative Symposium on the 20<sup>th</sup> Anniversary of the Mizutani Foundation for Glycoscience 2012 年 11 月 28 日 (東京)

4. 松本康之、章 青、浜村和紀、秋田 薫、中田 博、土田明子、岡島徹也、古川圭子、浦野健、古川鋼一 trimeric Tn 抗原による癌転移能亢進の分子メカニズムの解明。第 31 回日本糖質学会年会 2012 年 9 月 20 日 (鹿児島)

5. 岡島徹也、中倉真之、堺谷祐太、大海雄介、近藤裕史、西尾洋介、増田達也、八木宏和、加藤晃一、古川鋼一 新規 O-GlcNAc 転移酵素遺伝子 Eogt のクローニングと機能解析 第 31 回日本糖質学会年会 2012 年 9 月 20 日 (鹿児島)

6. 堺谷祐太、野村朋子、松浦愛子、伊藤麻紀子、鈴木えみ子、村上耕介、灘野大太、松田 幹、古川鋼一、岡島徹也 新規 O-GlcNAc 転移酵素遺伝子の基質認識と生理学的役割。第 31 回日本糖質学会年会 2012 年 9 月 19 日 (鹿児島)

7. 中倉真之、堺谷祐太、大海雄介、近藤裕史、西尾洋介、増田達也、八木宏和、加藤晃一、古川鋼一、岡島徹也 マウス O-GlcNAc 転移酵素遺伝子 Eogt のクローニングと遺伝子欠損マウスの作製。糖鎖科学中部拠点 第 10 回「若手の力」フォーラム 2012 年 9 月 6 日 (静岡)

8. Tetsuya Okajima, Masayuki Nakakura, Yuji Kondo, Yuta Sakaidani, Koichi Furukawa. Roles of a novel post-translational modification specific for epidermal growth factor domains. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 16 日 (横浜)

9. 堺谷祐太、野村朋子、松浦愛子、伊藤麻紀子、鈴木えみ子、村上耕介、灘野大太、松田 幹、古川鋼一、岡島徹也 O-GlcNAc on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interaction. 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 22 日 (京都)

10. Yuta Sakaidani, Tomoko Nomura, Aiko Matsuura, Makiko Ito, Emiko Suzuki, Kosuke Murakami, Daita Nadano, Tsukasa Matsuda, Koichi Furukawa, Tetsuya Okajima: O-GlcNAc on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interaction. 第 75 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム 2011 年 5 月 28 日 (静岡)

[その他]

ホームページ:

<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