

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291020

研究課題名(和文)細胞外O-GlcNAc修飾のNotchシグナルと血管形成における役割

研究課題名(英文)Roles of extracellular O-GlcNAc on Notch signaling and vascular development

研究代表者

岡島 徹也 (OKAJIMA, Tetsuya)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20420383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：Notch受容体の細胞外領域に存在する上皮成長因子(EGF)様リピートには特徴的な翻訳後修飾が存在している。これまでの研究で、O-フコースとO-グルコースに加えて、O-GlcNAc修飾が存在することを報告した。しかしながら、O-GlcNAc修飾のNotch受容体における役割は不明であった。本研究では、O-GlcNAc修飾に関わる糖転移酵素EOGTの遺伝子欠損マウスを作製し、表現型解析を行なった。その結果、Notch1の特定のEGFドメインのO-GlcNAc修飾が、Delta-like 4リガンドを介したNotch1の活性化を制御することで、網膜の血管形成に関与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Notch receptors are modified with unique post-translational modifications on epidermal growth (EGF)-like repeats at the extracellular domains. Previous studies revealed that besides O-fucose and O-glucose O-GlcNAc modification occurs on EGF repeats. However, biological function of O-GlcNAc on Notch receptors remained unknown. In this study, EOGT, a glycosyltransferase catalyzing O-GlcNAc modification of EGF domains, is inactivated in mice and phenotypical analyses were performed. Results revealed that specific EGF domains of Notch1 are modified with O-GlcNAc, which regulated DLL4-mediated Notch1 activation and thus Notch-dependent vascular development in the retina.

研究分野：生化学

キーワード：Notch EOGT O-GlcNAc 血管形成 マウス

## 1. 研究開始当初の背景

糖鎖修飾はタンパク質機能を制御する翻訳後修飾の代表例であり、細胞外や細胞表面に存在する多彩なタンパク質の機能を統合的に制御することで、細胞機能の発現や維持に重要な役割を果たしている。一方、特定のタンパク質やタンパク質ドメインのみを修飾する特殊糖鎖が、血液凝固因子などの血漿タンパク質の一次構造決定の過程で見出されていた。最近になって、Notch 受容体などのシグナル伝達に関わる分子にも同様な特殊糖鎖構造が存在すること、そして、重要な生理機能を有すること、すなわち、発生過程における Notch シグナルの制御やヒトの遺伝性疾患の原因となることが研究代表者を含めた国内外の研究グループにより明らかにされてきた。これらの研究を通じて、タンパク質ドメイン特異的糖鎖には、特定のタンパク質の機能制御に関わる重要な役割があり、生体機能に密接に関連することが考えられた。

Notch 受容体の上皮成長因子 (EGF) リポートに特有な糖鎖構造として、O-フコース型、O-グルコース型糖鎖が知られている。我々はこれらの従来型の O 型糖鎖を検出する過程で、偶然にも、新規の糖修飾である O-GlcNAc を同定した。従来、O-GlcNAc 修飾は、細胞内タンパク質に特有の糖鎖修飾として細胞内機能の制御に関わるものとして位置づけられていた。そのため、細胞外での O-GlcNAc の存在は想定されておらず、我々の発見は糖鎖生物学の分野において前提を覆す重要な知見を提示するものとなった。

細胞での O-GlcNAc 修飾には、OGT と呼ばれる酵素が働くことが知られていた。しかしながら、分泌経路で生じることが推定される細胞外の O-GlcNAc 修飾に OGT が関与するとは物理的に考えにくい。そこで、機能未知の糖転移酵素のスクリーニングにより、新規翻訳後修飾に関わる糖転移酵素

をスクリーニングした結果、小胞体に局在する新規 O-GlcNAc 転移酵素 EOGT の同定に成功した。EOGT は OGT と同様に UDP-GlcNAc を基質とするものの、OGT 非依存的に Notch 受容体などの EGF ドメイン特異的に GlcNAc 修飾することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、新規翻訳後修飾として細胞外 O-GlcNAc 修飾の存在を発見し、EOGT を介した新規の O-GlcNAc 修飾機構を解明した (*Nature Commun.* 2011; *BBRC* 2012)。一方で、哺乳動物では、EOGT は Notch 受容体を糖修飾するが、生理機能は未だに不明である。今年になり、EOGT の遺伝子変異が四肢末端と頭頂部に異常を伴う病因不明の Adams-Oliver 症候群において同定された。本研究では、ヒトの表現型を手がかりにして、Eogt 欠損マウスを用いた網膜血管の表現型解析や遺伝学的相互作用解析、そして、レポーターアッセイや相互作用解析などにより、細胞外 O-GlcNAc 修飾の Notch シグナルと血管形成における生物学的機能を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

Eogt の発現解析には、アンチセンスプローブを用いた in situ hybridization を行なった。コントロールとしてセンスプローブ、もしくは、Eogt 変異マウス由来のサンプルを用いた。血管内皮マーカーとしては、アイソレクチン B4 (IB4) を用いた。

Eogt を発現する血管の細胞種を特定する為に、血管を多く含む肺組織からコラゲナーゼ・ディスペラーゼ処理、そして CD31 抗体と CD102 抗体により、血管内皮細胞を単離した。

Eogt 発現を血管内皮から除くには、Eogt foxed と Tie2-Cre マウスを交配し、Tie2-Cre; Eogt<sup>fllox/fllox</sup> マウスを血管内皮特異的 Eogt 欠損マウスとして用いた。

網膜血管における Eogt の表現型の解析には、IB4 染色にて血管を検出し、Vascular Front を形成する tip 細胞やフィロポディア数、血管分岐数、血管占有率、血管長に

ついて定量した。血管分岐数の測定にはソフトウェア AngioTool を使用した。Pericyte の血管内皮細胞の共局在(カバー率)については NG2 抗体を用いた染色により解析を行なった。

遺伝学的相互作用の解析には、*Notch1* や *Rbpj* の変異マウスを使用した。また、Notch シグナル関連遺伝子発現の確認には、real-time PCR 法を用いた。

リガンド結合実験には、D114-Fc や Jagged1-Fc を Dynabeads に結合させ、リガンド結合ビーズを作成した。このビーズを *Notch1* 発現細胞に加え、結合したビーズ数を定量することで、リガンド結合能を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) *EOGT* の発現様式

*Eogt* 変異マウスの網膜血管形成の異常が認められた為、生後5日目(P5)と15日目(P15)の網膜の in situ hybridization により、*Eogt* の発現様式を検討した。その結果、IB4 と一致する染色像が得られたことから、血管内皮細胞への発現が示唆された。このことを確認するために、血管内皮特異的 *Eogt* 変異マウスを用いて in situ hybridization を行なった結果、染色像が失われた。以上の結果より、*Eogt* の血管内皮への発現が明らかになった(図1)。

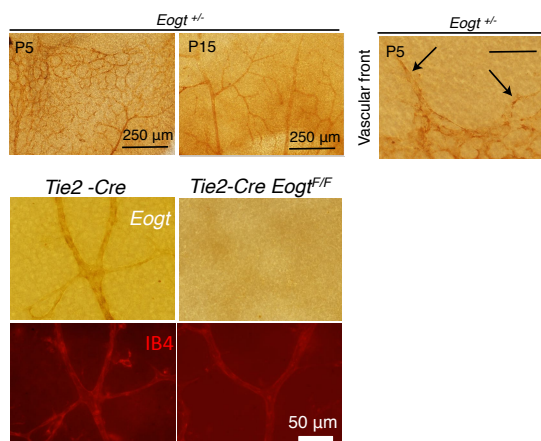


図1 P5 と P15 網膜を用いた in situ hybridization による *Eogt* 発現解析

##### (2) *Eogt* 変異マウスの表現型

*Eogt* 変異体の網膜血管の解析の結果、tip

細胞については顕著な違いは認めなかったが、フィロポディア数と血管分岐数の増加、血管占有率の上昇、血管長の低下が認められた。これらの表現型は、Notch シグナルを構成する *Notch1* や *Rbpj* のヘテロ変異体の表現型に類似していた。同様な表現型が血管内皮特異的 *Eogt* 変異マウスにおいても確認された。一方、NG2 による血管内皮のカバー率には変化は認められなかった。これらの結果より、*Eogt* の血管内皮での機能が網膜における血管新生に重要であることが示唆された(図2)。

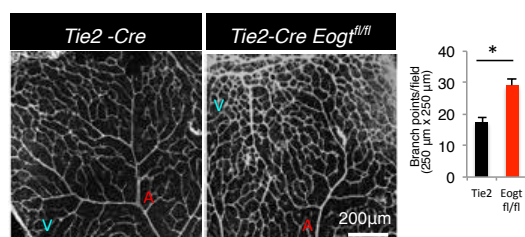


図2 血管内皮特異的 *Eogt* 変異マウスの表現型

##### (3) *Eogt* 欠損マウスにおける Notch シグナル関連分子の発現

網膜血管では、Pericyte における *Notch3* や、血管内皮における *Jagged1*, *D114*, *Notch1* が、Notch シグナルを介した正常な血管形成に重要な役割を果たすと報告されている。また Notch シグナル分子のいくつかは、Notch シグナルによって発現レベルが制御される。*EOGT* の Notch シグナル制御への関与を解析にするために、*Eogt* 変異体の脳と肺より血管内皮細胞を単離し、遺伝子発現を検討した結果、脳血管内皮では、*Notch1*、*Notch3*、*Jagged1*、*D114* の内、*D114* の発現レベルの減少が認められた。同様に、肺血管内皮においても、*D114* の発現が減少していた。また、Notch シグナルの標的遺伝子である *Hes1*、*Hey1* の遺伝子発現も低下していた。以上の結果より、*Eogt* 変異マウスでは、*D114* の発現低下による Notch シグナルの低下が考えられた。

#### (4) *Eogt* 欠損マウスにおける Notch シグナル低下の分子機序

*EOGT* が Notch 受容体とリガンドの細胞表面への発現に関与するか検討するために、遺伝子編集技術を用いて、HEK293T 細胞から *EOGT* 欠損細胞を作成した。*EOGT* 欠損細胞に Notch1 もしくは DLL4 や JAGGED1 を発現させ、FACS にて細胞表面の発現量を測定したところ、野生型細胞と変異細胞では、細胞膜での発現量に違いは認められなかった。

一方、DLL4 と JAGGED1 を用いたリガンド結合実験から、*EOGT* 欠損細胞では、DLL4 との結合能が低下するのに対して、JAGGED1 との結合能が保たれていることが明らかになった。これらの結果より、*EOGT* による O-GlcNAc 修飾は DLL4 と NOTCH1 との相互作用に必要であることが明らかになった(図3)。

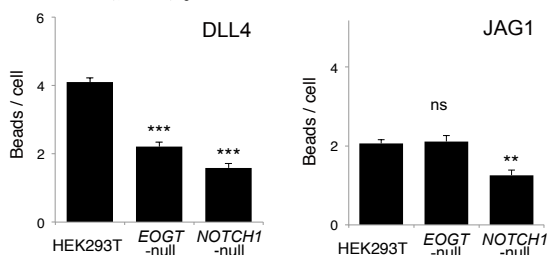


図3 *EOGT* 欠損細胞では、DLL4 との相互作用が低下する。

#### (5) Notch1 における *EOGT* の作用部位の決定

Notch1 の O-GlcNAc 作用部位を特定するために、修飾部位のアラニン置換を行い、CTD110.6 交代を用いて O-GlcNAc 修飾部位の決定を試みた。その結果、Notch1EGF リピートの 2 番目、10 番目、17 番目、20 番目のアラニン置換変異体 ( $\Delta 4x$  変異体) において、CTD110.6 の反応性が失われた。さらに  $\Delta 4x$  変異体を用いて、リガンドとの結合能を検討したところ、DLL4 との結合性が失われ、JAGGED1 との結合性には影響が認められなかった。以上から、Notch1 の O-GlcNAc 修飾が DLL4 と NOTCH1 の物理的相互作用に関与することが明らかにな

った(図4)。

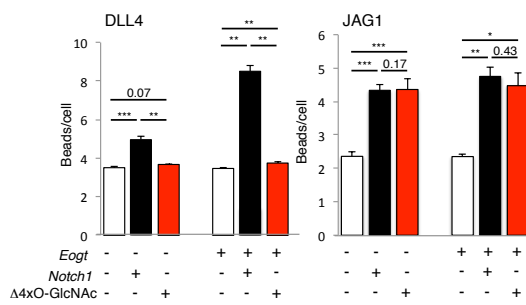


図4 NOTCH1  $\Delta 4x$  変異体では、DLL4 との相互作用が低下する。

#### 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 5 件)

1) Sawaguchi S, Ogawa M, Okajima T. Protocol for Notch-ligand Binding Assays Using Dynabeads. *Bio-protocol* 7: e2582(2017) doi: 10.21769/BioProtoc.2582 査読有

2) Sawaguchi S, Varshney S, Ogawa M, Sakaidani Y, Yagi H, Takeshita K, Murohara T, Kato K, Sundaram S, Stanley P and Okajima T. O-GlcNAc on NOTCH1 EGF Repeats Regulates Ligand-Induced Notch Signaling and Vascular Development in Mammals. *eLife* 6: e24419. (2017) doi: 10.7554/eLife.24419 査読有

3) Kaneko K, Ohkawa Y, Hashimoto N, Ohmi Y, Kotani N, Honke K, Ogawa M, Okajima T, Furukawa K, Furukawa K. Neogenin defined as a GD3-associated molecule by enzyme-mediated activation of radical sources confers malignant properties via intra-cytoplasmic domain in melanoma cells. *J Biol Chem*. 291, 16630-16643 (2016) 査読有

4) Ogawa M, Sawaguchi S, Kamemura K, Okajima T. Intracellular and extracellular O-linked N-acetylglucosamine in the nervous system. *Exp. Neurol*. 274:166-174 (2015) 査読有

5) Ogawa M, Sawaguchi S, Furukawa K, Okajima T. N-acetylglucosamine modification in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj*. 1850:1319-1324 (2015) 査読有

6) Ogawa M, Furukawa K, Okajima T. Extracellular O-linked beta-N-acetylglucosamine: Its biology and relationship to human disease. *World J Biol Chem* 5:224-230 (2014) 査読有

[学会発表] (計 15 件)

1. 小川 光貴、古川 鋼一、岡島 徹也. 新しい細胞外 O-GlcNAc 修飾の分子機能 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年
  2. 平泉 光佑、澤口 翔伍、岡島 徹也. 脳血管内皮細胞分化における Notch 受容体 O-GlcNAc 修飾の役割 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年
  3. 澤口 翔伍、小川 光貴、矢木 宏和、加藤 晃一、岡島 徹也. 細胞外 O-GlcNAc の修飾に関わる EOGT 変異マウスの表現型解析 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年
  4. 張 璞、大川 裕樹、加藤 彰、小峯 起、百田 洋之、Robiul Bhuiyan、大海 雄介、古川 圭子、若林 俊彦、岡島 徹也、山中 宏二、古川 鋼一 ガングリオシド GD3 によるグリオーマの腫瘍微小環境の制御機構 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年
  5. 澤口翔伍, 小川光貴, 矢木宏和, 加藤晃一, 岡島徹也. Extracellular O-GlcNAc regulates Delta-like 4 mediated Notch signaling and vascular development in mammals. 第 89 回日本生化学会大会 2016 年
  6. Mitsutaka Ogawa, Shogo Sawaguchi, Pawel Bieniasz-Krzywiec, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Jiro Usukura, Koichi Furukawa, Tetsuya Okajima. Biological roles of extracellular O-GlcNAc in Notch signaling, vascular development, and blood retinal barrier maintenance 生化学会中部支部例会シンポジウム 2015 年 05 月 25 日 信州大学 (長野県松本市)
  7. Mitsutaka Ogawa, Shogo Sawaguchi, Pawel Bieniasz-Krzywiec, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Jiro Usukura, Koichi Furukawa, Tetsuya Okajima. Biological roles of extracellular O-GlcNAc in Notch signaling, vascular development, and blood brain barrier maintenance. 第 38 回日本神経科学大会 2015 年 07 月 28 日~31 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
  8. 小川光貴、澤口翔伍、Bieniasz-krzywiec Pawl, 矢木宏和、加藤晃一、臼倉治郎、古川鋼一、岡島徹也. Extracellular O-GlcNAc modification regulates Notch signaling and blood retina barrier maintenance. BMB2015 2015 年 12 月 01 日~04 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
  9. Mitsutaka Ogawa, Pawel Bieniasz-Krzywiec, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Jiro Usukura, Koichi Furukawa, Tetsuya Okajima. Analysis of the biological roles of extracellular O-GlcNAc using EOGT-deficient mice. Society for Glycobiology 2015 Annual Meeting. 2015 年 12 月 01 日~04 日. サンフランシスコ (アメリカ)
  10. Shogo Sawaguchi, Mitsutaka Ogawa, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Jiro Usukura, Koichi Furukawa, and Tetsuya Okajima. Phenotypic analysis of mice mutant for EOGT involved in extracellular O-GlcNAc modification. BMB2015 2015 年 12 月 01 日~04 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
  11. 岡島徹也、澤口翔伍、古川鋼一、小川光貴 細胞外 O-GlcNAc: 生物学と疾患との関連 BMB2015 2015 年 12 月 01 日~04 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
  12. Ogawa M, Bieniasz-Krzywiec P, Yagi H, Kato K, Usukura J, Furukawa K, Okajima T. Role of extracellular O-GlcNAc in Notch signaling, retinal vascular development, and blood brain barrier function. SFG & JSCR 2014 Joint Annual Meeting - Satellite II: Glycans in Neuroscience. 2014 年 11 月 16 日 Honolulu, USA
  13. Ogawa M, Kawai T, Nadano D, Matsuda T, Yagi H, Kato K, Furukawa K, Okajima T. Impaired O-GlcNAc Modification in the Endoplasmic Reticulum by Mutated EOGT Associated with Adams-Oliver Syndrome. SFG & JSCR 2014 Joint Annual Meeting. 2014 年 11 月 16 日~ 19 日 Honolulu, USA
  14. 小川光貴, 河合崇生, 灘野大太, 松田幹, 矢木宏和, 加藤晃一, 古川鋼一, 岡島徹也. アダムズ-オリバー症候群に関連する EOGT 遺伝子変異は ER 型 O-GlcNAc 修飾の欠損を引き起こす 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日~27 日 パシフィコ横浜 (横浜)
  15. 岡島 徹也、小川 光貴、古川 鋼一. O-GlcNAcylation in the endoplasmic reticulum. 第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 15 日~18 日 京都国際会議場 (京都)
- [図書] (計 1 件)
- 1) 谷口直之、顧 建国、中田 博、岡島徹也、古川鋼一、小川光貴、秋元義弘、木 下タロウ、北川裕之、菅原一幸、山本一夫、山田修平、宮城妙子 北島 健、木 全弘治、松野健治、岡 昌吾、深瀬浩一、門松健治、川島博人、鈴木 匡、加藤 晃一 宮本寛子ら エヌ・ティー・エス 糖鎖の新機能開発・応用ハンドブッカー創薬・医療から食品開発まで

(2015) 678 (23-26)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical\\_J/laboratory/basic-med/bio-chem/mol-cellular/](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/laboratory/basic-med/bio-chem/mol-cellular/)

## 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・教授

研究者番号：20420383

### (2) 研究分担者

竹下 享典 (TAKESHITA Kyouusuke)

名古屋大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：70444403

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )