

細胞外 O-GlcNAc による Notch シグナル制御

名古屋大学大学院 医学系研究科
附属神経疾患・腫瘍分子医学研究センター
岡島 徹也

1. はじめに

タンパク質の糖鎖付加は、細胞外に存在するほぼ全ての蛋白質に見出される主要な翻訳後修飾である。多くの場合、糖鎖はタンパク質機能を制御するなど、正しいタンパク質の機能発現に重要な働きをしている。糖鎖付加の中でも、一般的なタンパク質糖鎖修飾とは異なる特徴的な修飾として、Notch受容体の糖鎖修飾があり、Notchシグナルの制御に関与している。

Notchシグナルは、多彩な細胞運命の決定プロセスに関与し、その異常は先天性疾患や腫瘍性疾患に関与する。Notch受容体の細胞外領域には多数の上皮成長因子(EGF)ドメインが存在するが、他のタンパク質には見受けられない、特有の構造を呈するO-結合型糖鎖修飾が、EGFドメインの特定の部位に存在する。これらの糖鎖修飾は、Notch受容体とリガンド間の相互作用の制御に関わることから、Notchシグナルの制御機構の中心的なメカニズムの1つである。

我々は、最近、EGFドメイン上に新規翻訳後修飾である細胞外O-GlcNAc修飾を発見し、新奇O-GlcNAc転移酵素EOGTによるNotch受容体のO-GlcNAc修飾機構を解明した。細胞外O-GlcNAcの疾患との関連性は不明であったが、最近、四肢末端と頭頂部に異常を生じるAdams-Oliver症候群の原因遺伝子の1つとしてEOGTが報告された。EOGT以外にも、RBPJ、ARHGAP31、DOCK6の遺伝子変異が報告されている。また、予備実験よりAdams-Oliver症候群に関連したEogt変異はNotch受容体のO-GlcNAcレベルを低下させることを見いだした。そこで、EOGTによるNotch受容体の細胞外領域のO-GlcNAc修飾が、RBPJを介したNotchシグナルの活性化に必要であるか、もしくは、ARHGAP31やDOCK6に依存したアクチン細胞骨格の機能調節に関与すると考えた。本研究では、Eogt欠損マウスを用いて細胞外O-GlcNAcのNotch受容体における新たな役割を明らかとするとともに、Adams-Oliver症候群の分子病態の解明を目指した。

Adams-Oliver症候群の分子病態は不明であるが、出産前の血管形成不全による人体の末端構造(即ち、手足の先端や頭頂部)の異常と考えられている。実際に、我々の予備研究でも、Eogt欠損マウスにおいて、脳動脈の異常が認められ、血管異常が示唆された。Notchシグナルは、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の分化に重要な役割を果たすので、これらの細胞を中心にして、EOGTのNotch受容体と血管形成における役割について、以下の解析を行なうことを計画した。

2. 方法

① Eogt 変異マウスの血管異常の解析

Eogtの血管形成における役割を明確にするために、マウス網膜血管を用いた。マウスの網膜血管における血管形成をIsolectin B4や α -Smooth muscle actin (α -SMA)などの、血管内皮やpericyte (mural cell)のマーカーを用いて表現型を解析した。

② Notch シグナルの構成因子との遺伝学的相互作用

上記の実験で観察された表現型が、Notchシグナルに依存するか判断するために、Notchシグナルを構成する主要なコンポーネントとの遺伝学的相互作用を解析した。Eogt欠損マウスは正常に発育するため、Notch 1とRBPJを中心に、Eogt^{-/-} Notch1^{+/+}やEogt^{-/-} RBPJ^{+/+}の表現型が、Eogt^{-/-}、Notch1^{+/+}もしくはRBPJ^{+/+}のパプロ不全の表現型と比較した際の、相乗効果の有無について解析した。

③ Eogt による Notch シグナル制御の分子基盤

血管形成における Notch シグナルは、血管内皮や血管平滑筋の細胞分化において重要な役割を果たす。*Eogt* が血管内皮もしくは血管平滑筋のどちらかで機能するか区別するために、*flox* マウスを用いて、コンディショナルに遺伝子破壊をした際の、表現型の有無を明らかにすることを目指した。また、Notch シグナルを反映する血管内皮のマーカーとして *Dll4* を、血管平滑筋のマーカーとして *Jagged1* と *Notch3* の発現変化を解析した。

④ O-GlcNAc による Notch シグナル制御の分子機構

Notch 受容体のリガンドは、Notch 受容体と同様に、細胞外ドメインに EGF リピートを有しており、O-GlcNAc による修飾を受けることができる。そこで、O-GlcNAc がリガンドのシグナルを送る能力、もしくは、受容体のシグナルを受け取る能力に必要なのか区別するために、第1に *in vitro* における Notch シグナルのレポーター解析、第2に Notch 受容体の膜提示やプロセッシング(S1, S2, S3 切断)、最後に *in vitro* 結合実験によるリガンド・受容体相互作用の解析を試みた。

3. 結果 研究成果

① Eogt 変異マウスの血管異常の解析

各発生段階におけるマウス網膜血管の形態を *isolectin B4* による whole mount immunostaining を行なった。網膜表層の血管形成は生後1週間間に完成するが、血管形成のスピード (vascular progression) や密度 (vascular front density) には大きな変化は認められなかった。一方、生後15日 (P15) の *EOGT* 変異マウスでは、 α -SMA 陽性の血管平滑筋のマイルドな形態異常が認められた。以上の結果より、*EOGT* はマウス網膜血管における動脈分化において重要な役割を果たす可能性が示唆された。

② Notch シグナルの構成因子との遺伝学的相互作用

Eogt 変異マウスと *Notch1*、*RBPJ* 変異マウスと交配し、*Notch1*^{+/+}*Eogt*^{-/-}マウスと *RBPJ*^{+/+}*Eogt*^{-/-}マウスを得ることに成功した。*Notch1*^{+/+}*Eogt*^{-/-}マウスの網膜血管の whole mount immunostaining を行なった結果、vascular progression には大きな変化が認められなかったが、vascular front density の顕著な上昇を認めた。また、Pericyte における α -SMA の発現レベルの低下も認められた。さらに、P15 の *Notch1*^{+/+}*Eogt*^{-/-}マウスでは、 α -SMA 陽性の血管平滑筋の著名な形態異常が認められた。また、予備的な研究結果ではあるが、網膜のみならず脳毛細血管においても、*Notch1*^{+/+}*Eogt*^{-/-}マウスにおいては、顕著な血管密度の上昇が観察された。これらの異常は、*Eogt*^{-/-}マウス、*Notch1*^{+/+}*Eogt*^{-/-}マウスにおいては明確ではないことから、*Eogt* と *Notch1* は網膜血管形成において、遺伝学的に相互作用をすることが明らかになった。

RBPJ^{+/+}*Eogt*^{-/-}マウスについても、同様な解析を行なったが、*Notch1*^{+/+}*Eogt*^{-/-}マウスの様な顕著な表現型は認められなかった。その理由の1つとして、*Notch1* は *Eogt* の直接的な基質であるが、*RBPJ* については Notch シグナルの下流に位置するため、表現型に必ずしも相乗効果が現れない可能性が考えられた。*RBPJ* と *Eogt* の遺伝学的相互作用の有無については、より詳細な解析が必要であると考えられた。

これら一連の研究結果より、*Eogt* は網膜血管形成において *Notch1* シグナルに関与することが明らかになった。

③ Eogt による Notch シグナル制御の分子基盤

血管内皮特異的な *Eogt* 欠損マウスの作成のためには *Tie2-Cre* マウスを、一方、Pericyte 特異的な *Eogt* 欠損マウスの作成については *NG2-Cre* マウスを用いて、*Eogt* floxed マウスと交配を行なった。現段階では、最終的な遺伝型のマウス (*Tie2-Cre*; *Eogt*^{floxed/floxed} や *NG2-Cre*; *Eogt*^{floxed/floxed}) における *Eogt* の表現型の解析を行なう段階には至らなかった。そこで、*Eogt* 変異マウスの Notch シグナルマーカー分子の発現解析を先行させた。その結果、P7 マウスの網膜血管において、動脈分化に関わる *Dll4* の発現が減少傾向にあった。一方、血管平滑筋における *Jagged1* や *Notch3* の発現に関しては、明瞭な異常が認められなかった。以上の結果より、*EOGT* はマウス網膜血管の血管内皮細胞における *Dll4*-Notch シグナルを介した動脈分化において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

④O-GlcNAcによるNotchシグナル制御の分子機構

Eogt 変異マウスの肺のタンパク質抽出液を用いて、Notch1 抗体並びに Cleaved Notch1 抗体を用いたイミュノブロット解析を行なった。しかしながら、野生型と比べて、Notch1 のプロセッシングの変化に大きな違いは認められなかった。また、リガンド刺激として、Dll1-Fc と Jagged-Fc を用いて、HEK293T 細胞もしくは EOGT 発現細胞と反応させ、Notch シグナルのレポーター解析とリガンド結合実験を行なった。この場合も、*Eogt* 有無に関わらず、Notch シグナルの変化やリガンド結合能の明確な変化は認められなかった。これらの結果より、Dll1 や Jagged1 を介した Notch シグナルにおける *Eogt* の寄与は、今回用いたアッセイ系の検出可能範囲外であると考えられた。

4. 考察 まとめ

以上の結果より、Notchシグナルを介した網膜の血管形成において、*Eogt*によるO-GlcNAc修飾が、Dll4依存的な動脈分化に関与することが示唆された。また、*Eogt*のNotchシグナルへの関与は、血管形成などの特定の生物学的プロセスに限定的である可能性が示唆された。O-GlcNAcによるNotchシグナル制御の分子機構に関しては、現段階で手がかりが得られておらず、Dll4を含めた包括的なリガンド・受容体ペアを介したNotchシグナルにおける*Eogt*の関与の有無について、解析を続ける必要がある。

5. 発表論文、参考文献

A. Matsuura, M. Ito, Y. Sakaidani, T. Kondo, K. Murakami, K. Furukawa, D. Nadano, T. Matsuda, T. Okajima, O-linked N-acetylglucosamine is present on the extracellular domain of notch receptors, *J Biol Chem*, 283 (2008) 35486-35495.

Y. Sakaidani, T. Nomura, A. Matsuura, M. Ito, E. Suzuki, K. Murakami, D. Nadano, T. Matsuda, K. Furukawa, T. Okajima, O-linked-N-acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interactions, *Nat Commun*, 2 (2011) 583.

Y. Sakaidani, N. Ichiyanagi, C. Saito, T. Nomura, M. Ito, Y. Nishio, D. Nadano, T. Matsuda, K. Furukawa, T. Okajima, O-linked-N-acetylglucosamine modification of mammalian Notch receptors by an atypical O-GlcNAc transferase *Eogt1*, *Biochem Biophys Res Commun*, 419 (2012) 14-19.

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

M. Ogawa, S. Sawaguchi, T. Kawai, D. Nadano, T. Matsuda, H. Yagi, K. Kato, K. Furukawa, T. Okajima, Impaired O-linked N-acetylglucosaminylation in the endoplasmic reticulum by mutated EGF domain-specific O-linked N-acetylglucosamine transferase found in Adams-Oliver syndrome, *J Biol Chem*, in press.