

Notch 受容体上の O 結合型糖鎖と先天性疾患

小川 光貴, 岡島 徹也

Notch シグナルは、細胞間相互作用をつかさどるシグナル伝達経路の一つで、細胞の運命決定に重要な役割を持つ。Notch シグナルの破綻は先天性疾患だけではなく、悪性腫瘍の悪性化など多くの疾患に関連することが知られており、Notch シグナルの制御機序を理解することは、我々にとって急務な課題である。ところで、Notch 受容体とリガンドとの結合性、あるいは、Notch 受容体自身の細胞膜への輸送は O 型糖鎖やその糖転移酵素によって制御されていることがわかってきた。生体内の数多くのタンパク質が糖鎖修飾を受けるが、これほど糖鎖によってタンパク質の機能が制御されている分子も珍しい。そこで本稿では、Notch 受容体の O 型糖鎖による Notch シグナルの制御機序とその破綻が引き起こす先天性疾患、特に、最近発見された細胞外 O-GlcNAc 修飾について紹介したい。

1. はじめに

Hart のグループが O 結合型 N-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) 修飾を発見した 1984 年から 2008 年に至るまで、O-GlcNAc 修飾は細胞内にも存在していると長らく信じられていた¹⁾。細胞内の O-GlcNAc 修飾は、細胞質や核、ミトコンドリアに局在する O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) により修飾されており、現在までに 1000 種類を超える細胞内 O-GlcNAc 修飾タンパク質が同定されている²⁾。その機能は O-GlcNAc 修飾を受けるタンパク質によって異なるが、主に O-GlcNAc 修飾部位とリン酸化部位が協調・拮抗関係にあり、シグナル伝達経路などに関与していることが数多くのグループから報告されている^{3,4)}。しかし、他の糖転移酵素と異なり OGT は小胞体やゴルジ体に局在しないことから、膜タンパク質や分泌タンパク質は O-GlcNAc 修飾を受けない。ただし、膜タンパク質の細胞質ドメインは OGT により O-GlcNAc 修飾を受ける^{5,6)}。これらの背景から、O-GlcNAc 修飾は細胞内にも存在していると信じられていた。

しかしながら、我々は 2008 年に Notch 受容体上の細胞外ドメインに O-GlcNAc 修飾が生じていることを報告した⁷⁾。この Notch 受容体上に生じる O-GlcNAc 修飾を細胞外 O-GlcNAc 修飾と呼び、OGT で修飾される O-GlcNAc 修飾と区別している。これまでに我々は細胞外 O-GlcNAc 修飾の転移酵素 EOGT を同定し、さらに、先天性疾患で発見された EOGT 遺伝子変異体の分子機能解析や *Eogt* 欠損マウスの解析を行ってきた⁸⁻¹⁰⁾。本稿では、EOGT 異常と先天性疾患の関わりを中心に最新の知見を紹介したい。

2. Notch 受容体上の O 結合型糖鎖

Notch 受容体は、細胞間コミュニケーションをつかさどる主要なシグナル伝達経路であり、多彩な細胞運命の決定プロセスに関与している¹¹⁾。Notch 受容体は細胞外ドメインに 36 個の連続した上皮成長因子 (EGF) ドメインを有し、EGF ドメインに特有な O 結合型糖鎖修飾を受ける (図 1)。それぞれの EGF には 6 個のシステイン残基が存在し、これらが S-S 結合を形成することにより立体構造が保持されている。細胞外 O-GlcNAc が発見される以前には、Notch 受容体上の糖鎖修飾は O-フコース (O-Fuc) と O-グルコース (O-Glc) が知られており、O-フコースは 1975 年に、O-グルコースは 1988 年に発見されている^{12,13)}。O-フコースと O-グルコースについてはこちらの総説を参照していただきたいが¹⁴⁾、図 1 に示したようにこれらの O 結合型糖鎖修飾はさらに伸長し、最終的には四糖構造 (O-Fuc-GlcNAc-Gal-Sia) や三糖構造 (O-Glc-Xyl-Xly) となる。

名古屋大学大学院医学系研究科生物化学講座分子細胞化学分野
(〒466-8550 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65)

O-glycosylation on Notch receptors and congenital diseases

Mitsutaka Ogawa and Tetsuya Okajima (Dept. of Molecular Biochemistry, Nagoya University School of Medicine, 65 Tsurumai Nagoya, Aichi 466-8550 Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890613

© 2017 公益社団法人日本生化学会

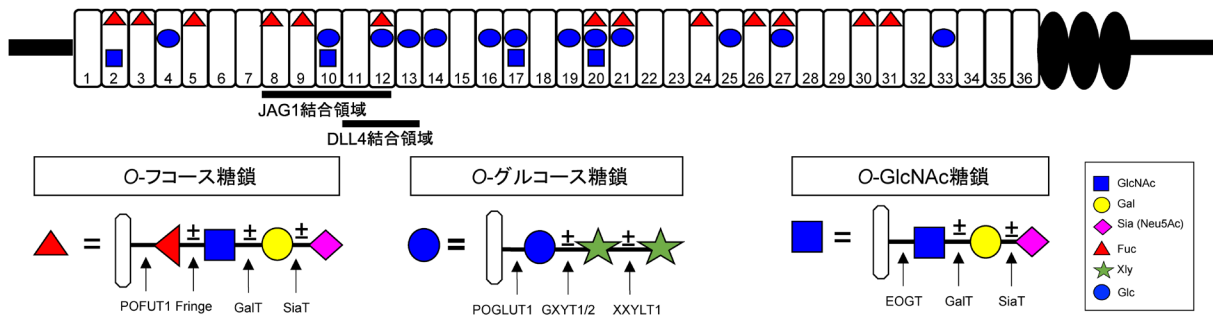


図1 NOTCH1 受容体上のドメイン構造とO結合型糖鎖

NOTCH1 受容体の細胞外ドメインには、1~36個の上皮増殖因子 (EGF) 様の繰り返し構造が存在する。NOTCH のリガンドであるJAG1はNOTCH1 受容体EGFドメインのEGF8~12の領域に結合する。また、NOTCHのリガンドであるDLL4はNOTCH1 受容体EGFドメインのEGF11~13の領域に結合する。EGFリピートには、NOTCH受容体に特異的な3種類のO結合型糖鎖が存在する。O-フコース糖鎖 (赤色の三角) とO-グルコース糖鎖 (青色の丸)、O-GlcNAc (青色の四角) である。これらのO結合型糖鎖は、さらに伸長し、O-フコースは四糖構造 (O-Fuc-GlcNAc-Gal-Sia)、O-グルコース (O-Glc-Xly-Xly) とO-GlcNAc (O-GlcNAc-Gal-Sia) は三糖構造を形成する。これらの糖転移酵素反応は、それぞれ特有の糖転移酵素によって触媒される。

これらのO結合型糖鎖修飾はNotch受容体の分子機能を精密に制御しており、O結合型糖鎖修飾がNotchシグナルを介してさまざまな生命現象に重要であることがわかってきた。

3. 細胞外O-GlcNAc修飾の発見

筆者らは当初、EGFドメインにおけるO-フコースとO-グルコースの関係性を解析するために、ショウジョウバエ由来のS2細胞にNotch1受容体の20番目のEGFドメイン (EGF20) を発現させて、質量分析装置にて解析を進めていた⁷⁾。O-フコースやO-グルコース由来のピークはもちろん観察できていたが、+204Daの未知のピークが観察できた。これは、EGF20上のO-フコースやO-グルコースサイトをアラニンに置換しても観察できたことから、O-フコースやO-グルコース以外のまったく新しいタイプの糖鎖修飾である可能性が示された。+204DaはHexNAcの分子量と一致することから、HexNAc (GlcNAcかGalNAc) であることがうかがわれた。さらに、Notch1が抗O-GlcNAc抗体 (CTD110.6) で反応することや、βヘキソサミニダーゼで消化されることからO-GlcNAc修飾であることが示された。また、Notch1受容体上のO-GlcNAc修飾はOGTのdsRNAを用いたノックダウンで消失しないことから、OGT以外の糖転移酵素により修飾されていることが示唆された。この結果より、Notch1受容体上にOGT非依存的にO-GlcNAc修飾が生じることが明らかになった。

ショウジョウバエ由来のS2細胞では細胞外O-GlcNAcは伸長しないが、哺乳動物細胞ではO-GlcNAcが伸長することが示されている¹⁵⁾。実際に、HEK293T細胞に過剰発現したNotch1のEGFリピートをβ1,4-ガラクトシダーゼで糖加水分解処理を行うことで、抗O-GlcNAc抗体との反応性が増加する。よって、Notch1受容体上の細胞外O-GlcNAcにはGalが付加されていることが示唆されていた。その後、Notch1受容体のO結合型糖鎖を網羅的に質量分析装

置で解析した報告により、O-GlcNAc-Gal-Sia構造由来のピークが観察されている¹⁶⁾。これらの結果から、哺乳動物では細胞外O-GlcNAcはさらに糖鎖付加を受け、O-GlcNAc-Gal-Sia構造になると考えられている。しかしながら、CHO細胞において細胞表面上のNotch1受容体上のO-GlcNAcは抗O-GlcNAc抗体 (CTD110.6) で検出できることから、すべてのO-GlcNAcが伸長しているのではない¹⁷⁾。

4. EGFドメイン特異的O-GlcNAc転移酵素 (EOGT)

Notch1受容体上は、小胞体からゴルジ体を経て細胞膜に分泌される膜タンパク質である。よって、Notch1のO-GlcNAc転移酵素は小胞体かゴルジ体に局在していると予想できるが、O-フコース転移酵素POFUT1やO-グルコース転移酵素POGLUT1は小胞体に局在しているため、小胞体局在シグナルを持つ機能未知の遺伝子にターゲットを絞ってNotch1のO-GlcNAc転移酵素のスクリーニングをした⁸⁾。その結果、EGFドメイン特異的O-GlcNAc転移酵素 (EGF-domain O-GlcNAc transferase : EOGT) をRNAiにてノックダウンすることでEGF20のO-GlcNAc由来のピークが消失することを見いだした。つまり、EOGTがNotch1のEGFリピートに細胞外O-GlcNAcを触媒する糖転移酵素であることがわかった。その後、マウスのEOGTを用いた酵素化学的な特徴づけにより、マウスEOGTの至適pHはpH 7.0であり、UDP-GlcNAcに対する K_m 値は25 μ Mであることを報告した⁹⁾。EOGTのドメイン構造についての情報は少ないが、EOGTの1~19番目のアミノ酸がシグナルペプチドであり、295~297番目のアミノ酸がDXDモチーフであることが示唆されている。また、EOGTの遺伝子変異が先天性疾患アダムズ・オリバー症候群 (AOS) で報告されているが、AOSで発見されたEOGT遺伝子変異体については、次々節で解説したい。

当初、我々がEOGT-Lと呼んでいたEOGTに対して相同

性の高いタンパク質が存在していた¹⁵⁾。その後、さまざまな名称 (GTDC2/EOGT-L/AO61/POMGNT2) で呼ばれていたが、現在ではPOMGNT2という名称が一般的である¹⁸⁾。このPOMGNT2はEOGTとの相同性が高いが、Notch1のO-GlcNAc転移酵素ではないことが、抗O-GlcNAc抗体を使用したウエスタンブロッティングで確認された¹⁵⁾。その後、POMGNT2はUDP-GlcNAcを糖供与体として α ジストログリカン上のO-Manに β 1-4結合にてGlcNAc修飾を触媒する糖転移酵素であることが報告された¹⁹⁻²¹⁾。POMGNT2については、本特集の萬谷らの総説も参考にされたい²²⁾。

5. 細胞外O-GlcNAc修飾タンパク質

これまでに、Notch1を含めると10種類のタンパク質が細胞外O-GlcNAc修飾タンパク質として同定されている²³⁾。Notch1の次に同定された細胞外O-GlcNAc修飾タンパク質はDumpyである⁸⁾。Dumpyは、*Eogt*変異ショウジョウバエの表現型解析から細胞外O-GlcNAc修飾タンパク質であることが同定された。*Eogt*変異ショウジョウバエは、Notch1変異の表現型と似ていないが、羽や胸背板、クチクラに異常を呈していた。これは、Dumpyの変異と似ており、DumpyとEOGTが関連していることが示唆された。実際に、DumpyはEOGTの基質であること、つまり、細胞外O-GlcNAc修飾タンパク質であることが確認された。

その後、マウスの大脳皮質をターゲットとしたO-GlcNAc修飾タンパク質の網羅的解析からHSPG2 (Perlecan) やNELL1, LAMA5, PAMRI, NOTCH2がリストアップされた²⁴⁾。これらのタンパク質は、直接、EOGTの基質となるかどうかは確認されていないが、Notch2を除いた4種類のタンパク質は分泌タンパク質であることから考えると、OGTの基質となることは考えにくいのでEOGTの基質であると考えられる。また、thrombospondin-1 (TSP-1) も細胞外O-GlcNAc修飾タンパク質であることが報告されている²⁵⁾。興味深いことに、NotchのリガンドであるDeltaやSerrateも細胞外O-GlcNAc修飾タンパク質であることが報告された²⁶⁾。

近年まで細胞外O-GlcNAc修飾の分子機能は不明であったが、Notch1のEGFドメイン上の細胞外O-GlcNAcの分子機能について明らかになったので紹介したい。Notch1受容体のEGFドメインは1から36まで存在するが、主要なO-GlcNAc修飾部位を同定するために、アラニン置換と抗O-GlcNAc抗体を用いたウエスタンブロッティングを実施した¹⁰⁾。その結果、EGF2とEGF10, EGF17, EGF20のセリン・トレオニンをアラニンに置換した場合、抗O-GlcNAc抗体との反応性が減少した (ただし、完全には消失しておらず、マイナーなO-GlcNAc修飾部位は他にもある)。これは、主なNotch1受容体のO-GlcNAcサイトがEGF2とEGF10, EGF17, EGF20であることを示している。次に、Notch1受容体とリガンドとの相互作用における細胞外O-GlcNAc修飾の分子機能を明らかにするために、Notch1^{A4×O-GlcNAc}変異

体 (EGF2とEGF10, EGF17, EGF20のセリン・トレオニンをアラニンに置換した変異体) を用いたリガンド結合実験を行った。その結果、DLL1/4リガンドとの結合性を増強する一方で、JAG1リガンドとの結合性には影響がなかった。同様に、*Eogt*欠損マウスから単離培養した血管内皮細胞を用いたリガンド結合実験においてもEOGTはDLL4リガンドとの結合性を増強していたが、JAG1リガンドを介したNotchシグナルには影響はなかった。この結果から、細胞外O-GlcNAc修飾はNotch1とDLLリガンドとの結合性を制御していることがわかった。

先にも述べたが、Notch1^{A4×O-GlcNAc}変異体では、抗O-GlcNAc抗体との反応性は減少するものの、完全には消失しなかった¹⁰⁾。この結果に一致して、ショウジョウバエ由来のS2細胞にNotch1 EGF1-36を一過性発現して網羅的にO結合型糖鎖を解析した結果、EGF4とEGF11, EGF12, EGF14, EGF20がO-GlcNAc修飾を受けていることが報告されている¹⁶⁾。興味深いことに、各EGFドメインによって細胞外O-GlcNAc修飾を受けている割合は異なり、EGF12とEGF20では8割以上がO-GlcNAc修飾を受けているのに対して、EGF11は約7割、EGF4とEGF14では約5割がO-GlcNAc修飾を受けているにすぎなかった。細胞外O-GlcNAc修飾を受ける部位や比率は、細胞種や細胞外環境によって異なると考えられるので、さまざまな条件や細胞種で検証する必要がある。

6. アダムズ・オリバー症候群

アダムズ・オリバー症候群 (AOS) とは、頭頂部の皮膚や骨の欠損と四肢の横断型欠損を主徴とし、血管異常を伴うまれな疾患である²⁷⁾。長らく原因遺伝子を含めた分子機序は不明であったが、AOSの患者に対するゲノムシーケンスの結果から原因遺伝子が明らかになった。これまでに報告されているAOSの原因遺伝子は、二つのグループに分けることができる。アクチン骨格関連因子とNotchシグナル関連因子である。アクチン骨格関連因子には、Rho GTPase activating protein 31 (ARHGAP31) とdedicator of cytokinesis 6 (DOCK6) が報告されており²⁸⁻³⁰⁾、ARHGAP31はヘテロ型変異であり、DOCK6はホモ型変異である³¹⁾。一方、Notchシグナル関連因子には、Notch1^{32, 33)} やDelta-like 4 (Dll4)³⁴⁻³⁶⁾、Immunoglobulin kappa J region (RBPJ), EOGT^{37, 38)}などが報告されている。AOSで発見されたEOGTの遺伝子変異はホモ型変異であるが、NOTCH1やDLL4, RBPJはヘテロ型変異であった。

AOSで報告されている原因遺伝子の中で、EOGT遺伝子変異体について解析されているので紹介したい⁹⁾。AOSで発見されたEOGTの遺伝子変異体は3種類あり、EOGT^{W207S}とEOGT^{R377Q}、そして、EOGT^{G359Dfs*28}である (図2)。EOGT^{G359Dfs*28}は359番目のグリシンがフレームシフトを起こして、387番目のアミノ酸がストップコドンになる変異である。EOGT^{G359Dfs*28}は、EOGTの触媒部位と予測されて

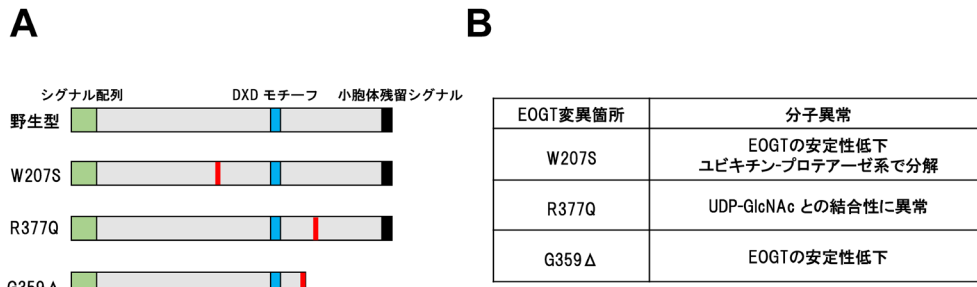


図2 アダムズ・オリバー症候群 (AOS) で発見された EOGT 遺伝子変異体

(A) AOS で発見された EOGT 遺伝子変異体の模式図を示す。EOGT 野生型 (野生型) では、N 末端にシグナル配列が、C 末端に小胞体残留シグナルが存在する。また、295~297 番目のアミノ酸に DXD モチーフが存在する。EOGT^{W207S} (W207S) は、207 番目のトリプトファンがセリンに置換している変異である。EOGT^{R377Q} (R377Q) は、377 番目のアルギニンがグルタミンに置換している変異である。EOGT^{G359 G359Dfs*28} (G359Δ) は、359 番目のグリシンがフレームシフトを起こして、387 番目のアミノ酸がストップコドンになる変異である。(B) AOS で発見された EOGT 遺伝子変異体の分子機能異常を示す。EOGT^{W207S} (W207S) は、EOGT の安定性も低下しており、ユビキチン-プロテアソーム系で分解されている。EOGT^{R377Q} (R377Q) は、安定性や局在性には異常がないが、基質である UDP-GlcNAc との結合性に異常が認められた。EOGT^{G359Dfs*28} (G359Δ) は、安定性も低下していた。

いるドメインが欠損しているので、糖転移酵素活性を持たないと推測される。実際に、AOS 型 EOGT 変異体を Notch1 の可溶性細胞外ドメインと共発現させた場合、Notch1 の可溶性細胞外ドメインに対する抗 O-GlcNAc 抗体の反応性が EOGT^{WT} を共発現した場合と比べて著しく低下する。つまり、EOGT^{W207S} と EOGT^{R377Q}、EOGT^{G359Dfs*28} 変異体は糖を転移する能力がない、もしくは、低下していることを示している。詳しく調べてみると、EOGT^{W207S} は、タンパク質の安定性が低下しており、ユビキチン-プロテアソーム系で分解されていることがわかった。同様に、EOGT^{G359Dfs*28} も安定性が低下していることが確認できた。一方、EOGT^{R377Q} は、タンパク質の安定性や局在性には異常がないが、糖スクレオチドである UDP-GlcNAc との結合性が低下していることがわかった。その結果、EOGT^{R377Q} は糖転移酵素反応が失われているのだと考察している。このように、EOGT の遺伝子変異による細胞外 O-GlcNAc の異常は、AOS の原因となることがわかった。

7. Eogt 欠損マウス

Eogt 欠損マウスは、AOS の患者で認められる先天性皮膚形成不全と四肢の横断型欠損が認められなかった¹⁰⁾。同様に、Notch1 や Dll4 など他の AOS 原因遺伝子の欠損マウスも異常が認められていないことから、AOS はヒトに特有な疾患であると考えられる。もしくは、環境的要因など他の因子も AOS の発症に関連する可能性が考えられるが、具体的なことはわかっていない。しかしながら、Notch1 や Dll4、Rbpj の変異マウスで共通して認められる血管異常は、AOS の表現型とも関連している。そこで、血管形成過程に着目して Eogt 欠損マウスの解析を行った。

網膜の血管形成は発生直後 (P0) から開始されるため、血管形成過程のモデルとして重用されている。まず、出生後 5 日目 (P5) 網膜血管における EOGT の発現細胞を *in*

situ ハイブリダイゼーションで解析したところ、血管内皮細胞に EOGT が発現していることがわかった¹⁰⁾。そこで、Eogt 欠損マウスの P5 の網膜の血管形成を観察したところ、Tip 細胞数と毛細血管の分岐数が増加していた。これらの異常は Notch シグナルの低下による表現型に一致し、同様の異常が血管内皮細胞特異的な Eogt 欠損マウスでも認められることから、EOGT が血管内皮細胞で機能していることがわかった。

次に、Notch シグナルは血管構造安定化に必須であることが知られているので、Notch シグナルに異常を示す Eogt 欠損マウスにおける血管構造安定化について解析を行った。その結果、Notch1 や Rbpj ヘテロ変異マウスで認められた血管からのフィブリノーゲンの漏出が Eogt 欠損マウスでも確認できた¹⁰⁾。同様に、ビオチンをマウスの左心室から注入後、網膜血管における漏出を解析した。その結果、Eogt 欠損マウスや Notch1 や Rbpj ヘテロ変異マウスにてビオチンの漏出が確認できた。さらに、Eogt/Notch1 二重変異マウスや Eogt/Rbpj 二重変異マウスでは漏出が相乗的に増加していた。これらの表現型から、Eogt の欠損は血管内皮細胞での Notch シグナル低下、網膜の血管形成異常、そして血液網膜関門での血管透過性の異常につながるということが明らかになった。

8. POFUT1/POGLUT1 と先天性疾患

ここまでは主に NOTCH1 受容体上の細胞外 O-GlcNAc に焦点を当てて紹介してきたが、他の Notch 受容体上の O 型糖鎖異常と疾患の関連性について簡単に概説したい (表 1)。POFUT1 と POGLUT1 は、Dowling-Degos 病 (DDD) と呼ばれる皮膚に色素異常を持つ先天性皮膚疾患の原因遺伝子である。最初に DDD の原因遺伝子として報告された遺伝子は keratin5 (KRT5) である³⁹⁾。これにより、DDD は角化細胞の細胞骨格異常が原因であると長らく信じら

表1 先天性疾患で発見されたEGFドメインのO結合型糖転移酵素の遺伝子変異

糖転移酵素遺伝子	疾患	変異	症状
<i>POFUT1</i>	DDD	ヘテロ変異	皮膚の網状色素沈着
<i>POGLUT1</i>	DDD	ヘテロ変異	皮膚の網状色素沈着
<i>POGLUT1</i>	肢帯型筋ジストロフィー	ホモ変異	四肢近位筋から始まる進行性筋力低下
<i>EOGT</i>	AOS	ヘテロ変異	頭皮および頭蓋骨欠損, 四肢の横断型欠損

れていたが、一方で、KRT5に異常がないDDDの患者も報告されていたことから、ほかにも原因遺伝子が存在することが示唆されていた³⁹⁾。2013年に、DDDの患者を対象として全ゲノム解析を行い、網羅的にDDDの原因遺伝子の探索が行われた⁴⁰⁾。その結果、*POFUT1*がDDDの原因遺伝子であることが報告された。DDDで発見された2種類の*POFUT1*の変異はともにヘテロ変異であり、一つは144番目のグルタミン酸がストップコドンに変わるナンセンス変異であった。他方は482番目のアデニンが欠損しており、161番目のリシンがフレームシフトを起こす変異であった。その後、多くのグループによりDDDの患者から*POFUT1*の変異が同定されたが、その半数がナンセンス変異であった⁴¹⁻⁴³⁾。ナンセンス変異以外の遺伝子変異体(R240CやM262T, S356F, R366W)においては、糖ヌクレオチドであるGDP-フコースの結合サイト付近に変異があることが、X線構造解析の情報からわかった⁴⁴⁾。

同様に、*POGLUT1*の遺伝子変異がDDDの患者から報告されている^{45, 46)}。現在までに、9種類の*POGLUT1*の変異がDDDで報告されているが、そのうち、7種類はナンセンス変異である。残る2種類の変異は、R279Wとイントロン領域に変異があるc.798-2A>Cである。R279Wは基質であるUDP-グルコースとの結合サイトに一致するため、*POGLUT1*の酵素活性に影響していると考えられている。

意外なことに、肢帯型筋ジストロフィーの患者を対象にした全ゲノム解析から*POGLUT1*の遺伝子変異が発見された⁴⁷⁾。同定された*POGLUT1*^{D233E}の糖転移酵素活性は野生型と比較して顕著に低下しており、この変異を持つ患者ではNotchシグナルのターゲット遺伝子の発現量も低下していた。さらに、この患者では α ジストログリカンのリガンドであるラミニンとの結合性も低下していた。これは、*POGLUT1*の異常を介したNotchシグナルの低下が筋ジストロフィーの原因になることを示している。

9. まとめと今後の展開

本稿では、Notch受容体のEGFリピートを修飾する糖転移酵素の機能異常による先天性疾患として、AOSやDDD、肢帯型筋ジストロフィーを取り上げた。これらの疾患の病態は組織特異的であり、表現型の重複はない。こうした違いの理由は明らかではないが、Notchシグナル以外にもEGFドメインのO型糖鎖が作用する可能性は考えられる。実際に、O-フコース修飾、O-グルコース修飾は、O-

GlcNAc同様に、Notch受容体以外にも複数の修飾分子の存在が知られている。別の可能性としては、これら3種のO型糖鎖の発現分布が組織によって異なることが考えられる。いずれの場合でも、これらの先天性疾患の治療戦略の一つとして、EGFドメインに関連した糖転移酵素や糖ヌクレオチドの代謝酵素を標的としたアプローチが期待できるであろう。

近年、Notch1受容体とリガンドであるDLL4やJAG1とのX線構造解析が報告された^{48, 49)}。EGF12のO-フコースサイトはDLL4との直接結合している領域に生じていることがわかり、これまで生化学的に行われてきた解析結果と一致していた。一方、O-GlcNAcサイトはリガンド結合領域の外部に生じることから、NOTCH1とDLL4との分子間相互作用に直接的に関与はしてないと考えられる。では、なぜ、Notch1受容体上の細胞外O-GlcNAc修飾はDLL4リガンドとの結合性を増加させるのであろうか？我々は細胞外O-GlcNAc修飾はNotch1受容体上のEGFドメインの構造を変化させているのではないかと予想しているが、今後の解析が待たれるところである。

謝辞

本稿で紹介した研究の大半は、筆者が現在所属している名古屋大学医学系研究科分子細胞化学の研究室で行われたものです。その間、研究に携わっていただいた多くの大学院生や共同研究先の先生に深く感謝を申し上げます。特に、古川鋼一先生(中部大学)には、数多くの助言をいただいたことを深く御礼申し上げます。

文 献

- Hart, G.W., Housley, M.P., & Slawson, C. (2007) *Nature*, **446**, 1017-1022.
- Hart, G.W., Slawson, C., Ramirez-Correa, G., & Lagerlof, O. (2011) *Annu. Rev. Biochem.*, **80**, 825-858.
- Whelan, S.A., Dias, W.B., Thiruneelakantapillai, L., Lane, M.D., & Hart, G.W. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 5204-5211.
- Zeidan, Q. & Hart, G.W. (2010) *J. Cell Sci.*, **123**, 13-22.
- Yang, X., Ongusaha, P.P., Miles, P.D., Havstad, J.C., Zhang, F., So, W.V., Kudlow, J.E., Michell, R.H., Olefsky, J.M., Field, S.J., & Evans, R.M. (2008) *Nature*, **451**, 964-969.
- Zhu, W., Leber, B., & Andrews, D.W. (2001) *EMBO J.*, **20**, 5999-6007.
- Matsuura, A., Ito, M., Sakaidani, Y., Kondo, T., Murakami, K., Furukawa, K., Nadano, D., Matsuda, T., & Okajima, T. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 35486-35495.

- 8) Sakaidani, Y., Nomura, T., Matsuura, A., Ito, M., Suzuki, E., Murakami, K., Nadano, D., Matsuda, T., Furukawa, K., & Okajima, T. (2011) *Nat. Commun.*, **2**, 583.
- 9) Ogawa, M., Sawaguchi, S., Kawai, T., Nadano, D., Matsuda, T., Yagi, H., Kato, K., Furukawa, K., & Okajima, T. (2014) *J. Biol. Chem.*, **290**, 2137–2149.
- 10) Sawaguchi, S., Varshney, S., Ogawa, M., Sakaidani, Y., Yagi, H., Takeshita, K., Murohara, T., Kato, K., Sundaram, S., Stanley, P., & Okajima, T. (2017) *eLife*, **6**, doi: 10.7554/eLife.24419.
- 11) Kovall, R.A., Gebelein, B., Sprinzak, D., & Kopan, R. (2017) *Dev. Cell*, **41**, 228–241.
- 12) Hallgren, P., Lundblad, A., & Svensson, S. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 5312–5314.
- 13) Hase, S., Kawabata, S., Nishimura, H., Takeya, H., Sueyoshi, T., Miyata, T., Iwanaga, S., Takao, T., Shimonishi, Y., & Ikenaka, T. (1988) *J. Biochem.*, **104**, 867–868.
- 14) Haltom, A.R. & Jafar-Nejad, H. (2015) *Glycobiology*, **25**, 1027–1042.
- 15) Sakaidani, Y., Ichiiyanagi, N., Saito, C., Nomura, T., Ito, M., Nishio, Y., Nadano, D., Matsuda, T., Furukawa, K., & Okajima, T. (2012) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **419**, 14–19.
- 16) Harvey, B.M., Rana, N.A., Moss, H., Leonardi, J., Jafar-Nejad, H., & Haltiwanger, R.S. (2016) *J. Biol. Chem.*, **291**, 16348–16360.
- 17) Tashima, Y. & Stanley, P. (2014) *J. Biol. Chem.*, **289**, 11132–11142.
- 18) Halmo, S.M., Singh, D., Patel, S., Wang, S., Edlin, M., Boons, G.J., Moremen, K.W., Live, D., & Wells, L. (2017) *J. Biol. Chem.*, **292**, 2101–2109.
- 19) Ogawa, M., Nakamura, N., Nakayama, Y., Kurosaka, A., Manya, H., Kanagawa, M., Endo, T., Furukawa, K., & Okajima, T. (2013) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **440**, 88–93.
- 20) Yagi, H., Nakagawa, N., Saito, T., Kiyonari, H., Abe, T., Toda, T., Wu, S.W., Khoo, K.H., Oka, S., & Kato, K. (2013) *Sci. Rep.*, **3**, 3288.
- 21) Yoshida-Moriguchi, T., Willer, T., Anderson, M.E., Venzke, D., Whyte, T., Muntoni, F., Lee, H., Nelson, S.F., Yu, L., & Campbell, K.P. (2013) *Science*, **341**, 896–899.
- 22) Taniguchi-Ikeda, M., Morioka, I., Iijima, K., & Toda, T. (2016) *Mol. Aspects Med.*, **51**, 115–124.
- 23) Ogawa, M., Sawaguchi, S., Furukawa, K., & Okajima, T. (2015) *Biochim. Biophys. Acta*, **1850**, 1319–1324.
- 24) Alfaro, J.F., Gong, C.X., Monroe, M.E., Aldrich, J.T., Clauss, T.R., Purvine, S.O., Wang, Z., Camp, D.G. 2nd, Shabanowitz, J., Stanley, P., Hart, G.W., Hunt, D.F., Yang, F., & Smith, R.D. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 7280–7285.
- 25) Hoffmann, B.R., Liu, Y., & Mosher, D.F. (2012) *PLoS One*, **7**, e32762.
- 26) Müller, R., Jenny, A., & Stanley, P. (2013) *PLoS One*, **8**, e62835.
- 27) Hased, S., Li, S., Mulvihill, J., Aston, C., & Palmer, S. (2017) *Am. J. Med. Genet. A.*, **173**, 790–800.
- 28) Lehman, A., Stittrich, A.B., Glusman, G., Zong, Z., Li, H., Eydoux, P., Senger, C., Lyons, C., Roach, J.C., & Patel, M. (2014) *Am. J. Med. Genet. A.*, **164A**, 2656–2662.
- 29) Sukalo, M., Tilsen, F., Kayserili, H., Müller, D., Tüysüz, B., Ruddy, D.M., Wakeling, E., Ørstavik, K.H., Snape, K.M., Trembath, R., De Smedt, M., van der Aa, N., Skalej, M., Mundlos, S., Wuyts, W., Southgate, L., & Zenker, M. (2015) *Hum. Mutat.*, **36**, 593–598.
- 30) Shaheen, R., Faqeih, E., Sunker, A., Morsy, H., Al-Sheddi, T., Shamseldin, H.E., Adly, N., Hashem, M., & Alkuraya, F.S. (2011) *Am. J. Hum. Genet.*, **89**, 328–333.
- 31) Southgate, L., Machado, R.D., Snape, K.M., Primeau, M., Dafou, D., Ruddy, D.M., Branney, P.A., Fisher, M., Lee, G.J., Simpson, M.A., He, Y., Bradshaw, T.Y., Blaumeiser, B., Winship, W.S., Reardon, W., Maher, E.R., FitzPatrick, D.R., Wuyts, W., Zenker, M., Lamarche-Vane, N., & Trembath, R.C. (2011) *Am. J. Hum. Genet.*, **88**, 574–585.
- 32) Stittrich, A.B., Lehman, A., Bodian, D.L., Ashworth, J., Zong, Z., Li, H., Lam, P., Khromykh, A., Iyer, R.K., Vockley, J.G., Baveja, R., Silva, E.S., Dixon, J., Leon, E.L., Solomon, B.D., Glusman, G., Niederhuber, J.E., Roach, J.C., & Patel, M.S. (2014) *Am. J. Hum. Genet.*, **95**, 275–284.
- 33) Southgate, L., Sukalo, M., Karountzos, A.S., Taylor, E.J., Collinson, C.S., Ruddy, D., Snape, K.M., Dallapiccola, B., Tolmie, J.L., Joss, S., Brancati, F., Digilio, M.C., Graul-Neumann, L.M., Salvati, L., Coerd, W., Jacquemin, E., Wuyts, W., Zenker, M., Machado, R.D., & Trembath, R.C. (2015) *Circ Cardiovasc Genet*, **8**, 572–581.
- 34) Aminkeng, F. (2015) *Clin. Genet.*, **88**, 532.
- 35) Meester, J.A., Southgate, L., Stittrich, A.B., Venselaar, H., Beekmans, S.J., den Hollander, N., Bijlsma, E.K., Helderma-van den Enden, A., Verheij, J.B., Glusman, G., Roach, J.C., Lehman, A., Patel, M.S., de Vries, B.B., Ruivenkamp, C., Itin, P., Prescott, K., Clarke, S., Trembath, R., Zenker, M., Sukalo, M., Van Laer, L., Loeys, B., & Wuyts, W. (2015) *Am. J. Hum. Genet.*, **97**, 475–482.
- 36) Nagasaka, M., Taniguchi-Ikeda, M., Inagaki, H., Ouchi, Y., Kurokawa, D., Yamana, K., Harada, R., Nozu, K., Sakai, Y., Mishra, S.K., Yamaguchi, Y., Morikoka, I., Toda, T., Kurahashi, H., & Iijima, K. (2017) *J. Hum. Genet.* doi: 10.1038/jhg.2017.48.
- 37) Shaheen, R., Aglan, M., Keppler-Noreuil, K., Faqeih, E., Ansari, S., Horton, K., Ashour, A., Zaki, M.S., Al-Zahrani, F., Cueto-González, A.M., Abdel-Salam, G., Temtamy, S., & Alkuraya, F.S. (2013) *Am. J. Hum. Genet.*, **92**, 598–604.
- 38) Cohen, I., Silberstein, E., Perez, Y., Landau, D., Elbedour, K., Langer, Y., Kadir, R., Volodarsky, M., Sivan, S., Narkis, G., & Birk, O.S. (2014) *Eur. J. Hum. Genet.*, **22**, 374–378.
- 39) Betz, R.C., Planko, L., Eigelschoven, S., Hanneken, S., Pasternack, S.M., Bussov, H., Van Den Bogaert, K., Wenzel, J., Braun-Falco, M., Rutten, A., Rogers, M.A., Ruzicka, T., Nöthen, M.M., Magin, T.M., & Kruse, R. (2006) *Am. J. Hum. Genet.*, **78**, 510–519.
- 40) Li, M., Cheng, R., Liang, J., Yan, H., Zhang, H., Yang, L., Li, C., Jiao, Q., Lu, Z., He, J., Ji, J., Shen, Z., Hao, F., Yu, H., & Yao, Z. (2013) *Am. J. Hum. Genet.*, **92**, 895–903.
- 41) Chen, M., Li, Y., Liu, H., Fu, X., Yu, Y., Yu, G., Wang, C., Bao, F., Liany, H., Wang, Z., Shi, Z., Zhang, D., Zhou, G., Liu, J., & Zhang, F. (2014) *PLoS One*, **9**, e104496.
- 42) Kono, M., Sukanuma, M., Takama, H., Zarzoso, I., Saritha, M., Bodet, D., Aboobacker, S., Kaliaperumal, K., Suzuki, T., Tomita, Y., Sugiura, K., & Akiyama, M. (2015) *Br. J. Dermatol.*, **173**, 584–586.
- 43) Basmanav, F.B., Fritz, G., Lestringant, G.G., Pachat, D., Hoffjan, S., Fischer, J., Wehner, M., Wolf, S., Thiele, H., Altmüller, J., Pulimood, S.A., Rütten, A., Kruse, R., Hanneken, S., Frank, J., Danda, S., Bygum, A., & Betz, R.C. (2015) *J. Invest. Dermatol.*, **135**, 615–618.
- 44) McMillan, B.J., Zimmerman, B., Egan, E.D., Lofgren, M., Xu, X., Hesser, A., & Blacklow, S.C. (2017) *Glycobiology*, **27**, 777–786.
- 45) Basmanav, F.B., Oprisoreanu, A.M., Pasternack, S.M., Thiele, H., Fritz, G., Wenzel, J., Größer, L., Wehner, M., Wolf, S., Fagerberg, C., Bygum, A., Altmüller, J., Rütten, A., Parmentier, L., El Shabrawi-Caelen, L., Hafner, C., Nürnberg, P., Kruse, R., Schoch, S., Hanneken, S., & Betz, R.C. (2014) *Am. J. Hum. Gen-*

et., 94, 135–143.

- 46) Wilson, N.J., Cole, C., Kroboth, K., Hunter, W.N., Mann, J.A., McLean, W.H., Kernland Lang, K., Beltraminelli, H., Sabroe, R.A., Tiffin, N., Sobey, G.J., Borradori, L., Simpson, E., & Smith, F.J. (2017) *Br. J. Dermatol.*, **176**, 270–274.
- 47) Servián-Morilla, E., Takeuchi, H., Lee, T.V., Clarimon, J., Mavillard, F., Area-Gómez, E., Rivas, E., Nieto-González, J.L., Rivero, M.C., Cabrera-Serrano, M., Gómez-Sánchez, L., Martínez-López, J.A., Estrada, B., Márquez, C., Morgado, Y., Suárez-

Calvet, X., Pita, G., Bigot, A., Gallardo, E., Fernández-Chacón, R., Hirano, M., Haltiwanger, R.S., Jafar-Nejad, H., & Paradas, C. (2016) *EMBO Mol. Med.*, **8**, 1289–1309.

- 48) Luca, V.C., Kim, B.C., Ge, C., Kakuda, S., Wu, D., Roein-Peikar, M., Haltiwanger, R.S., Zhu, C., Ha, T., & Garcia, K.C. (2017) *Science*, **355**, 1320–1324.
- 49) Luca, V.C., Jude, K.M., Pierce, N.W., Nachury, M.V., Fischer, S., & Garcia, K.C. (2015) *Science*, **347**, 847–853.

著者寸描

●小川 光貴 (おがわ みつたか)



名古屋大学大学院医学系研究科生物化学講座分子細胞化学分野助教。博士 (バイオサイエンス)。

■略歴 1984年愛知県に生まれる。2008年長浜バイオ大学バイオサイエンス学部卒業。13年同大学院バイオサイエンス研究科修了。その後、名古屋大学医学系研究科研究員、日本学術振興会特別研究員 (PD) を経て、17年7月より現職。

■研究テーマと抱負 現在の研究テーマは「細胞外O-GlcNAc修飾の分子機能解析」です。「糖鎖」がタンパク質に付加されることで、どのような「機能」がタンパク質に付加されるかを明らかにすることが私の抱負です。そして、糖鎖を操ることで、タンパク質の分子機能も操れたら、疾患が治せたらと奮起しています。

■ウェブサイト https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/laboratory/basic-med/bio-chem/mol-cellular/

■趣味 写真。

●岡島 徹也 (おかじま てつや)

名古屋大学大学院医学系研究科生物化学講座分子細胞化学分野教授。医学博士。

■略歴 1996年名古屋大学医学部卒業、2000年同大学院医学研究科修了。15年より現職。

■研究テーマと抱負 Notch受容体に代表される非典型糖鎖の構造と機能の研究を中心に、発生過程における糖鎖のダイナミズムや疾患における糖鎖異常を明らかにし、糖鎖の作用メカニズムの基本原理の理解と、その知識をベースにした次世代糖質科学の発展に貢献したい。

■ウェブサイト https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/laboratory/basic-med/bio-chem/mol-cellular/