

細胞外 *O*-GlcNAc の構造と機能

田嶋 優子, 岡島 徹也

1. はじめに

細胞はさまざまなタンパク質を発現し、複雑な生命機能を維持している。ほとんどのタンパク質は、翻訳後修飾による機能制御を受けている。糖鎖修飾は、リン酸化と並び、細胞内で最も豊富に存在する翻訳後修飾の一つであり、タンパク質の機能、品質管理や細胞内輸送を制御する。タンパク質のセリンおよびトレオニン残基に結合する *O* 結合型糖鎖修飾の一つである *O*-linked *N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) は、以前からよく知られており、細胞質、ミトコンドリアおよび核のみに存在すると考えられてきた。しかし、今から約10年前に、細胞表面に発現する NOTCH 受容体に *O*-GlcNAc が見つかり、細胞外 *O*-GlcNAc の存在が明らかになった。細胞外 *O*-GlcNAc は、上皮成長因子 (epidermal growth factor: EGF) 様ドメインを含む糖タンパク質に限定されたユニークな修飾である。この修飾は、小胞体の内腔に局在する EGF ドメイン特異的 *O*-GlcNAc 転移酵素 (EGF domain-specific *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase: EOGT) によって触媒される。EOGT の変異は、ヒト先天性疾患のアダムス・オリバー症候群 (Adams-Oliver syndrome: AOS) の患者で報告され、本疾患の原因遺伝子の一つである。本稿では、本研究室の最近の知見を含めて、細胞外 *O*-GlcNAc の構造と機能について紹介する。

2. 細胞外 *O*-GlcNAc の発見

細胞内 *O*-GlcNAc は、1984年に Hart によって発見された¹⁾。 *O*-GlcNAc 転移酵素 (*O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase: OGT) の細胞内局在から、核、細胞質およびミトコンドリアに存在するタンパク質が *O*-GlcNAc の修

飾を受けると考えられ、実際、これらの細胞内小器官のタンパク質に *O*-GlcNAc が検出されてきた。しかし、2008年に岡島らが、ショウジョウバエ NOTCH 受容体の細胞外領域にある第20番目の上皮成長因子 (EGF) ドメイン (EGF20) をショウジョウバエ胚由来の培養細胞 (S2細胞) に発現させて解析した際、 *O*-GlcNAc の修飾を見つけた²⁾。その後、哺乳動物細胞の NOTCH1 受容体にも *O*-GlcNAc の修飾が同定された³⁾。この細胞外 *O*-GlcNAc⁴⁾ は、OGT とは異なる、小胞体 (ER) に局在する EGF ドメイン特異的 *O*-GlcNAc 転移酵素 (EOGT) によって付加されることが岡島らによって報告された⁵⁾。EGF 上の細胞外 *O*-GlcNAc は、細胞内 *O*-GlcNAc と同様に抗 *O*-GlcNAc 抗体 (CTD 110.6 など) と反応し⁶⁾、また、 β -ヘキソサミニダーゼ消化によって除去される²⁾。

細胞外 *O*-GlcNAc を持つタンパク質は、今までに10種類以上報告されている。哺乳動物細胞では、NOTCH1 受容体に加えて、NOTCH2 受容体、トロンボスポンジン-1 (TSP-1)、HSPG2 (Perlecan)、neural EGFL like 1 (NELL1)、laminin subunit alpha 5 (LAMA5)、peptidase domain containing associated with muscle regeneration 1 (PAMR1) などがある。ショウジョウバエでは、細胞外マトリックスの成分の一つである Dumpy がある。共通点は、これらタンパク質の細胞外領域には EGF ドメインがあり、EGF ドメイン特異的に *O*-GlcNAc で修飾されることである。

3. EGF ドメイン特異的 *O*-GlcNAc 転移酵素 (EOGT)

EOGT は、約530アミノ酸からなり、糖転移反応に必須の DXD モチーフがある³⁾ (図1A)。EOGT は、膜貫通領域を持たないが、C末端に KDEL 様の配列を持ち、小胞体に局在する³⁾。これは、EGF ドメインを修飾する他の酵素と共通な性質である。

これまでの研究では、マウス EOGT が主に解析されてきた。ヒトとマウスの EOGT のアミノ酸配列は、約90%の相同性があり、主要な配列は保存されている。EOGT には、*N*型糖鎖修飾の候補部位が3か所あるが、このうちの2か所 (N263, N354) に高マンノース型の *N*型糖鎖修飾を受けることが、最近、本研究室の Didarul Alam らによって示された⁷⁾。これらの *N*型糖鎖を欠損すると、NOTCH1 受容体の *O*-GlcNAc の修飾率は低下する⁷⁾。しかし、意外な

名古屋大学大学院医学系研究科 (〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町65)

Recent topics on structure and function of extracellular *O*-GlcNAc
Yuko Tashima and Tetsuya Okajima (Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsuruma-cho, Showa-ku, Nagoya, 466-8550 Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920833

© 2020 公益社団法人日本生化学会

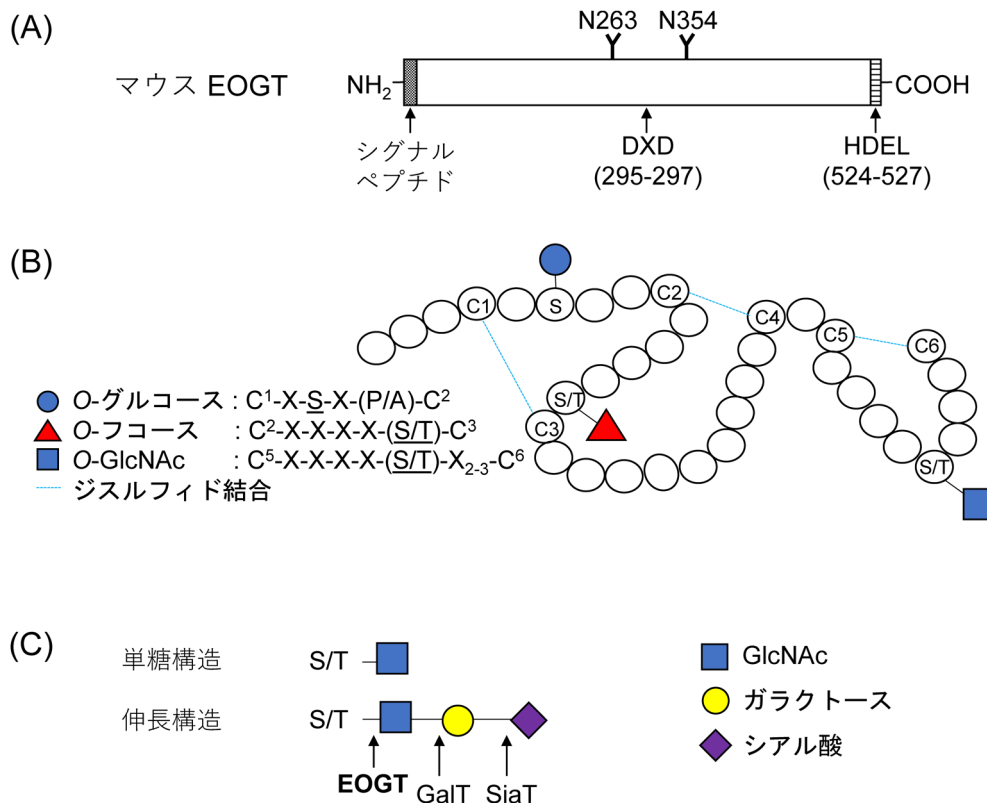


図1 EOGTによるO-GlcNAc修飾
 (A) EOGTの構造(文献7より引用)。(B) EOGTの基質となるEGFドメインとO-GlcNAc修飾の位置(Takeuchi, H. & Haltiwanger, R.S. (2010) *Semin Cell Dev Biol.* 21, 638-645より引用)。(C) O-GlcNAc修飾の構造。

ことに、*in vitro*酵素アッセイではEOGTの酵素活性は低下せず、N型糖鎖の欠損はEOGTの酵素活性に影響しないことが判明した⁷⁾。一方で、N型糖鎖の付加を阻害するツニカマイシンで処理したhuman embryonic kidney (HEK) 293T細胞やHeLa細胞では、EOGTの小胞体内での局在が変化し、核周辺と比べて小胞体辺縁のEOGTの分布率が低下した⁷⁾。よって、EOGTのN型糖鎖は、小胞体辺縁への局在に必要であることが明らかになった⁷⁾。

4. NOTCH受容体とO-GlcNAcの伸長構造

EOGTの基質となるEGFドメインは、30~40アミノ酸からなり、六つのシステインを含む。これらのシステイン残基が三つのジスルフィド結合を形成して、EGFドメインは三次元構造を構築する。EOGTは、EGFドメインの5番目と6番目のシステインの間にあるセリン/トレオニン残基[C⁵XXXX(T/S)X_{2,3}C⁶]にGlcNAcを転移する⁸⁾(図1B)。O-GlcNAc付加の正確な共通配列の確立は、さらなる研究が必要である。

EGFリピートを多数持つタンパク質は、複数のO-GlcNAcの修飾を受けることが多い。O-GlcNAcの糖プロテオーム解析は、S2細胞に発現させたショウジョウバ

エNOTCH受容体を用いて初めてなされた⁸⁾。NOTCH受容体は、I型膜貫通タンパク質で、その細胞外領域に36個のEGFリピートがある。五つのEGFドメイン(EGF4, EGF11, EGF12, EGF14, EGF20)は、高度にO-GlcNAcで修飾されていた。これらのO-GlcNAcは、単糖として検出される^{2,8)}。

一方、哺乳類のO-GlcNAcも単糖と考えられていた。しかし、O-GlcNAc以外のO型糖鎖であるO-フコースは、ゴルジ装置でGlcNAc転移酵素(Fringe)によってGlcNAcが付加されて伸長し、さらにβ1,4-ガラクトースとα2,3-シアル酸で修飾されることが知られている。よって、O-GlcNAcもガラクトースとシアル酸で伸長される可能性があった(図1C)。一昨年、HEK293T細胞から精製したマウスNOTCH1受容体のEGFドメイン領域の質量分析により、マウスNOTCH1受容体上のO-GlcNAcの修飾部位とその詳細な構造の大部分が明らかにされた⁹⁾(図2A)。O-GlcNAcは11個のEGFドメインに検出された⁹⁾。興味深いことに、修飾比率はさまざま、EGF14, EGF21およびEGF23は約90%の修飾比率であったが、EGF11とEGF28は約10%未満とごくわずかであった⁹⁾。O-GlcNAcの伸長構造(図1C)も存在し、EGF2で50%ほどの割合で検出され、最も比率が大きかった⁹⁾。EGF14の修飾は単糖であり、EGF21

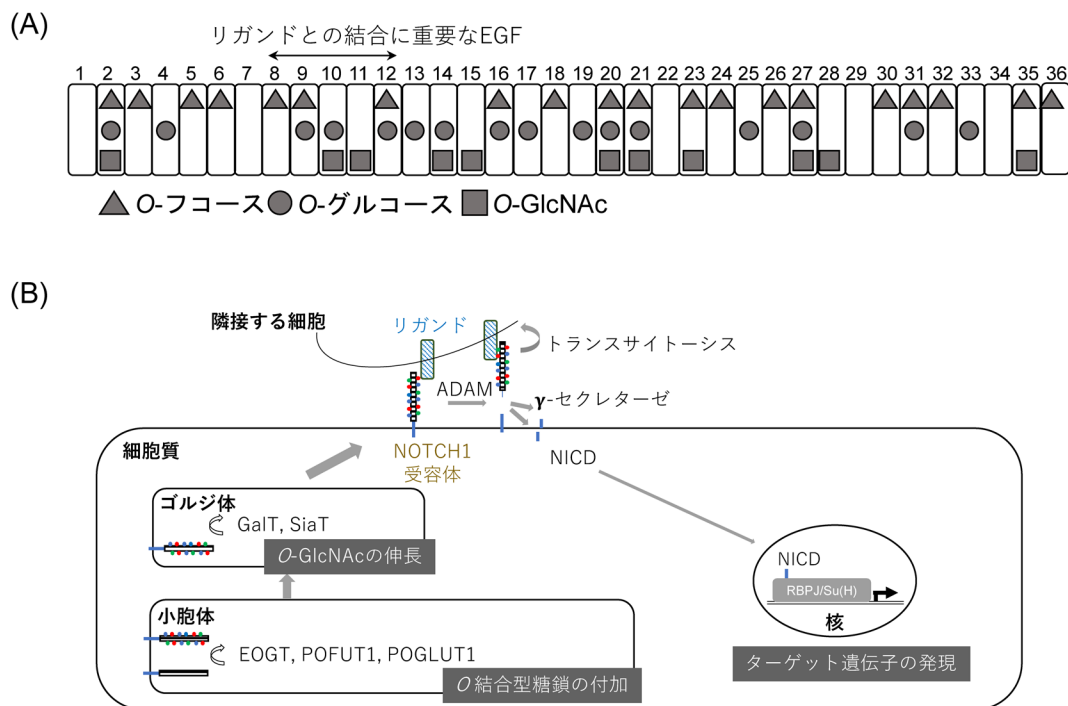


図2 NOTCH1受容体とO型糖鎖修飾

(A) マウスNOTCH1受容体のEGFリピート上のO型糖鎖修飾(文献9より引用)。(B) NOTCH1受容体の糖鎖付加の経路とNOTCHシグナル経路。NICD: Notch intracellular domain, EOGT: O-GlcNAc転移酵素, POFUT1: O-フコース転移酵素, POGLUT1: O-グルコース転移酵素, ADAM: a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif family metalloprotease. 赤色, 青色および緑色の○は糖鎖を表す。

とEGF23の修飾は80%が単糖で20%が伸長されていた⁹⁾。O-GlcNAcの伸長の有無がタンパク質の機能や構造にどのように影響するかはわかっておらず、今後の課題である。

5. O-GlcNAc修飾によるEGFの安定化

NOTCH受容体は、O-GlcNAc以外にO-フコースとO-グルコースの修飾も多数受ける(図1B, 図2A)。O-フコースはEGFドメインの3番目のシステインの直前にあるセリン/トレオニン残基に付加され、O-グルコースはEGFドメインの1番目と2番目のシステインの間にあるセリン残基に付加される(図1B)。これらO型糖鎖の組み合わせは、各EGFによってさまざまである。O-フコースとO-グルコースは、正しくフォールディングされたEGFに付加されることが知られている¹⁰⁾。それぞれの修飾は、一つのEGFに含まれる三つのジスルフィド架橋の中で前半の二つの架橋を補強する位置にあり(図1B)、実際にEGFの立体構造を安定化することが報告されている¹⁰⁾。一方、O-GlcNAcの修飾は、前半の二つの架橋とは独立した後半にある(図1B)。O-フコースやO-グルコースの欠損はNOTCH1受容体の細胞表面の発現量の大幅な低下を引き起こすが、O-GlcNAcの欠損では低下しない。これらのことから、O-GlcNAcは、EGF構造の安定化にあまり

影響しないと考えられた。しかし、最近、本研究室の小川・田嶋らによって、O-GlcNAcがEGFの立体構造を安定化することが新しく示された¹¹⁾。NOTCH1受容体の一部のEGF(EGF26~EGF33)のすべてのO型糖鎖の修飾部位に変異を導入すると、NOTCH1受容体は細胞表面に発現しないが、O-GlcNAc修飾の回復で発現する¹¹⁾。さらに、ショウジョウバエのNOTCH受容体のEGF20に dithiothreitol (DTT) でフォールディングの破壊を誘導した実験では、O-GlcNAcが付加されていると安定性が増して、誘導に必要なDTTの処理濃度が上昇しDTTへの抵抗性が増した¹¹⁾。また、西村らによって、NOTCH1受容体のEGF10とEGF11の間のつなぎ目の柔軟性と硬直性は、EGF10のO-GlcNAcで制御されることが示された¹²⁾。このように、O-GlcNAcは、EGF構造の不安定性を補強する。

6. 哺乳類におけるO-GlcNAcの生物学的機能

NOTCH1受容体は、小胞体で合成されて、O-フコース、O-グルコースおよびO-GlcNAc修飾を受けた後、ゴルジ体に運ばれて、O-GlcNAc修飾がさらに伸長される(図2B)。細胞表面に到達したNOTCH受容体は、隣接する細胞に発現するリガンドと結合する。そして、a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif family metallopro-

tease 10, 17 (ADAM10, ADAM17) によって切断され、さらに γ -セクレターゼによる切断を受けてNotch intracellular domain (NICD) が細胞膜から遊離する。NICDは、核に運ばれ、RBPJなどのターゲット遺伝子に作用する。

NOTCHシグナル伝達因子の遺伝子に異常が見つかる疾患の一つに、ヒト先天性疾患であるアダムス・オリバー症候群 (AOS) がある。AOSは、四肢の末端横肢欠損 (四肢の遠位構造の欠如または低形成) と、頭皮および頭蓋骨の欠損を特徴とする先天性切片形成不全を特徴とする¹³⁾。AOSは、しばしば血管異常および心臓障害を伴う¹³⁾。病理メカニズムは、いまだ解明されていない。AOS患者のゲノム配列の解析から、変異が見つかって原因遺伝子として同定されたものに、アクチン-細胞骨格調節因子 (*ARHGAP31*, *DOCK6*) とNOTCHシグナル伝達因子 (*NOTCH1*, *DLL4*, *RBPJ*, *EOGT*) がある。

AOS患者で検出されるEOGTのアミノ酸の変異は、W206S, R377Q, 359Dfs*28などがある。これらの変異は、酵素活性を低下させる¹⁴⁾。W206S変異は、EOGTのミスフォールディングを誘導し、細胞内局在の変化とユビキチン-プロテアソームシステムを介した分解が起こる¹⁴⁾。R377Q変異は、UDP-GlcNAcとの結合能が低下するが、正常なタンパク質の安定性と局在を示す¹⁴⁾。R377は、EOGTとドナー基質との結合を媒介するようである。

*Eogt*欠損マウスは、AOS患者とは異なり、肉眼的な異常は認められない¹⁵⁾。この理由は明らかではない。ヒトとマウスでは、四肢や頭皮の形態が大きく異なることから、表現型に関連するNOTCHシグナル依存的な発生プログラムが両者で異なることが考えられる。一方、*Eogt*変異マウスは、網膜の血管新生に障害が認められ、血管の分岐と血管前面での糸状突起の形成の増加が起こる¹⁵⁾。EOGTは、血管内皮細胞で高発現している。*Eogt*欠損マウスでは、血漿フィブリノーゲンの局所的な滲出も観察される。これらの表現型は、*Notch1*および*Rbpj*ヘテロ接合マウスの表現型と類似する。*Rbpj*は、Notchシグナル伝達経路の下流の遺伝子である (図2B)。*Eogt*^{-/-} *Notch1*^{+/-}または*Eogt*^{-/-} *Rbpj*^{+/-}の二重変異マウスで表現型が増強されることから、血管内皮細胞におけるNotchシグナル伝達の正確な制御にEOGTは必要である¹⁵⁾。*Eogt*欠損でO-GlcNAcが付加されなくても、NOTCH1受容体の細胞表面の発現量は影響されない^{11, 15)}。EOGTによってO-GlcNAcがNOTCH1受容体に付加されると、NOTCHリガンドの一つであるDLL4とNOTCH1受容体の結合が増強される¹⁵⁾。NOTCH1受容体のEGF2, EGF10, EGF17, EGF20のO-GlcNAcの修飾部位をアラニンに置換すると、DLL4-NOTCH1結合の増強効果は消失する¹⁵⁾。この4つのドメインのうち、EGF17は質量分析法によるO-GlcNAcの検出に成功していないが、EGF2, EGF10及びEGF20はO-

GlcNAc糖鎖が確認されている⁹⁾。これらのドメインの多くは、O-GlcNAc糖鎖の伸長を受けており、このことがDLL4との結合を増強することに寄与する可能性が考えられる。

7. おわりに

これまでの研究で、細胞外O-GlcNAcは、NOTCHシグナル経路を介する動物の発生過程や細胞外マトリックスの形成に重要であることが示されていたが、ようやく最近になって、O-GlcNAc糖鎖の存在を直接的に検出できるようになった。今後、さまざまな組織におけるO-GlcNAc糖鎖の発現様式の多様性による分子機能の変化についての理解が急速に進み、さまざまな生命現象におけるO-GlcNAc糖鎖の分子機能がひもとかれることが期待される。

文 献

- 1) Torres, C.R. & Hart, G.W. (1984) Topography and polypeptide distribution of terminal *N*-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for *O*-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.*, **259**, 3308-3317.
- 2) Matsuura, A., Ito, M., Sakaidani, Y., Kondo, T., Murakami, K., Furukawa, K., Nadano, D., Matsuda, T., & Okajima, T. (2008) *O*-linked *N*-acetylglucosamine is present on the extracellular domain of notch receptors. *J. Biol. Chem.*, **283**, 35486-35495.
- 3) Sakaidani, Y., Nomura, T., Matsuura, A., Ito, M., Suzuki, E., Murakami, K., Nadano, D., Matsuda, T., Furukawa, K., & Okajima, T. (2011) *O*-linked-*N*-acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interactions. *Nat. Commun.*, **2**, 583.
- 4) Ogawa, M. & Okajima, T. (2019) Structure and function of extracellular *O*-GlcNAc. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **56**, 72-77.
- 5) Sakaidani, Y., Ichianagi, N., Saito, C., Nomura, T., Ito, M., Nishio, Y., Nadano, D., Matsuda, T., Furukawa, K., & Okajima, T. (2012) *O*-linked-*N*-acetylglucosamine modification of mammalian Notch receptors by an atypical *O*-GlcNAc transferase *Eogt1*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **419**, 14-19.
- 6) Tashima, Y. & Stanley, P. (2014) Antibodies that detect *O*-linked β -D-*N*-acetylglucosamine on the extracellular domain of cell surface glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, **289**, 11132-11142.
- 7) Alam, S.M.D., Tsukamoto, Y., Ogawa, M., Senoo, Y., Ikeda, K., Tashima, Y., Takeuchi, H., & Okajima, T. (2020) *N*-Glycans on EGF domain-specific *O*-GlcNAc transferase (EOGT) facilitate EOGT maturation and peripheral endoplasmic reticulum localization. *J. Biol. Chem.*, **295**, 8560-8574.
- 8) Harvey, B.M., Rana, N.A., Moss, H., Leonardi, J., Jafar-Nejad, H., & Haltiwanger, R.S. (2016) Mapping sites of *O*-Glycosylation and fringe elongation on drosophila Notch. *J. Biol. Chem.*, **291**, 16348-16360.
- 9) Ogawa, M., Senoo, Y., Ikeda, K., Takeuchi, H., & Okajima, T. (2018) Structural divergence in *O*-GlcNAc glycans displayed on epidermal growth factor-like repeats of mammalian Notch1. *Molecules*, **23**, 1745.

- 10) Vasudevan, D., Takeuchi, H., Johar, S.S., Majerus, E., & Haltiwanger, R.S. (2015) Peters plus syndrome mutations disrupt a noncanonical ER quality-control mechanism. *Curr. Biol.*, **25**, 286–295.
- 11) Ogawa, M., Tashima, Y., Sakaguchi, Y., Takeuchi, H., & Okajima, T. (2020) Contribution of extracellular O-GlcNAc to the stability of folded epidermal growth factor-like domains and Notch1 trafficking. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **526**, 184–190.
- 12) Nishimura, S.I. & Yokoi, Y. (2020) Effect of Site-specific O-glycosylation on the structural behavior of NOTCH1 receptor extracellular EGF-like domains 11 and 10. *Chemistry*, **26**, 12363–12372.
- 13) Hassed, S., Li, S., Mulvihill, J., Aston, C., & Palmer, S. (2017) Adams-Oliver syndrome review of the literature: Refining the diagnostic phenotype. *Am. J. Med. Genet. A.*, **173**, 790–800.
- 14) Ogawa, M., Sawaguchi, S., Kawai, T., Nadano, D., Matsuda, T., Yagi, H., Kato, K., Furukawa, K., & Okajima, T. (2015) Impaired O-linked N-acetylglucosaminylation in the endoplasmic reticulum by mutated epidermal growth factor (EGF) domain-specific O-linked N-acetylglucosamine transferase found in Adams-Oliver syndrome. *J. Biol. Chem.*, **290**, 2137–2149.
- 15) Sawaguchi, S., Varshney, S., Ogawa, M., Sakaidani, Y., Yagi, H., Takeshita, K., Murohara, T., Kato, K., Sundaram, S., Stanley, P., et al. (2017) O-GlcNAc on NOTCH1 EGF repeats regulates ligand-induced Notch signaling and vascular development in mammals. *eLife*, **6**, e24419.

著者寸描

●田島 優子 (たしま ゆうこ)

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。医学 (博士)。

■略歴 2006年大阪大学大学院医学系研究科博士課程修了。07年から米国アルバートアインシュタイン大学ポスドク。12年から国立循環器病研究センター研究所、大阪大学微生物病研究所助教を経て、17年より現職。

■研究テーマと抱負 アミノ酸配列に加えて立体構造や環境などによって影響を受ける糖鎖修飾の制御機構と糖鎖の意義を明らかにする基礎研究。細胞外O-GlcNAcの分子機能を明らかにして、面白い研究分野として広がるようにしていきたい。

■ウェブサイト <https://www.med.nagoya-u.ac.jp/seika2/>

■趣味 読書、映画鑑賞。

●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/