

上皮成長因子ドメインを修飾する特異的 O-結合型糖鎖

岡 島 徹 也

上皮成長因子ドメインを修飾する O-結合型糖鎖は、古くから行なわれてきた尿や血漿由来のタンパク質のアミノ酸配列解析より、その特異構造の存在が知られていたが、生理機能の解析は進んでいなかった。近年、ドメイン特異的 O-結合型糖鎖の修飾に関わる糖転移酵素が同定され、その機能が解析されるに従い、機能的な重要性に迫ることができるようになった。興味深いことに、これらの糖鎖は、生体機能に重要なタンパク質を特異的に修飾し、タンパク質機能の発現や関連する生物学的プロセスの制御に重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。本レビューでは、著者らが関わって来た上皮成長因子ドメインの糖鎖修飾を中心に、新たな糖修飾の構造と機能について、歴史的な背景も含めて紹介したい。

1. はじめに

糖鎖修飾は、タンパク質の翻訳後修飾の中でも古典的かつ普遍的なものである。糖鎖は、主として細胞表面や細胞外基質に豊富に存在し、細胞環境や細胞間相互作用に重要な役割を果たすと考えられている。糖鎖構造の代表例として、N-結合型糖鎖、ムチン型糖鎖、そしてグリコサミノグリカンがあり、その生合成経路や生合成に関わる糖転移酵素と合成酵素遺伝子もほぼ同定された。また、糖修飾反応を標的とした阻害剤が開発されており、これらの化合物や糖転移酵素遺伝子を用いて細胞レベル、個体レベルで糖鎖構造を改変することで、糖鎖機能の多彩な役割の一端が明らかにされつつある。糖鎖修飾の変化は多様なタンパク質機能に影響を及ぼすため、細胞機能や生体反応を統合的に調整するものと考えられていたが、近年、特定のタンパク質機能をも制御できることが明らかになりつつある。こ

うした新たな糖鎖の生理機能の発現には、古典的な糖鎖修飾とは異なる特殊な糖修飾が関与している。こうした新たな糖鎖構造は量的に稀であり、よって生化学的解析が困難であるため、その生理機能の解析は遅れていた。しかしながら、生合成に関わる酵素遺伝子の同定が徐々に進むにつれて、新型糖鎖の機能が解明されつつある。驚くべきことに、これらの糖鎖は生体機能に重要なタンパク質の機能を特異的に修飾し、個別の生物学的プロセスの制御に重要な役割を果たすことが明らかになってきた¹⁾。本レビューでは、著者らがこれまで関わって来た上皮成長因子ドメインの糖鎖修飾を中心にして、新たな糖修飾の構造と生理機能について、概説する。

2. 非典型的な糖鎖修飾

新しいタイプの糖鎖の存在を示す最初のきっかけは、ヒトの尿の分析から得られた知見による。1975年に Hallgren らにより、Glcβ1-3Fucα-スレオニンという奇妙なアミノ酸グリコシド (O-結合型フコース) が同定された²⁾。一般に、フコースは非還元末端に位置する糖であることから、非常に例外的な糖鎖構造であり、由来するタンパク質が当時不明であったため、この発見は当時ほとんど関心を集めなかった。その後、20年以上経過して Hofsteenge らにより、Glcβ1-3Fucα-の 2 糖構造は、トロンボスポンジン 1 (TSP1) のトロンボスポンジン 1 型リピート (TSR) を修飾していることが明らかにされた³⁾。その間、1980 年代後半には、

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 (〒466-8550 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65)

Specific O-glycosylation modifying epidermal growth factor domains

Tetsuya Okajima (Nagoya University Graduate School of Medicine, Center for Neural Disease and Cancer, 65 Tsuruma-Cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan)

本総説は 2010 年度奨励賞を受賞した。

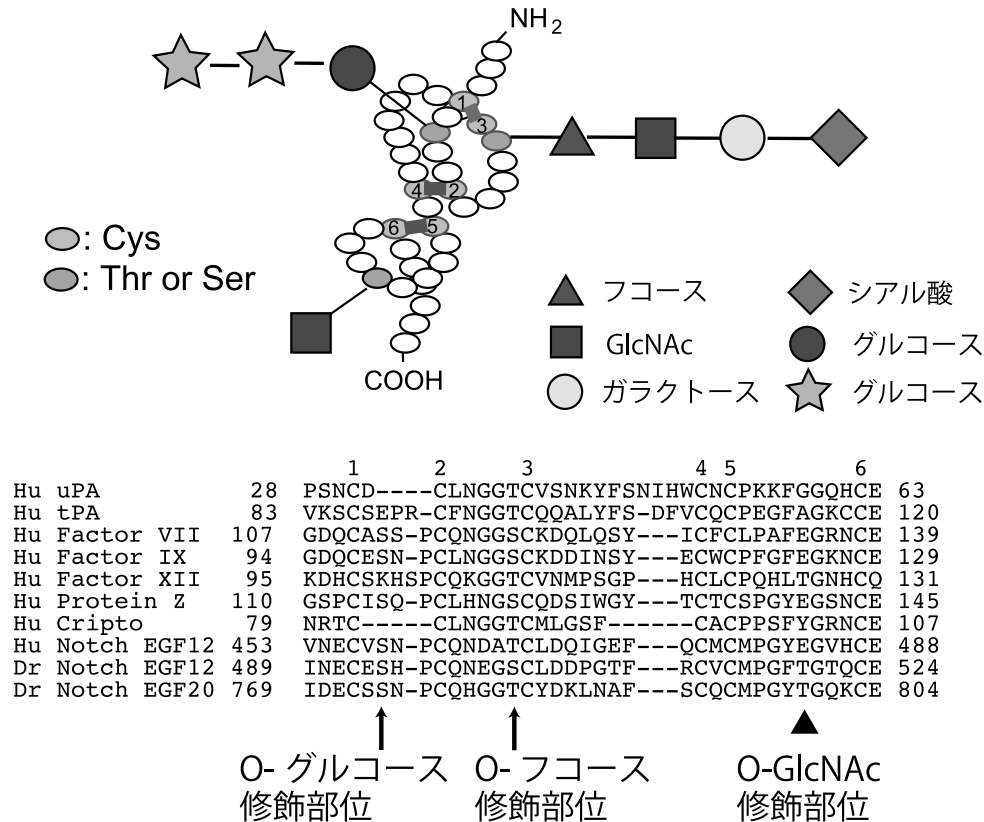


図1 上皮成長因子ドメインにおけるO-結合型糖鎖

上図に典型的なEGFドメインのO-結合型糖鎖修飾構造を模式的に示す。必ずしも、すべてのEGFドメインがこのような構造を取る訳ではないことに注意されたい(本文参照)。下は、O-結合型糖鎖が同定されたタンパク質の例と、付加部位を示す。O-GlcNAc修飾はショウジョウバエNotch受容体のEGF20において、存在が確認された。その他のタンパク質ドメインにおけるO-GlcNAc修飾の有無は不明である。文献1より一部改変。

尿や血漿のタンパク質のアミノ酸配列解読の過程で、長谷・岩永らのグループによりウシの第Ⅶ因子の上皮成長因子(EGF)ドメインに、O-結合型グルコースが発見された⁴⁾。また、ウロキナーゼの上皮成長因子ドメインにも、O-結合型フコースの存在が明らかにされた^{5,6)}。

上皮成長因子ドメインは6個の保存されたシステイン残基が3個のジスルフィド結合を作ることによって定義される小さなモチーフ構造で、基本的に30から40アミノ酸で構成されている(図1)。そして、N末端とC末端にアンチパラレル型βシート構造を持つ2個のサブドメインに分割できる⁷⁾。EGFドメインは、後生動物における基本的なモジュールであり、何百もの細胞表面もしくは分泌タンパク質に見出される。EGFドメインは、一般的なN-型糖鎖による修飾を受ける場合もあるが、それ以外にN末端側のサブドメインが、O-グルコース型糖鎖、O-フコース型糖鎖で修飾される。最近、我々のグループは、C末端側のサブドメインもまた、O-GlcNAcによる修飾を受けることを明らかにした⁸⁾。これらの糖鎖の生理機能として、主にNotch受容体機能における役割を中心に解析が進められて

いる。

3. O-フコース型糖鎖

EGFドメインのO-フコース型糖鎖修飾が、ウロキナーゼ型プラスミノージェンアクチベータ(u-PA)において見出されたのに続き^{5,6)}、組織プラスミノージェンアクチベータ(tPA)⁹⁾、血液凝固因子Ⅶ¹⁰⁾、Ⅸ¹¹⁾、Ⅻ¹²⁾に含まれるEGFドメインにおいても同様な構造が同定された。また、コウモリの唾液プラスミノージェンも同様にO-フコシル化されることが明らかにされた¹³⁾。最近になり、EGFドメイン特異的なO-結合型糖鎖は、細胞内シグナル伝達に関連する分子でも同定されている。このような例として、Notch受容体とそのリガンド(Delta, Serrate/Jagged)がある^{14,15)}。Notch受容体の細胞外領域は36個のEGFドメインがタンデムに並んだりリピート構造(EGFリピート)をとっており、その多くのEGFドメインがO-フコース型修飾を受ける^{16,17)}。リガンド結合領域に存在するEGF12のO-フコース型修飾部位は進化的に保存されており、実際にショウジョウバエから哺乳動物において修飾されることが示されており、

O-フコース型修飾の重要性を示唆している。さらに、Notch 受容体や左右軸形成に關与する Nodal シグナルの補助因子である Cripto も O-フコース修飾を受ける^{18,19)}。

O-フコースによる修飾は、EGF ドメインの3番目の保存されたシステインの直前に位置するセリンもしくはスレオニン残基上に生じる。O-フコシル化のためのコンセンサス配列は、EGF ドメインの2番目 (C2) から数えて4~5番目で、3番目 (C3) の直前に位置する CX4-5 (S/T) C という配列であることが提唱されており、さほど厳密な配列は必要としないようである。O-フコシル化に關わる酵素は、O-フコース転移酵素1 (POFUT1/ショウジョウバエでは OFUT1) と呼ばれる。POFUT1 は、GDP-フコースをドナー基質として用いて、上記配列を持った EGF ドメインにフコースを O-結合で付加する。現在のところ、POFUT1 が EGF ドメイン以外に存在する配列に対して糖転移活性を示す例は知られていない。それは、POFUT1 が、フォールディングされた EGF ドメインを特異的に認識して、糖転移をするためと考えられている。実際、正しいジスルフィド結合をもたない変性した EGF ドメインに対して、POFUT1 は酵素活性を示さない。POFUT1 は、小胞体に局在する糖転移酵素であり、タンパク質の O-フコシル化も小胞体で起きると考えられている。小胞体においては、後述するように EGF リピートのフォールディングの過程で、タンパク質品質管理に關与すると考えられている。

O-フコースは単糖として存在する場合もあるが、非還元末端構造が伸長された構造も存在する。例えば、ヒトの凝固因子 IX の EGF-1、そしてマウス Notch1 の EGF-26 においては、4糖からなる Sia α 2-3/6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3 Fuc-O-セリン/スレオニンという構造に伸長される^{11,20,14)}。しかしながら、ヒト凝固因子 VII 因子の1番目の EGF ドメインや、マウス Notch1 の3番目の EGF ドメインでは単糖のままである。これらの構造の違いの決定に關与するのは、Fringe (フリンジ) と呼ばれる O-フコース特異的な N-アセチルグルコサミン転移酵素 (β 3GnT) である。Fringe の発現様式は、時空間的に制御されていることが報告されている。よって、Fringe を発現しない細胞においては、O-フコースに GlcNAc 転移が起きないため、単糖のままとなる。しかしながら、Fringe 発現細胞においても、必ずしもすべての O-フコースが GlcNAc による修飾を受けるといふ訳ではない。これらの違いは、Fringe の基質特異性により説明され、Fringe は一部の O-フコシル化された EGF ドメインを認識し、GlcNAc 転移を行なう。特異性を決める分子機構は明らかではないが、Fringe が O-フコースに GlcNAc を転移するには、EGF ドメインが特定の構造を取っていないといけないようである。それは、必ずしも、O-フコシル化部位の周辺の配列による一次構造ではなく、より複雑な EGF ドメイン全体の立体構造に起因すると考

えられている。従って、特定の EGF ドメインが Fringe により糖鎖伸長を受けるか否かは、現在のところ O-フコシル化部位の周辺配列からは類推できない。しかしながら、POFUT1 と同様に Fringe も、フォールディングされた EGF ドメインに対して特異的に糖転移を触媒するため、EGF ドメイン以外に作用する例は知られていない。

Fringe は、ショウジョウバエにおける、分泌性の Notch シグナルの制御因子として知られていたが、その後の解析から実際は糖転移酵素として作用することが明らかにされた。Fringe には3種類の哺乳類のホモログがあり、Manic Fringe, Lunatic Fringe, Radical Fringe と呼ばれる。これらの3種類の酵素は、基質特異性の点からは大きな差はないと考えられているが、生体では、後述するように Lunatic Fringe (L-Fringe) が主要な役割をしているようである。Fringe により、O-Fuc-GlcNAc という構造が生じると、哺乳動物では普遍的に発現している他の糖転移酵素の作用でさらに糖鎖構造が伸長される。すなわち、N-アセチルグルコサミン残基には、 β 4 ガラクトース転移酵素 (β 4GalT) により β 1-4 結合でガラクトースが付加され、最終的に α 2-3 または α 2-6 結合のシアル酸が付加される。同様な糖鎖修飾は、ショウジョウバエでは確認されていないが、代わりにグルクロン酸による修飾、すなわち GlcNAc β 1-3 (GlcA β 1-4) Fuc という糖鎖構造を取る可能性が考えられている²¹⁾。

4. O-フコース型糖鎖の生理機能

O-フコース型糖鎖は、EGF 様リピートと他のタンパク質との相互作用を変化させることで、シグナル伝達経路を調整することができる。EGF ドメインの O-フコシル化の重要性を示唆する初めてのデータは、ウロキナーゼ型のプラスミノゲンアクチベーター (u-PA) の解析から得られた。糖鎖を持たない組換えタンパク質や化学的処理により糖を除いた u-PA を用いることで、フコースを欠失した u-PA はウロキナーゼ受容体と結合できるものの、活性化できないことが示された²²⁾。また、O-フコシル化部位の Thr を Ala に変えたヒトとマウスの Cripto が Nodal シグナルを促進する機能を失うことが報告されている^{18,19)}。しかしながら、その後の研究結果より、Cripto の場合は、Thr 上の O-フコースでなく、Thr 残基自体が Nodal シグナルに必要と報告され²³⁾、Cripto における O-フコシル化の意義は現時点では不明である。

Notch 受容体の O-フコース型糖鎖による機能制御は、受容体の糖鎖変化が、シグナル伝達経路を制御するメカニズムにおける明瞭な具体例の一つの言うことができよう。Notch は、多くの発達段階に關与する細胞表面受容体であり、元々は、ショウジョウバエで同定されたものである。一方、哺乳類には4種類の Notch レセプターがあり、

Notch のホモログはすべての後生動物で見ついている。Notch の活性化がシグナル伝達の過程の様々なレベルで調節されることが正常な発生に重要であり、Notch シグナル伝達の異常は、様々な腫瘍性疾患や、いくつかの稀な先天性疾患の原因となる。Notch 受容体には、2種類のリガンド (Delta と Serrate/Jagged) が存在する。哺乳類には、3種類の Delta ホモログ (Delta-like 1, 3 と 4) と 2つの Serrate ホモログ (Jagged-1 と -2) が存在する。これらのリガンドは一回膜貫通型糖タンパク質であり、受容体発現細胞と隣接した細胞の表面に発現し、Notch と結合し活性化することができる。Notch の EGF リピートはリガンドとの相互作用に必要であり、EGF リピートの多くは O-フコシル化を受けるコンセンサス配列を含んでいるため、O-フコース型糖鎖は Notch 受容体とリガンド間の相互作用の制御に中心的な役割を果たすと考えられている。実際に、Notch 受容体における O-フコシル化部位の変異は、Notch 受容体機能に影響を与える。EGF12 の Thr を Ala に変えると Jagged1 や Delta に対する Notch1 の反応が弱まることから²⁴⁾、この O-フコシル化が Notch シグナルに必要であると考えられる。一方で、ショウジョウバエの Notch 受容体 EGF12 について同様の実験を行うと Fringe 存在下でも Serrate により Notch シグナルが活性化された。この場合は、O-フコシル化サイトは Fringe により Serrate-Notch シグナルが阻害される機構に必要だと考えられる²⁵⁾。これらの研究から EGF12 が生理学的に重要な O-フコシル化サイトを持つことが明らかにされた。これらの他にも EGF26, 27 の O-フコシル化サイトに変異を加えるとそれぞれ Notch 受容体を過剰に活性化したり、細胞膜への輸送に障害が起こるというように、進化的に保存された O-フコシル化サイトの重要性が報告されている²⁴⁾。これらの結果は、さらに、以下に詳述するように、O-フコース型糖鎖の生合成に関わる糖転移酵素の変異体の解析とも一致することから、O-フコース型糖鎖が Notch 受容体の機能に重要な役割を果たしていることは間違いないと考えられる。

5. Fringe 関連遺伝子

O-フコース型糖鎖の Notch シグナルにおける役割を解明する大きな手がかりとなったのは、ショウジョウバエにおける Fringe の変異体である。Fringe は、Ken Irvine らにより、翅の原基 (wing disc) の背腹の境界を決めるのに必要な因子として同定された²⁶⁾。その後の研究で、Fringe が Notch とリガンド間の相互作用を調節することが明らかになり、Notch 受容体を糖修飾する糖転移酵素であることが証明された^{27, 28)}。現在のところ、Fringe は Notch とリガンド間の結合能を変化させることで、Notch シグナルを制御すると説明されている (図 2)。すなわち、Fringe 非発現細胞と発現細胞の間で比較した場合 Fringe 非発現細胞で

は、発現細胞に比べて、リガンドの 1 つである Serrate との結合性が増強する。一方、もう 1 つのリガンドである Delta との結合に関しては、逆に、Fringe 発現細胞の方が、非発現細胞に比べて結合能が高い。よって、Notch 受容体の O-フコース型糖鎖構造の変化が、2種類のリガンドの Notch 受容体に対する作用に違いを与えることを可能にしている^{28, 29)}。哺乳類では 4 つの Notch 受容体 (Notch1-4) と 5 つのリガンド (Delta1/3/4 と Jagged1/2)、そして 3 タイプの Fringe (L-fng, R-fng, M-fng) の組み合わせが可能であり、Fringe の機能には多様性がある可能性がある。しかしながら、基本的には、哺乳類の Fringe もショウジョウバエのそれと同様なメカニズムによりリガンド/受容体間の相互作用を制御すると考えられており、Jagged1 依存性の Notch シグナルを阻害し、Delta1 と Notch1, 2 の結合能を増強すると報告されている³⁰⁾。マウスの L-fringe は体節形成における Notch シグナルを制御しており、L-fng の異常は体節形成の異常を引き起こす^{31, 32)}。

現在、まだ解明されていない大きな問題は、O-フコース型糖鎖がどのような分子機構で Notch 受容体とリガンド間の相互作用を制御するかという点である。最も可能性のある答えとして、O-フコースの Fringe を介した糖鎖の伸長が Notch とそのリガンドの間の親和性を変化させるというモデルである。Fringe はリガンド結合部位の一部である EGF リピートの 12 番目の O-フコース残基を修飾することによって Notch とリガンドの間の相互作用を直接変化させるのかもしれない。もしくは、Notch の細胞外領域の構造の変化を引き起こすことによって、間接的に働くモデルも考えられる¹⁶⁾。最近、報告された Notch 受容体のリガンド結合部位の立体構造解析によると、EGF12 の O-フコシル化部位はリガンド結合部位とは離れている³³⁾。これは、前者のモデルを支持しないものである。

6. O-フコース転移酵素 1

O-フコース転移酵素 1 は小胞体に局在し、EGF ドメインの O-フコシル化を触媒する可溶性糖転移酵素で^{29, 34)}、ショウジョウバエから哺乳動物にかけて進化的に保存されている。O-フコシル化の機能的な重要性は *Pofut1/Ofut1* 変異体の研究により明らかにされた。ショウジョウバエと哺乳類両方について、*Pofut1/Ofut1* が欠損すると Notch の機能欠損体と類似した表現型を示した^{35, 36)}。この結果は *Pofut1/Ofut1* が Notch シグナルに必須であることを示している。Fringe の変異体が Notch シグナルに依存したプロセスの一部のみに影響を与えるのに対して、ショウジョウバエの *Ofut1* の変異体や RNAi による発現抑制が、強い Notch 欠損に類似した表現型を呈することから、Notch の O-フコース修飾が適切な Notch の機能にとって不可欠であることが示唆された。マウス *Pofut1* の変異体は胚性致死

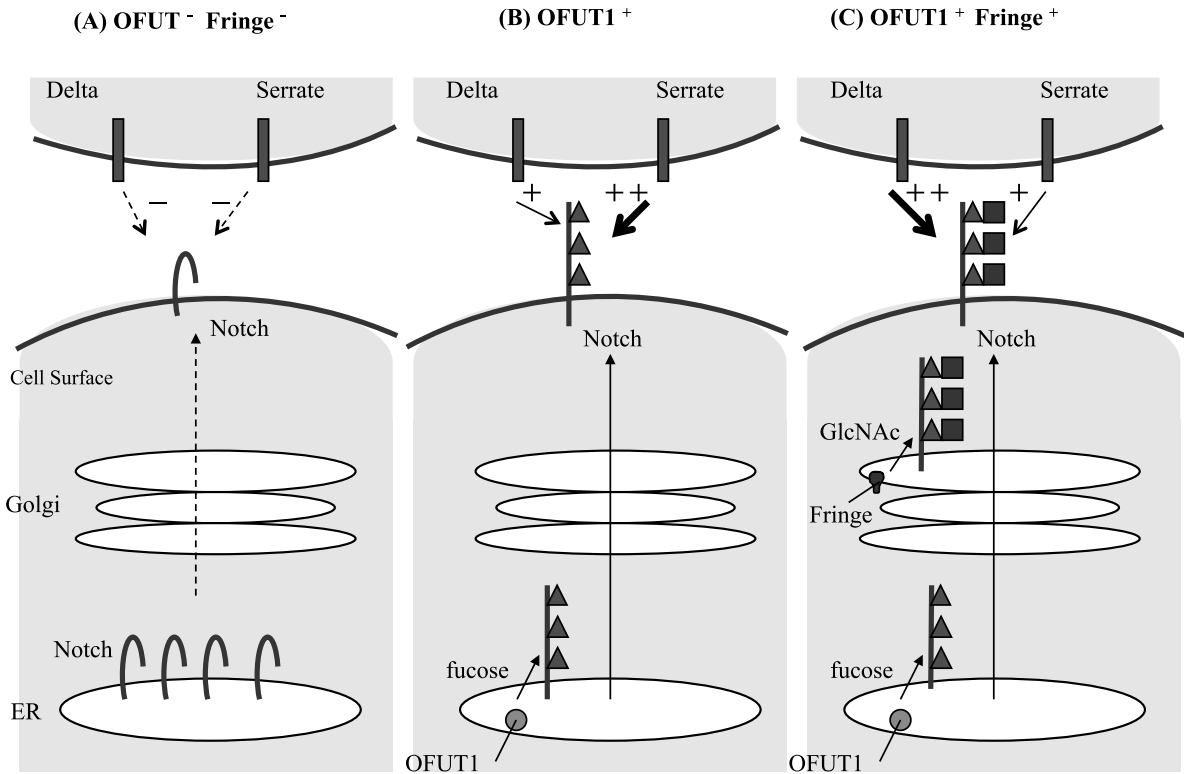


図2 O-結合型糖鎖による Notch 受容体とリガンドの相互作用の制御
 OFUT1 と Fringe による Notch 受容体機能の制御機構を模式的に示した。OFUT1 の変異細胞では、Notch 受容体とリガンド間の結合が失われる (A)。ショウジョウバエ S2 細胞においては、Notch 受容体の細胞膜上への発現レベルが低下することも示されている。Fringe 非発現細胞と発現細胞の間で比較した場合、Fringe 非発現細胞では、発現細胞に比べて、リガンドの1つである Serrate との結合性が増強する (B)。もう1つのリガンドである Delta との結合に関しては、逆に、Fringe 発現細胞の方が、非発現細胞に比べて結合能が増強される (C)。http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/fertilization/FS-AO2J.html より転載。

の表現型を示し、個々の Notch レセプターの変異体よりも重篤な表現型を示した。このことから、4種類存在する Notch レセプターのすべてが、シグナルを伝達するために Pofut1 の機能を必要とすることが示唆された。

Pofut1/Ofut1 は Notch 受容体の細胞内局在や機能に関与することが示されている (図3)。ショウジョウバエで OFUT1 が欠損すると Notch 受容体が細胞内に蓄積して細胞膜表面に局在できない³⁷⁾。そこで、Notch 受容体が細胞膜表面に局在できるようになるためには、OFUT1 依存的な Notch 受容体のフォールディングが必要であると考えられる。このモデルは、*Ofut1* 変異細胞で Notch 分泌が阻害され、Notch 受容体が小胞体に異常に蓄積するという知見により支持される。さらに、Notch の細胞表面への発現が、酵素活性を喪失した OFUT1 の変異体によりレスキューされることから、OFUT1 にシャペロン様な機能があることが考えられる³⁷⁾。また、分泌型の OFUT1 が、細胞表面の Notch 受容体と結合してエンドサイトーシスを促進することも報告されている^{36,38)}。これらの知見を総合すると、OFUT1 が、Notch 受容体のトラフィッキングの様々な局面において、機能発現に重要な働きをしている可

能性が示唆される³⁹⁾。Pofut1 欠損マウスの前体節中胚葉では、同様に、Notch1 の局在の異常が報告されている⁴⁰⁾。しかしながら、Pofut1 を欠損したマウス ES 細胞では、Notch 受容体の細胞膜上への局在に大きな影響がないことが示されており、Pofut1/Ofut1 の役割が、細胞や組織間で異なる可能性も考えられる⁴¹⁾。

7. O-フコース型糖修飾構造の伸長

哺乳類では GlcNAc β 1,3Fuc- α -O-Ser/Thr の2糖構造は、非還元末端がガラクトースとシアル酸による更なる修飾を受け、最終的に4糖構造となる。この反応は β 1,4-ガラクトース転移酵素とシアル酸転移酵素による。ガラクトース転移とシアル酸転移には、おそらく、N-またはO-型糖鎖に作用するものと同じ糖転移酵素が関与すると考えられる。2糖から4糖への糖鎖構造の伸長が、Notch 受容体の活性調整に必要なかどうか、糖鎖合成に障害をもつチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) の変異体を使った実験により検討された。その結果、Gal β 1,4GlcNAc β 1,3-Fuc の3糖構造が、Fringe 依存的な Notch シグナルの調節に必要な最小構造であることが報告された⁴²⁾。しかしながら、

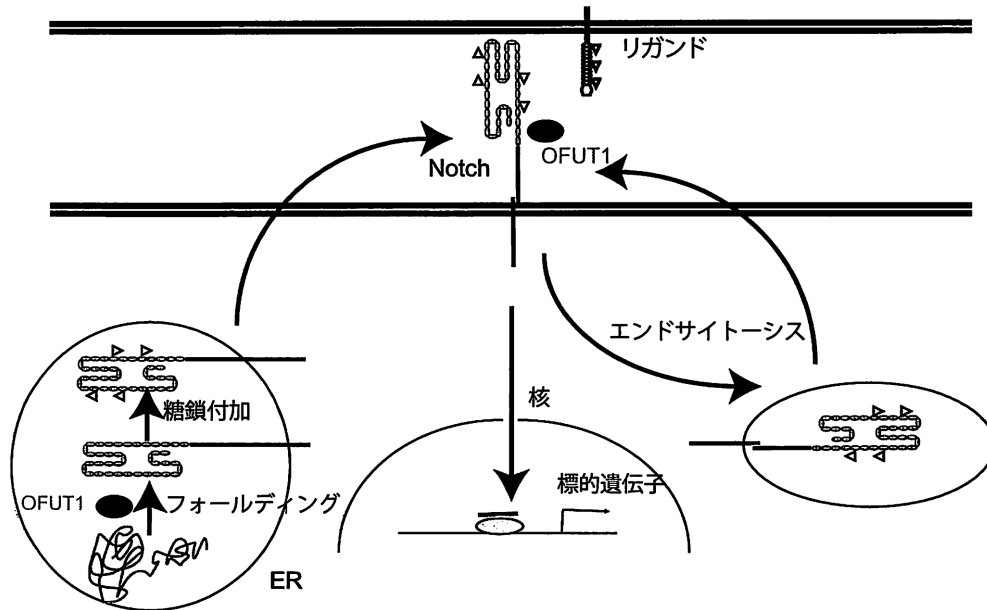


図3 Notch 受容体機能における O-フコース転移酵素 1 の多様な役割

OFUT1 は小胞体に局在し、EGF ドメインの O-フコシル化を触媒する可溶性糖転移酵素であるが、細胞外にも一部が、分泌される。OFUT1 は酵素機能とは別に、小胞体において EGF リピートのフォールディングを促進する作用を有すると考えられている。また、分泌型の OFUT1 が細胞表面の Notch 受容体と結合して、エンドサイトーシスを促進する作用も報告されている。文献 1 より一部改変。

ショウジョウバエ S2 細胞に Fringe を発現させた際の O-フコース型糖鎖構造は GlcNAc β 1, 3-Fuc の 2 糖であり⁴³⁾、これ以上の糖鎖の伸長は Fringe による Notch-リガンド間の結合能の制御には必要ではない。哺乳動物とショウジョウバエの間で Fringe の効果に必要なとされる糖鎖構造の違いが、Notch とリガンドの結合様式の違いによるものか否かは、将来の興味深い検討課題である。

8. O-グルコース型糖鎖と役割

O-グルコース型糖鎖は、ウシ血液凝固因子 VII の 1 番目の EGF ドメインのセリン残基の修飾として見つかった^{44,4)}。その後、同様の修飾がウシと人の血液凝固因子 IX^{4,45)}、プロテイン Z でも報告されている⁴⁵⁾。O-グルコース型糖鎖付加に必要なコンセンサス配列は、1 番目と 2 番目の保存されたシステイン残基間に存在する CXSXPC 配列と考えられている。一般的には、Xyl α 1, 3-Xyl α 1, 3Glu β -O-Ser という三糖構造を取っているが、単糖で存在する場合もある。同様の構造がウシのトロンボスポニン⁴⁶⁾、Pref-1⁴⁷⁾でも見つかっている。さらに、Notch 受容体の EGF ドメインにもこの配列を持つものがあり、そのうちのいくつかは実際に O-グルコース修飾されることが確認されている¹⁴⁾。O-グルコース型糖鎖も、O-フコース同様に EGF ドメインを持つタンパク質の機能を制御させることが知られている。例えば、血液凝固因子 VII の EGF ドメ

イン中の O-グルコース型修飾が起こる Ser を Ala に変えると、血液凝固活性が減少することが報告されている¹⁰⁾。O-グルコース化を触媒する糖転移酵素は、Rumi と呼ばれている⁴⁸⁾。興味深いことに、Rumi の変異体は、温度依存的に Notch 変異体の表現型を示すことが明らかにされた。その分子メカニズムは明らかでないが、Rumi は Notch 受容体の構造やトラフィッキングに重要な役割を果たすと考えられている。POFUT1 と同様に、Rumi は ER に局所し、基質として正しくフォールディングされた EGF ドメインを必要とする。また、2 つのキシロース転移酵素のうち、グルコースにキシロースを転移する糖転移酵素が単離されている⁴⁹⁾。しかしながら、キシロースの機能は、現在のところ不明である。

9. β -ヒドロキシ化

糖修飾以外にも、アスパラギン酸やアスパラギン残基の β -ヒドロキシ化が起きることが報告されている。修飾部位は、3 番目と 4 番目のシステイン残基の間の C³XD/NXXXXY/FXC⁴XC⁵ 配列である。アスパラギン酸 (アスパラギン) β -ヒドロキシラーゼが欠損しているマウスが Notch リガンド (Jagged-2) を欠損したマウスと類似した発生異常を示すことから、この修飾は Notch シグナル伝達を微調整している可能性が考えられる⁵⁰⁾。

10. O-GlcNAc 型糖鎖

O-GlcNAc 修飾は、従来、細胞内タンパク質に特徴的な翻訳後修飾として知られていたが、最近、我々のグループは細胞外にも O-GlcNAc 修飾が存在することを明らかにすることができた。細胞外タンパク質における O-GlcNAc 修飾の存在が最初に示唆されたのは、MALDI-TOF-MS による Notch の EGF リピート上の糖鎖修飾の解析結果においてであった。ショウジョウバエ Notch 受容体の 20 番目の EGF ドメイン (EGF20) は、O-フコース、O-グルコース修飾のコンセンサス配列を有しており、S2 細胞に発現させた培養上清から Notch EGF20 を精製し、MALDI-TOF-MS 解析を行なったところ、deoxyhexose (+146)、HexNAc (+204)、hexose (+162)、そして pentose (+132) の存在が示された。この HexNAc は当初、O-フコース上の GlcNAc 修飾である可能性も考慮したが、S2 細胞では Fringe の発現レベルが低く、O-フコースの GlcNAc 修飾は起きないと考えられた。そこで、HexNAc が付加されるペプチドを単離するため、EGF20 のトリプシン消化産物を単離し、ペプチドを含む全ての画分の MALDI-TOF-MS/MS 解析を行なった。その結果、HexNAc 修飾を受けたペプチド EGF20 [26-41] が単離され、Thr38 が O-HexNAc 修飾を受けることが明らかになった。実際に、Thr を Ala に置換した EGF20 の変異体 (Δ HexNAc) を作製したところ、HexNAc 修飾に対応した質量数の増加は消失した。また、HexNAc 修飾が結合様式特異的な β -N-アセチルヘキサミンダーゼにより消化を受けること、さらに β 1,4 ガラクトース転移反応によりガラクトース付加を受けることから、O- β -GlcNAc 修飾であることが示唆された。細胞質タンパク質や核タンパク質で起こる O-GlcNAc 修飾に対する特異的抗体として、CTD110.6 抗体が広く使われている⁵¹⁾。Notch の EGF20 に O- β -GlcNAc 修飾が起こるのかどうかが確かめるために、培養上清から単離した野生型 EGF20 と Δ HexNAc を CTD110.6 抗体による Western ブロットを行なったところ、 Δ HexNAc 変異体ではシグナルが検出されず、野生型 EGF20 でのみ検出された。また、種々の EGF リピート欠失変異体を用いた解析を行なったところ、EGF1-10 と EGF22-32 は O-GlcNAc 抗体で検出されたものの、EGF6-10 は検出されなかった。このことから EGF1-5 と EGF22-32 において、それぞれ少なくとも 1 箇所ずつの O-GlcNAc 修飾部位をもつことが示唆された。同様の実験から、Notch のリガンドである Delta の EGF リピートもまた O-GlcNAc 修飾されることがわかった (図 4)。また、Kc 細胞に発現する内在性 Notch においても、細胞外領域 O-GlcNAc 修飾が確かめられた。

従来から知られている細胞内 O-GlcNAc 修飾は、細胞

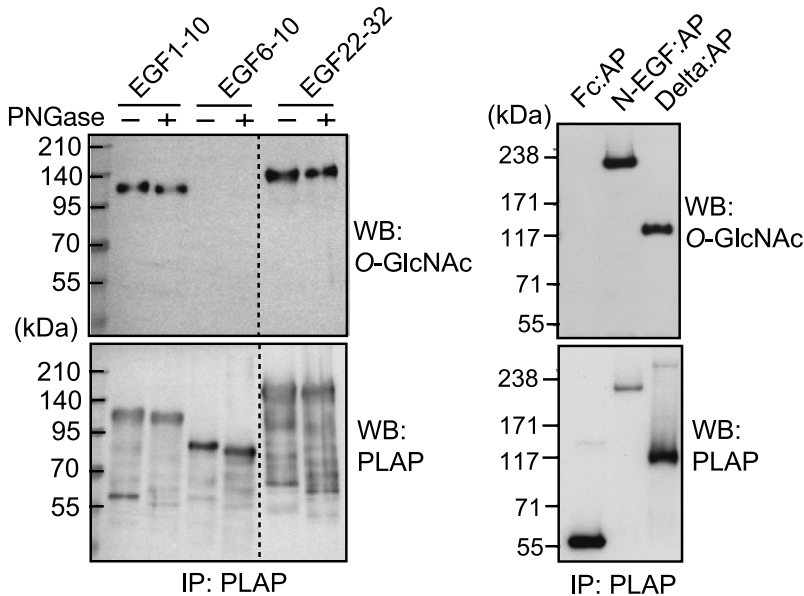
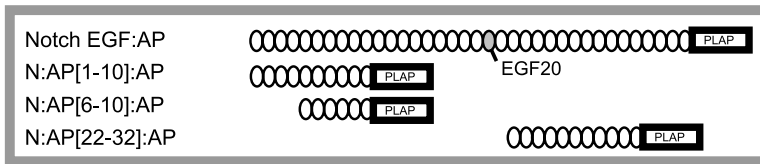
質に局在する O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) により行われる⁵²⁾。基本的に Notch 受容体の EGF リピートにおける糖修飾は、小胞体あるいはゴルジ体に局在する糖転移酵素によって生じるため、EGF リピート上の O-GlcNAc 修飾は、OGT 非依存的なプロセスにより触媒されると考えられる。ゴルジ体の O-GlcNAc 転移酵素は、*Dictyostelium*⁵³⁾ や *Trypanosoma cruzi*⁵⁴⁾ のような真核微生物で報告されているが、これらのスレオニン・セリン残基の GlcNAc 修飾は、 α 結合を介して起こる。したがって、Notch EGF リピートの O-GlcNAc 修飾に関わる O-GlcNAc 転移酵素は、真核微生物におけるゴルジ体の O-GlcNAc 転移酵素とは異なると予想される。この考えに一致して、ショウジョウバエ・マウス・ヒトのゲノム配列中で *Dictyostelium* の O-GlcNAc 転移酵素のホモログ遺伝子は同定されていない。Notch EGF20 の O-GlcNAc 修飾は単糖として同定されたが、細胞により糖鎖構造が異なる可能性を考えると、場合によっては伸長構造をとる可能性がある。 β 1,4 ガラクトース転移酵素は *in vitro* において、O-GlcNAc にガラクトース付加する活性があるため、哺乳動物では NeuAc-Gal-GlcNAc に伸長される可能性がある。

O-フコシル化あるいは O-グルコシル化を受けるタンパク質のうち血液凝固因子 VII/IX、プラスミノーゲンアクチベーター、Protein Z などの血漿糖タンパク質は予想修飾部位に Ser/Thr 残基をもたないため、O-GlcNAc 修飾を受けない。一方、Notch 受容体と Notch リガンドには、O-GlcNAc 付加を受けうる Ser/Thr 残基が存在する。ヒト Notch1 とショウジョウバエ Notch の EGF リピートのアミノ酸配列比較により、EGF ドメインの 20 箇所を超える部位に、O-GlcNAc 修飾されうる Ser/Thr 残基が存在することが明らかとなった。これらの O-GlcNAc 部位がヒトとショウジョウバエの Notch において高度に保存されていることから、Notch 依存的な生物学的プロセスの制御に、O-GlcNAc 修飾が関与している可能性が示唆される。EGF ドメインの O-GlcNAc 修飾の生理学的意義は現時点では不明であるが、Notch 受容体を始めとした EGF リピートをもつタンパク質の機能制御に関与する可能性があると考えている。また、O-GlcNAc と O-フコースや O-グルコース型糖鎖の間で機能的な重複があるか否かも興味深い検討課題である。EGF ドメインの O-GlcNAc 修飾を担う糖転移酵素遺伝子を単離し、その機能を明らかにすることで、この新規の翻訳後修飾の生物学的役割を解明することが可能となるであろう。

11. おわりに

本総説においては、EGF ドメイン型糖鎖の構造と機能における最近の話題までを取り上げた。EGF ドメイン以外にも、タンパク質を特異的に糖鎖修飾する例は多く知ら

A



B

	human N1	Dros. N
EGF1	C-GGAFVCPRC	CDSHVYVDYC
EGF2	C-ALGFSGPLC	CPLGFDESTC
EGF3	C-PPCWSGKSC	CANGYTCERC
EGF4	C-PPSFHGPTE	CPFGFTGDTT
EGF5	C-RATHTCFNC	CPTGYTGKDC
EGF6	C-LPGFTGQNC	CPKGFEGKNC
EGF7	C-PPEWTGOYC	CPPNFTGRFC
EGF8	C-VNGWTGEDC	CVNGTAGLDC
EGF9	C-PHGRTCGLLC	CTRCKTGLLC
EGF10	C-PSGYTGPAK	CATGTVKGVDC
EGF11	C-LQGYTGPRC	CSQGFTCPRC
EGF12	C-MPGYEGVHC	CMGFTGTQTC
EGF13	C-PTGFTGHLK	CALGFTGARC
EGF14	C-TEGYTGTHC	CPFGYTGTSK
EGF15	C-RFGYTGHHK	CDPGYTGKTC
EGF16	C-LKGTGPNK	COAGTSGKNC
EGF17	C-EPGYTGSMK	CVFPGTGHKC
EGF18	C-PEGYHDPTK	CPKGFYDAHC
EGF19	C-DEGWSGTNC	CPFGYTGKRC
EGF20	C-REGFSGPNC	CMGFTGTQKC
EGF21	C-LLPYTGATK	CKVFTGTRDC
EGF22	CPTACAKGQTC	CKLGYTGRCY
EGF23	C-QAGYSGRNC	CTKGYEGRDC
EGF24	C-LPGFRGTFK	CVDGFDGKHC
EGF25	C-PACFSGIHK	CPLCFSGINC
EGF26	C-PPGFTGSYC	CLAGYSGANC
EGF27	C-PQGYTGPNK	CPSGFTGKQC
EGF28	C-PSGWTGLYC	CSAGWTGKLC
EGF29	C-QAGYTGSYK	CSQGYAGSYK
EGF30	C-VAGYHGVNC	CRQGFEGQNC
EGF31	C-PRGTCGVHC	CPFGTGTGIC
EGF32	C-PPGFVGERK	CPFGVYVARK
EGF33	C-RAGHTGRRK	CRPCHMGRHK
EGF34	C-PAGTEGATK	CNNGEYKKNK
EGF35	C-LGFTTGPEK	CPKFTLGEHK
EGF36	C-PAKFNGLLK	CPSKYKGRK

図4 上皮成長因子ドメインのO-GlcNAc修飾

Notch受容体とDeltaのO-GlcNAc修飾(A-C)と、修飾部位周辺のアミノ酸配列のアライメント(D)を示す。Notch受容体のEGFリピート全長にPLAP(胎盤アルカリフォスファターゼ)を融合させたタンパク質ならびに、EGFリピート内の一部のドメインを欠失させた変異体を作製した(A)。O-GlcNAc抗体により、EGF1-10とEGF22-32にO-GlcNAc修飾が検出された(B)。また、Deltaの細胞外領域にもO-GlcNAc修飾が検出された(C)。O-GlcNAc修飾部位に相当するセリン/スレオニン残基は、ヒトNotchとDrosophila Notchに多数存在することが確認された。文献8より、改変して掲載。

れており、特にO-マンノース型糖鎖は α -ジストログリカンの機能を調整し、またその異常がある種の先天性筋ジストロフィーの原因となるなど、生理機能や病態との関連性の理解が進んでいる⁵⁵。また、TSRドメインのO-フコシル化についても、Pofut2の遺伝子欠損マウスの解析を通じて、生理機能の解析が進んでいる⁵⁶。一方、TSRドメインのC-マンノシル化など、これからの機能解析が待たれるものもある。我々が見出した細胞外でのO-GlcNAc修飾の生理学的重要性は今のところわかっていないが、Notch受容体を含むEGFリピートをもつタンパク質における、新規のGlcNAc依存的制御と関わる可能性があると考えている。最近、我々はO-GlcNAcにより制御される新たなEGFリピートタンパク質としてDumpyを見出している(投稿中)。これらの、タンパク質機能を特異的に制御する糖鎖修飾の分子機構の理解は、より複雑な糖鎖修飾による多様なタンパク質機能の調節機能の理解への大きな手がかりになるものと期待できる。

本稿の一部の研究は、名古屋大学大学院生命農学研究科分子生体制御研究室、名古屋大学大学院医学系研究科生化学第2講座、米国ラトガース大学ワクスマン研究所において行なわれました。本研究にご協力頂きました、名古屋大学の松田幹先生、灘野大太先生、古川鋼一先生、Ken Irvine先生に感謝致します。

文 献

- Okajima, T., Matsuura, A., & Matsuda, T. (2008) *J. Biochem.*, 144, 1-6.
- Hallgren, P., Lundblad, A., & Svensson, S. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 5312-5314.
- Hofsteenge, J., Huwiler, K.G., Macek, B., Hess, D., Lawler, J., Mosher, D.F., & Peter-Katalinic, J. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 6485-6498.
- Hase, S., Kawabata, S., Nishimura, H., Takeya, H., Sueyoshi, T., Miyata, T., Iwanaga, S., Takao, T., Shimonishi, Y., & Ikenaka, T. (1988) *J. Biochem. (Tokyo)*, 104, 867-868.
- Kentzer, E.J., Buko, A., Menon, G., & Sarin, V.K. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171, 401-406.

- 6) Buko, A.M., Kentzer, E.J., Petros, A., Menon, G., Zuiderweg, E.R., & Sarin, V.K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3992–3996.
- 7) Montelione, G.T., Wuthrich, K., Nice, E.C., Burgess, A.W., & Scheraga, H.A. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8594–8598.
- 8) 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.
- 9) Harris, R.J., Leonard, C.K., Guzzetta, A.W., & Spellman, M. W. (1991) *Biochemistry*, **30**, 2311–2314.
- 10) Bjoern, S., Foster, D.C., Thim, L., Wiberg, F.C., Christensen, M., Komiyama, Y., Pedersen, A.H., & Kisiel, W. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 11051–11057.
- 11) Nishimura, H., Takao, T., Hase, S., Shimonishi, Y., & Iwanaga, S. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 17520–17525.
- 12) Harris, R.J., Ling, V.T., & Spellman, M.W. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 5102–5107.
- 13) Gohlke, M., Baude, G., Nuck, R., Grunow, D., Kannicht, C., Bringmann, P., Donner, P., & Reutter, W. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 7381–7386.
- 14) Moloney, D.J., Shair, L.H., Lu, F.M., Xia, J., Locke, R., Matta, K.L., & Haltiwanger, R.S. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 9604–9611.
- 15) Panin, V.M., Shao, L., Lei, L., Moloney, D.J., Irvine, K.D., & Haltiwanger, R.S. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 29945–29952.
- 16) Haines, N. & Irvine, K.D. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **4**, 786–797.
- 17) Haltiwanger, R.S. (2002) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 593–598.
- 18) Yan, Y.T., Liu, J.J., Luo, Y., E, C., Haltiwanger, R.S., Abate-Shen, C., & Shen, M.M. (2002) *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 4439–4449.
- 19) Schiffer, S.G., Foley, S., Kaffashan, A., Hronowski, X., Zichitella, A.E., Yeo, C.Y., Miatkowski, K., Adkins, H.B., Damon, B., Whitman, M., Salomon, D., Sanicola, M., & Williams, K.P. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 37769–37778.
- 20) Harris, R.J., van Halbeek, H., Glushka, J., Basa, L.J., Ling, V. T., Smith, K.J., & Spellman, M.W. (1993) *Biochemistry*, **32**, 6539–6547.
- 21) Aoki, K., Porterfield, M., Lee, S.S., Dong, B., Nguyen, K., McGlamry, K.H., & Tiemeyer, M. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 30385–30400.
- 22) Rabbani, S.A., Mazar, A.P., Bernier, S.M., Haq, M., Bolivar, I., Henkin, J., & Goltzman, D. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 14151–14156.
- 23) Shi, S., Ge, C., Luo, Y., Hou, X., Haltiwanger, R.S., & Stanley, P. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 20133–20141.
- 24) Rampal, R., Arboleda-Velasquez, J.F., Nita-Lazar, A., Kosik, K.S., & Haltiwanger, R.S. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 32133–32140.
- 25) Lei, L., Xu, A., Panin, V.M., & Irvine, K.D. (2003) *Development*, **130**, 6411–6421.
- 26) Irvine, K.D. & Wieschaus, E. (1994) *Cell*, **79**, 595–606.
- 27) Moloney, D.J., Panin, V.M., Johnston, S.H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K.D., Haltiwanger, R.S., & Vogt, T.F. (2000) *Nature*, **406**, 369–375.
- 28) Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H., & Cohen, S. (2000) *Nature*, **406**, 411–415.
- 29) Okajima, T., Xu, A., & Irvine, K.D. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 42340–42345.
- 30) Yang, L.T., Nichols, J.T., Yao, C., Manilay, J.O., Robey, E.A., & Weinmaster, G. (2005) *Mol. Biol. Cell.*, **16**, 927–942.
- 31) Evrard, Y.A., Lun, Y., Aulehla, A., Gan, L., & Johnson, R.L. (1998) *Nature*, **394**, 377–381.
- 32) Zhang, N. & Gridley, T. (1998) *Nature*, **394**, 374–377.
- 33) Cordle, J., Johnson, S., Tay, J.Z., Roversi, P., Wilkin, M.B., de Madrid, B.H., Shimizu, H., Jensen, S., Whiteman, P., Jin, B., Redfield, C., Baron, M., Lea, S.M., & Handford, P.A. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 849–857.
- 34) Luo, Y. & Haltiwanger, R.S. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 11289–11294.
- 35) Okajima, T. & Irvine, K.D. (2002) *Cell*, **111**, 893–904.
- 36) Sasamura, T., Ishikawa, H.O., Sasaki, N., Higashi, S., Kanai, M., Nakao, S., Ayukawa, T., Aigaki, T., Noda, K., Miyoshi, E., Taniguchi, N., & Matsuno, K. (2007) *Development*, **134**, 1347–1356.
- 37) Okajima, T., Xu, A., Lei, L., & Irvine, K.D. (2005) *Science*, **307**, 1599–1603.
- 38) Sasaki, N., Sasamura, T., Ishikawa, H.O., Kanai, M., Ueda, R., Saigo, K., & Matsuno, K. (2007) *Genes Cells*, **12**, 89–103.
- 39) Okajima, T., Reddy, B., Matsuda, T., & Irvine, K.D. (2008) *BMC Biol.*, **6**, 1.
- 40) Okamura, Y. & Saga, Y. (2008) *Mech. Dev.*, **125**, 663–673.
- 41) Stahl, M., Uemura, K., Ge, C., Shi, S., Tashima, Y., & Stanley, P. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 13638–13651.
- 42) Chen, J., Moloney, D.J., & Stanley, P. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 13716–13721.
- 43) Xu, A., Haines, N., Dlugosz, M., Rana, N.A., Takeuchi, H., Haltiwanger, R.S., & Irvine, K.D. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 35153–35162.
- 44) Takeya, H., Kawabata, S., Nakagawa, K., Yamamichi, Y., Miyata, T., Iwanaga, S., Takao, T., & Shimonishi, Y. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 14868–14877.
- 45) Nishimura, H., Kawabata, S., Kisiel, W., Hase, S., Ikenaka, T., Takao, T., Shimonishi, Y., & Iwanaga, S. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 20320–20325.
- 46) Nishimura, H., Yamashita, S., Zeng, Z., Walz, D.A., & Iwanaga, S. (1992) *J. Biochem. (Tokyo)*, **111**, 460–464.
- 47) Krogh, T.N., Bachmann, E., Teisner, B., Skjodt, K., & Hojrup, P. (1997) *Eur. J. Biochem.*, **244**, 334–342.
- 48) Acar, M., Jafar-Nejad, H., Takeuchi, H., Rajan, A., Ibrani, D., Rana, N.A., Pan, H., Haltiwanger, R.S., & Bellen, H.J. (2008) *Cell*, **132**, 247–258.
- 49) Sethi, M.K., Buettner, F.F., Krylov, V.B., Takeuchi, H., Nifantiev, N.E., Haltiwanger, R.S., Gerardy-Schahn, R., & Bakker, H. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 1582–1586.
- 50) Dinchuk, J.E., Focht, R.J., Kelley, J.A., Henderson, N.L., Zolotarjova, N.I., Wynn, R., Neff, N.T., Link, J., Huber, R.M., Burn, T.C., Rupa, M.J., Cunningham, M.R., Selling, B.H., Ma, J., Stern, A.A., Hollis, G.F., Stein, R.B., & Friedman, P.A. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 12970–12977.
- 51) Whelan, S.A. & Hart, G.W. (2006) *Methods Enzymol.*, **415**, 113–133.
- 52) Haltiwanger, R.S., Grove, K., & Philipsberg, G.A. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 3611–3617.
- 53) Wang, F., Metcalf, T., van der Wel, H., & West, C.M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 51395–51407.
- 54) Previano, J.O., Sola-Penna, M., Agrellos, O.A., Jones, C., Oeltmann, T., Travassos, L.R., & Mendonca-Previano, L. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 14982–14988.
- 55) Endo, T., Manya, H., Seta, N., & Guicheney, P. (2010) *Methods Enzymol.*, **479**, 343–352.
- 56) Du, J., Takeuchi, H., Leonhard-Melief, C., Shroyer, K.R., Dlugosz, M., Haltiwanger, R.S., & Holdener, B.C. (2010) *Dev. Biol.*, **346**, 25–38.