

れた。機能の分かっている局所神経回路の結合様式の発達を前例にないほど詳細に明らかにすることができた。また、他のグループにより、GFP標識されたON-OFF型DSGCsとスターバースト細胞からのダブルパッチクランプが行われ、やはり発達期に抑制性結合が空間的に対称的な状態から非対称的な状態に変化するという結果が、我々の結果とほぼ同時に出版された<sup>8)</sup>。

## 8. おわりに

これらの知見から、スターバースト細胞からDSGCsへの抑制性入力、網膜がまだ光応答性を獲得する以前の早い時期において、2日間という非常に短い期間で再編成されて対称的な状態から非対称的な状態へとスイッチすることが明らかになった。それではどのような内在的な遺伝子プログラムによりこの抑制性入力のスイッチングが達成されるのだろうか？ DSGCsの嗜好方向の軸が決定される際の、スターバースト細胞あるいはDSGCsに方向の情報を与える分子機構として、bone morphogenetic proteinのように網膜上で背腹軸あるいは耳鼻軸に沿って非対称的な勾配を持って発現する分子<sup>15)</sup>が関与することが想定される。神経領域の体軸に沿った非対称性を基盤にして神経接続の空間的非対称性が生み出される分子機構の解明が、網膜のDSGCsの研究からもたらされることが予想される。更にそれらの知見は、大脳皮質の方位選択性細胞などが持つ神経接続の空間的非対称性の構造や発達の基本原理を明らかにする上で役に立つと期待される。

- 1) Barlow, H.B. & Hill, R.M. (1963) *Science*, 139, 412-414.
- 2) Kim, I.-J., Zhang, Y., Yamagata, M., Meister, M., & Sanes, J. R. (2008) *Nature*, 452, 478-482.
- 3) Euler, T., Detwiler, P.B., & Denk, W. (2002) *Nature*, 418, 845-852.
- 4) Fried, S.I., Muench, T.A., & Werblin, F.S. (2002) *Nature*, 420, 411-414.
- 5) Yoshida, K., Watanabe, D., Ishikane, H., Tachibana, M., Pastan, I., & Nakanishi, S. (2001) *Neuron*, 30, 771-780.
- 6) Briggman, K.L., Helmstaedter, M., & Denk, W. (2011) *Nature*, 471, 183-188.
- 7) Fried, S.I., Muench, T.A., & Werblin, F.S. (2005) *Neuron*, 46, 117-127.
- 8) Wei, W., Hamby, A.M., Zhou, K., & Feller, M.B. (2011) *Nature*, 469, 402-406.
- 9) Sun, L., Han, X., & He, S. (2011) *PLoS One*, 6, e19477.
- 10) Elstrott, J., Anishchenko, A., Greschner, M., Sher, A., Litke, A. M., Chichilnisky, E.J., & Feller, M.B. (2008) *Neuron*, 58, 499-506.
- 11) Rochefort, N.L., Narushima, M., Grienberger, C., Marandi, N., Hill, D.N., & Konnerth, A. (2011) *Neuron*, 71, 425-432.

- 12) Yonehara, K., Shintani, T., Suzuki, R., Sakuta, H., Takeuchi, Y., Nakamura-Yonehara, K., & Noda, M. (2008) *PLoS One*, 3, e1533.
- 13) Yonehara, K., Ishikane, H., Sakuta, H., Shintani, T., Nakamura-Yonehara, K., Kamiji, N.L., Usui, S., & Noda, M. (2009) *PLoS One*, 4, e4320.
- 14) Yonehara, K., Balint, K., Noda, M., Nagel, G., Bamberg, E., & Roska, B. (2011) *Nature*, 469, 407-410.
- 15) Sakuta, H., Takahashi, H., Shintani, T., Etani, K., Aoshima, A., & Noda, M. (2006) *J. Neurosci.*, 26, 10868-10878.

米原 圭祐

(Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research)

Function, structure and development of directionally selective circuits in the retina

Keisuke Yonehara (Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Maulbeerstrasse 66, 4058, Basel, Switzerland)

## 細胞分化をコントロールする翻訳後修飾： O-GlcNAc

### 1. はじめに

核・細胞質・ミトコンドリアタンパク質には、Ser/Thr残基側鎖水酸基を介して1分子のN-アセチルグルコサミンが付加する翻訳後修飾が起こる(O-GlcNAc修飾, 図1)<sup>1)</sup>。発見当初、O-GlcNAc修飾の標的としてSp1などの転写因子や核膜孔複合体タンパク質が同定されたのを契機に続々とO-GlcNAc修飾タンパク質がリストアップされ、現在ではその数は1,000に上る<sup>1)</sup>。最近、名古屋大の岡島徹也らにより、Notch受容体など細胞膜タンパク質の細胞外ドメインにもO-GlcNAc構造の糖修飾が見出されているが<sup>2)</sup>、これは小胞体で行われる分泌系タンパク質への糖修飾であり、核・細胞質・ミトコンドリアタンパク質のO-GlcNAc修飾とは修飾・代謝のメカニズムや生理機能が本質的に異なると考えられる。本稿では、核・細胞質・ミトコンドリアタンパク質のO-GlcNAc修飾について述べる。

### 2. O-GlcNAc修飾と細胞分化

O-GlcNAc修飾は、ヘキソサミン生合成経路(hexosamine biosynthetic pathway, HBP)の最終代謝産物であるUDP-GlcNAcをドナーとして、O-GlcNAc transferase (OGT)により付加され、O-GlcNAcaseによって遊離される(図1)<sup>1)</sup>。

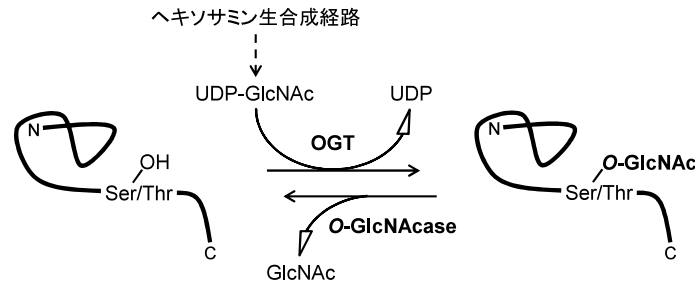


図1 核・細胞質・ミトコンドリアタンパク質の *O*-GlcNAc 修飾  
多細胞真核生物の核・細胞質・ミトコンドリアタンパク質には、Ser/Thr 残基側鎖水酸基を介して1分子の *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が付加される糖修飾 (*O*-GlcNAc 修飾) が起こる。この修飾は、ヘキソサミン生成経路の最終代謝産物 UDP-GlcNAc を供与糖スクレオチドとして、*O*-GlcNAc 転移酵素 (OGT) により付加され、*O*-GlcNAcase により遊離される代謝回転の速い翻訳後修飾である。ほ乳類では、OGT、*O*-GlcNAcase ともに1遺伝子のみコードされている。*O*-GlcNAc 修飾は、ほ乳類の発生や細胞分化に不可欠である。

OGT、*O*-GlcNAcase ともに核・細胞質局在酵素である<sup>1)</sup>。ミトコンドリアにおける *O*-GlcNAc 修飾はミトコンドリア局在型 OGT により行われると考えられるが<sup>1)</sup>、*O*-GlcNAcase のミトコンドリア局在は十分検証されておらず、ミトコンドリアタンパク質 *O*-GlcNAc 修飾の制御メカニズム解明は今後の課題である。*O*-GlcNAc 修飾の半減期は、標的タンパク質の半減期よりも短いので<sup>1)</sup>、*O*-GlcNAc 修飾はリン酸化と同様、動的に代謝制御される翻訳後修飾である。*O*-GlcNAc 修飾の生物界での分布を見ると、脊椎動物<sup>1)</sup>、棘皮動物<sup>2)</sup>、節足動物<sup>1)</sup>、線形動物<sup>1)</sup>には *O*-GlcNAc 修飾システムが備わっているが、酵母や大腸菌には認められない。また、シロイヌナズナなどの高等植物にも *O*-GlcNAc 修飾が存在する可能性が示唆されている<sup>4)</sup>。よって、*O*-GlcNAc 修飾は、細胞分化や組織形成を要する多細胞真核生物が獲得した翻訳後修飾であるのかもしれない。実際に、*ogt* ノックアウト (KO) マウス ES 細胞は生存できず、*ogt*-KO マウスは発生できない<sup>5,6)</sup>。ニューロン特異的 *ogt*-KO マウスは大半が胎生致死となり、稀に誕生しても生後10日以上は生存できない<sup>6)</sup>。T細胞特異的 *ogt*-KO マウスではT細胞のアポトーシスが生じ、繊維芽細胞特異的 *ogt*-KO マウスでは繊維芽細胞の増殖停止が生じる<sup>9)</sup>。このように、*ogt*-KO マウスを用いた解析から、多細胞真核生物のうち少なくともほ乳類では、発生・細胞分化に *O*-GlcNAc 修飾システムが不可欠であると考えられる。では、ほ乳類の発生・細胞分化過程で *O*-GlcNAc 修飾がどのような働きを示すのだろうか？ 我々は、この点に迫るべく、間葉系細胞に注目して分化に伴う *O*-GlcNAc 修飾の動

態を解析し、細胞系譜ごとの *O*-GlcNAc 修飾の特徴と必要性を検証してきた<sup>7,8)</sup>。

### 3. 間葉系細胞分化と *O*-GlcNAc 修飾

分化研究モデルとして汎用されている間葉系細胞株を用い、脂肪成熟分化、ならびに骨格筋分化に伴う *O*-GlcNAc 修飾の変動を追跡したところ、各々の分化に特有の *O*-GlcNAc 修飾制御が行われていた。

マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 では、脂肪成熟分化依存的に細胞当りの *O*-GlcNAc 修飾量が劇的に増加した<sup>7)</sup>。修飾量は2段階で増加し、1段階目は脂肪前期分化制御転写因子 C/EBP $\beta$  発現時である。そして、2段階目は脂肪後期分化制御因子 C/EBP $\alpha$  発現とそれに伴うアディポネクチン発現量増加、脂肪滴成熟肥大化と同じタイミングである。修飾量の増加と一致して OGT 発現量も段階的に増加していることから、脂肪成熟に伴う *O*-GlcNAc 修飾量増加は、主として OGT 発現制御によって調節されていると考えられる。なお、脂肪成熟に伴い、単に細胞当りの *O*-GlcNAc 修飾量が増加するだけでなく、他に比べ顕著に *O*-GlcNAc 修飾レベルが増加するタンパク質がある。ビメンチンとユーイング肉腫タンパク質 (Ewing sarcoma protein, EWS) である。成熟分化に伴い、ビメンチン、EWS の *O*-GlcNAc 修飾レベルはそれぞれ約 3.7 倍、約 5.4 倍に増加していた。ビメンチンは、脂肪滴形成に必須の中間径フィラメントであり、脂肪成熟分化に伴い、繊維状からかご状構造に変化する<sup>9)</sup>。よって、ビメンチンのかご状構造形成が *O*-GlcNAc 修飾によって調節されているのかもしれな

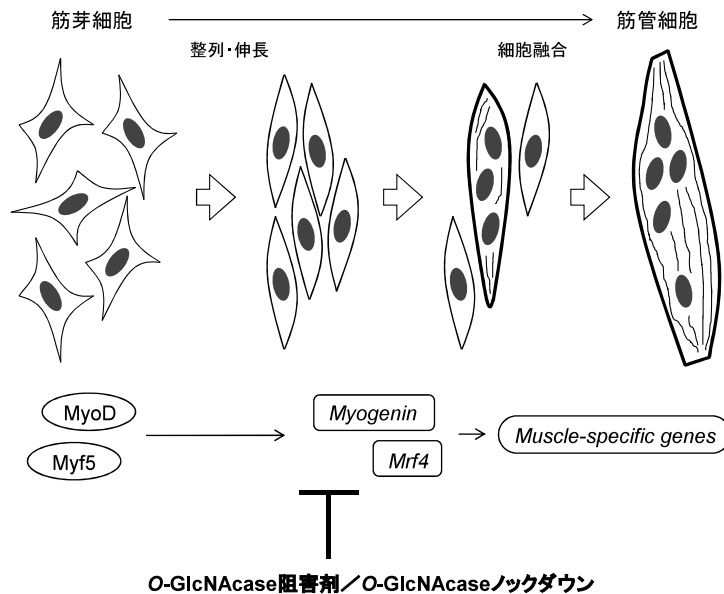


図2 骨格筋分化に対する *O*-GlcNAcase 阻害効果

筋分化に伴い、筋芽細胞は整列・伸長する。MyoD による *myogenin* 発現の誘導を契機に、筋特異遺伝子群の発現と細胞融合による筋管形成が進行する。Myf5 は MyoD と同時期に筋芽細胞で発現している。*Mrf4* は *myogenin* と同時期に発現する。*O*-GlcNAcase 阻害または発現抑制により、*myogenin* と *mrf4* 発現が抑制され、その後の筋分化プログラムが進行しない。

い。EWS は、RNA 結合タンパク質であり、転写や RNA スプライシングとの関わりが示唆されているが<sup>10)</sup>、明確な機能は不明である。我々は、成熟脂肪細胞 EWS の *O*-GlcNAc 修飾部位、ならびに EWS と複合体を形成するタンパク質の同定を試みており、脂肪細胞における EWS の機能と *O*-GlcNAc 修飾による EWS の活性制御メカニズムを明らかにしたいと考えている。脂肪成熟分化にとって、*O*-GlcNAc 修飾量増加は必然であるか、それとも結果に過ぎないのか、我々はまだ結論づけられていない。しかしながら、HBP の律速酵素 glutamine : fructose-6-phosphate amidotransferase を阻害して細胞内 UDP-GlcNAc 量を低下させると、脂肪成熟分化が阻害されるので、成熟分化プログラムと *O*-GlcNAc 修飾量増加が連動している可能性はある<sup>7)</sup>。

次に、マウス筋芽細胞株 C2C12 を用いて骨格筋分化過程の *O*-GlcNAc 修飾の動態を解析した事例を紹介する。筋芽細胞は、筋分化に伴い細胞が整列・伸長するとともに細胞周期が停止する (図2)。その後、細胞融合により筋管を形成する (図2)。C2C12 筋芽細胞では、筋分化初期に細胞当りの *O*-GlcNAc 修飾量が大幅に低下し、その後も低レベルで維持されていた<sup>8)</sup>。筋分化依存的な *O*-GlcNAc 修飾量低下は、*O*-GlcNAcase 阻害剤、または *O*-GlcNAcase

ノックダウンによって抑制できるので、筋分化に伴い *O*-GlcNAcase の活性上昇が起こっていると考えられる。実際に、筋分化依存的に *O*-GlcNAcase 発現量が増加することが確かめられた。興味深いことに、*O*-GlcNAcase を阻害すると、筋管形成が顕著に抑制される (図2)。筋管形成プロセスのうち、細胞の整列・伸長、ならびに細胞周期停止に至る過程には *O*-GlcNAcase 阻害による影響は認められないが、筋分化遺伝子発現プログラムのマスター転写因子 (myogenic regulatory factors, MRFs) の発現に支障を来す。MRFs には、MyoD, myf5, myogenin, ならびに MRF4 の4種があるが、*O*-GlcNAcase 阻害により *myogenin* と *mrf4* 発現が顕著に抑制される (図2)。Myogenin と MRF4 は、MyoD の下流に位置する MRFs であることから、*O*-GlcNAcase 阻害により MyoD の転写活性が抑制された結果であると考えられる。そこで、MyoD の転写活性は *O*-GlcNAc 修飾によって負に制御されている可能性があると考え、この検証を進めている。

3T3-L1 や C2C12 と同様、間葉系細胞株であるマウス前駆骨芽細胞 MC3T3-E1 は、骨芽細胞分化依存的に *O*-GlcNAc 修飾量が増加することが見出されている<sup>11)</sup>。前駆骨芽細胞の *O*-GlcNAcase を阻害すると、骨芽細胞分化の

マスター転写因子 Runx2 の活性が上昇する。Runx2 は OGT の基質である。よって、Runx2 の転写活性が O-GlcNAc 修飾により制御される可能性が示唆されている。これを確証づけるためにはより詳細な解析が必要であるが、骨芽細胞分化においては O-GlcNAc 修飾が正の制御作用を示すようである。

#### 4. おわりに

本稿では、細胞分化と O-GlcNAc 修飾について、間葉系細胞株の脂肪/筋/骨芽細胞分化についての解析例を紹介した。3 系統への分化について共通していることは、分化に伴い細胞当りの O-GlcNAc 修飾量が明確に変動することである。これは、分化にしたがってエネルギー代謝が変化することと、O-GlcNAc 修飾のドナーが UDP-GlcNAc であることを合わせて考えると十分に予測されることであるが、変動する方向が脂肪/骨分化と筋分化で異なる。脂肪/骨分化では O-GlcNAc 修飾量が増加するのに対し、筋分化では減少する。このことは、脂肪/骨分化と筋分化では必要とされる UDP-GlcNAc 量が異なっていることを示しており、分化に伴う UDP-GlcNAc 量の変動が O-GlcNAc 修飾量に反映されているのかもしれない。しかしながら、単に細胞内 UDP-GlcNAc 量を反映するばかりではなく、各々の分化に固有のタンパク質が O-GlcNAc 修飾により制御されている可能性を見出した。O-GlcNAc 修飾の生理機能は、Ser/Thr リン酸化と拮抗、または協調することにより、タンパク質の安定性や生理活性を制御することにあると我々は考えている<sup>12,13)</sup>。今後の研究課題として、各々の細胞分化の鍵となるタンパク質が O-GlcNAc 修飾/リン酸化による厳密な制御下で本来の生理活性を發揮していることを検証したい。最近、O-GlcNAc 修飾はエピジェネティックコードとしても注目され始めたが<sup>14,15)</sup>、ますます O-GlcNAc 修飾の重要度が認知され、その生理機能の本質が明らかになることを期待している。

- W., Chui, D., Hart, G.W., & Marth, J.D. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5735–5739.
- 6) O'Donnell, N., Zachara, N.E., Hart, G.W., & Marth, J.D. (2004) *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 1680–1690.
  - 7) Ishihara, K., Takahashi, I., Tsuchiya, Y., Hasegawa, M., & Kamemura, K. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **398**, 489–494.
  - 8) Ogawa, M., Mizofuchi, H., Kobayashi, Y., Tsuzuki, G., Yamamoto, M., Wada, S., & Kamemura, K. (2012) *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, 24–32.
  - 9) Franke, W.W., Hergt, M., & Grund, C. (1987) *Cell*, **49**, 131–141.
  - 10) Ordóñez, J.L., Osuna, D., Herrero, D., de Álava, E., & Madoz-Gúrpide, J. (2009) *Cancer Res.*, **69**, 7140–7150.
  - 11) Kim, S.-H., Kim, Y.-H., Song, M., An, S.H., Byun, H.-Y., Heo, K., Lim, S., Oh, Y.-S., Ryu, S. H., & Suh, P.-G. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **362**, 325–329.
  - 12) Kamemura, K., Hayes, B.K., Comer, F.I., & Hart, G.W. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 19229–19235.
  - 13) Kamemura, K. & Hart, G.W. (2003) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **73**, 107–136.
  - 14) Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., Ito, H., Takada, I., Roeder, R.G., Kitagawa, H., & Kato, S. (2009) *Nature*, **459**, 455–459.
  - 15) Slawson, C. & Hart, G.W. (2011) *Nat. Rev. Cancer*, **11**, 678–684.

亀村 和生, 小川 光貴  
(長浜バイオ大学バイオサイエンス学部)

O-GlcNAc glycosylation as a controller of differentiation  
Kazuo Kamemura and Mitsutaka Ogawa (Department of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, 1266 Tamura, Nagahama, Shiga 526-0829, Japan)  
投稿受付: 2011 年 11 月 11 日

## 胃がん発がんにおけるがん抑制遺伝子 RUNX3 の働き

### 1. はじめに

転写因子 RUNX3 (Runt related transcription factor 3) は、プロモーター領域のメチル化によるサイレンシングとタンパク質の細胞質への偏在により、80% 以上のヒト胃がんにおいて、その不活性化が観察されるがん抑制遺伝子産物である<sup>1,2)</sup>。RUNX3 は、TGFβ シグナル伝達系の下流で SMADs (Sma and Mad related proteins) と相互作用し、細胞増殖抑制因子 p21 とアポトーシス誘導因子 Bim の発現を亢進することが知られている<sup>3,4)</sup>。さらに最近になって、