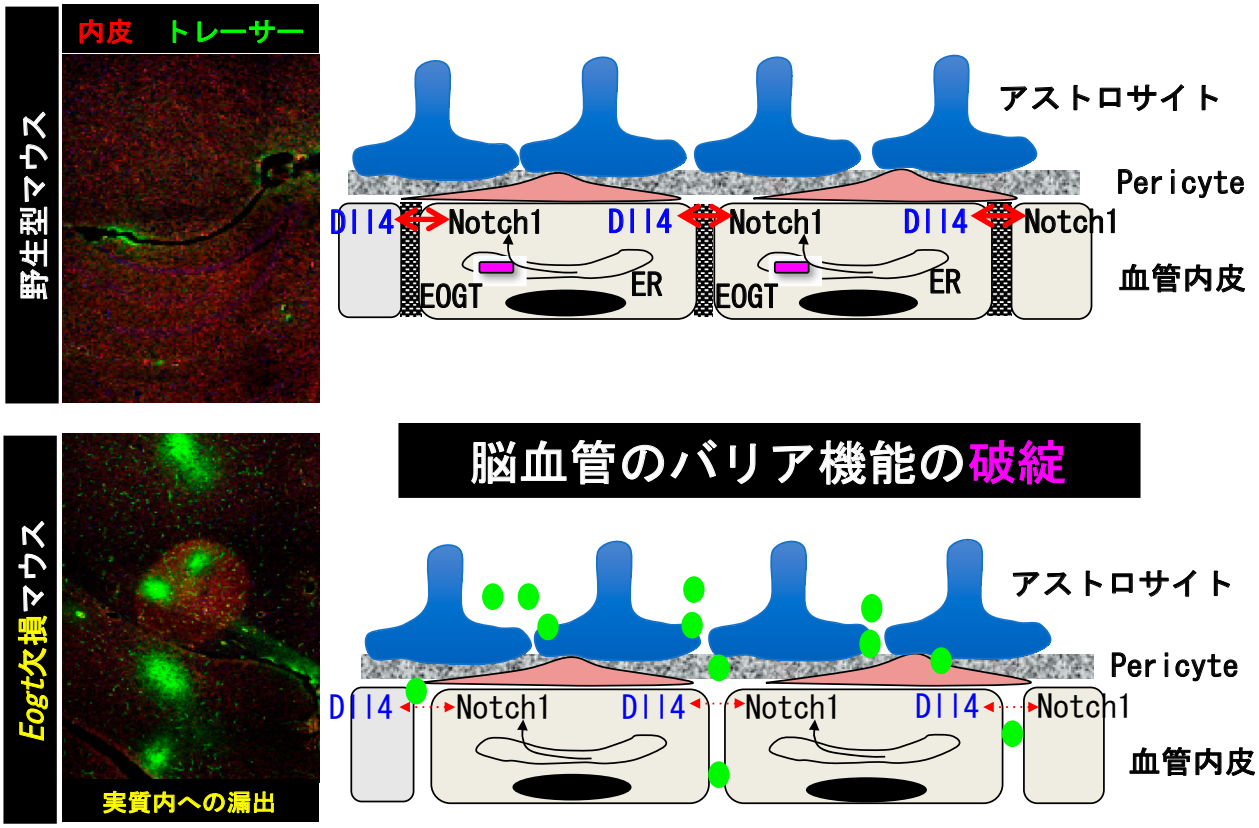
91	細胞外O-GlcNAcによるNotchシグナル精密制御の意義	岡島　徹也

【目的】NOTCH 受容体は、その特徴の 1 つとして細胞外領域に約 36 個の連続した上皮成長因子ドメイン（EGF）リピートを有し、特有な O-結合型糖鎖修飾を受ける。私は、これまでの研究で、Notch 受容体の EGF リピートの新規の糖修飾である細胞外 O-GlcNAc を発見し、小胞体に局在する O-GlcNAc 転移酵素 EOGT を同定した。さらに、EOGT による Notch 受容体の O-GlcNAc 修飾が DLL4 を介した Notch シグナルを制御することを明らかにした。本研究では、このような Notch シグナルの精密制御に関わる O-GlcNAc 修飾の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】*Eogt* 欠損マウスを用いて網膜と脳血管の表現型の解析を行なった。また、血管のバリア機能の解析には、トレーサーとして、Sulfo-NHS-LC-biotin の灌流実験を行なった。

【結果】*Eogt* 欠損マウスにおいて、トレーサーの血管外漏出が認められた。また、血管内皮特異的な *Eogt* 欠損マウスでも同様な表現型が認められたことから、血管内皮細胞における EOGT 発現が、血管バリア機能に必要であることが明らかになった。また、N-カドヘリンに加えて、タイトジャンクション構成因子の発現低下が認められ、EOGT 依存的な Notch シグナルを介する血管バリア機能の新たな制御機構の存在が示唆された。

EOGT による血管バリア機能の保持機構



91. 細胞外 O-GlcNAc による Notch シグナル精密制御の意義

岡島　徹也

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

Key words：NOTCH，O-GlcNAc，Vascular integrity

緒　言

NOTCH 受容体は、その特徴の 1 つとして細胞外領域に約 36 個の連続した上皮成長因子ドメイン（EGF）リピートを有し、特有な O-結合型糖鎖修飾を受ける。これまでに、O-フコース修飾に関わる Ofut1 変異体を解析し、OFUT1 が NOTCH 受容体の活性化に必要であり［1］、また、NOTCH 受容体の folding を促進するシャペロン活性を有することを見出した［2］。一方、O-フコースに GlcNAc を転移する FRINGE は、Notch 受容体と Delta リガンドとの結合性を増強し、逆に Notch 受容体と Serrate（Jagged）リガンドとの結合性を減弱させる、即ち、リガンド選択性に関与することを示した［3］。これらの成果より、O-結合型糖修飾は、Notch 受容体の構造と機能を制御し、Notch シグナル依存的な発生学的プロセスに必要であることが明らかになった。

その後、予想外の研究の進展があり、Notch 受容体の EGF リピートの新規の糖修飾である細胞外 O-GlcNAc を発見した［4］。生化学的なメカニズムとして、小胞体に局在する O-GlcNAc 転移酵素 EOGT を同定した［5］。EOGT による Notch 受容体の O-GlcNAc 修飾が DLL4 を介した Notch シグナルを制御する。一方で、FRINGE の場合と異なり、JAGGED1 を会した Notch シグナルには影響を持たなかった［6］。従って、Notch シグナルの制御において、EOGT は FRINGE と類似するが異なる機能を有する可能性が示唆された。本研究では、このような Notch シグナルの精密制御に関わる O-GlcNAc 修飾の役割を明らかにするために、*Eogt* 欠損マウスの表現型の解析を行なった。

方　法

血管内皮特異的な *Eogt* 欠損マウスを作製するために、Tie2-Cre マウスを $Eogt^{floxed}$ マウスと交配させた。血管内皮における *Eogt* 遺伝子発現の消失は、網膜における *in situ* ハイブリダイゼーションにより確認した。脳血管内皮細胞の遺伝子発現解析は、CD31 抗体を用いて血管内皮細胞を含む血管断片を単離後、定量的 RT-PCR にて定量した。脳血管の integrity は、Sulfo-NHS-LC-biotin を灌流後、アビジン-CF488A により染色した。血管の染色には、Isolectin B4 によるレクチン染色を行なった。画像解析のより、血管外への漏出が見られる部位数を計測した。

結　果

野生型マウスと *Eogt* 欠損マウスから脳血管内皮細胞を含む血管断片を単離し、定量的 RT-PCR により、Notch シグナル関連遺伝子の遺伝子発現を解析した。4 種類の NOTCH 受容体と JAGGED1（JAG1）の遺伝子発現には変化が認められなかったのに対して、NOTCH 受容体リガンドの 1 つである Delta-like 4（DLL4）の遺伝子発現の低下が認められ、Notch シグナルの低下との因果関係が確認できた。さらに、HES1 や HEY1 などの Notch シグナルの標的遺伝子の発現減少が認められた。これらの結果より、EOGT による NOTCH 受容体の O-GlcNAc 修飾は、脳血管内皮細胞における Notch シグナルの増強に寄与することが明らかになった。

EOGT の血管バリア機能における役割を明らかにするために、生後 15 日目の *Eogt* ホモ欠損（$Eogt^{-/-}$）マウスにエバンスブルーの灌流を行い、血管の integrity を解析した（図 1）。$Eogt^{-/-}$マウスでは、エバンスブルーの脳実質への漏出が認められ、血管バリア機能の異常が示唆された。さらに、定量的な解析のために、Sulfo-NHS-LC-biotin を灌流

後、網膜血管におけるトレーサーの漏出を検証した。*Eogt*$^{-/-}$マウスと、*Rbpj* ヘテロ欠損マウス、*Notch1* ヘテロ欠損マウスにおいて、血管外へのトレーサーの漏出が認められた。一方、*Rbpj* ヘテロもしくは、*Notch1* ヘテロのバックグランドで *Eogt* を欠損させた 2 重変異マウスにおいては、単独の変異マウスと比較して、表現型が増強した。このように、EOGT と Notch シグナル構成因子との間で、遺伝学的相互作用が認められたことから、EOGT の血管 integrity における役割は、Notch シグナルを介していることが明らかになった。さらに、血管内皮特異的な *Eogt* 欠損マウスを用いて同様な解析を行なった。*Eogt*$^{-/-}$マウス同様に、トレーサーの血管外漏出が認められたことから、血管内皮細胞における EOGT 発現が、血管バリア機能に必要であることが明らかになった。

タイトジャンクション形成における EOGT の役割を解析するために、Occuludin と Claudin5 の遺伝子発現の解析を行なった。RT-PCR の結果、脳血管内皮において、Occuludin の発現レベルは変化しないものの、Claudin5 の発現の低下が観察された。Claudin5 のプロモーター解析からは、RBPJ の結合予想部位は存在しなかった。従って、Notch シグナルで制御される転写因子などによる間接的な制御が示唆された。

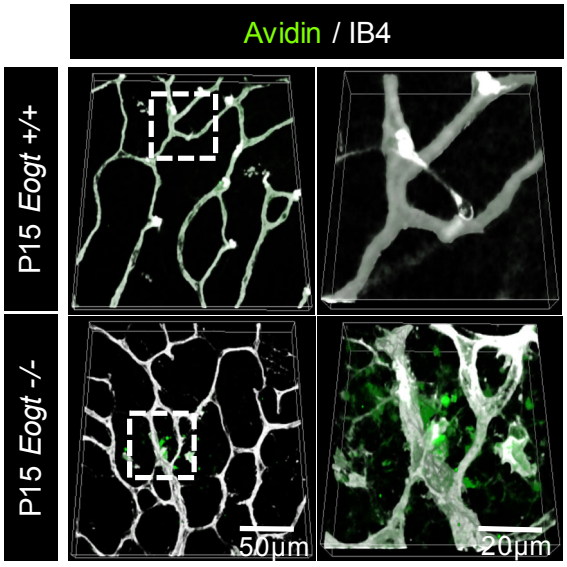


図 1．EOGT は、血管のバリア機能に必要である

生後 15 日（P15）のマウスの網膜血管を Isolectin B4（IB4）にて染色した。また、トレーサーとして用いた Sulfo-NHS-LC-biotin の血管からの漏出を Avidin（緑色）にて染色した。野生型マウス（上段）では、血管外へのトレーサーの漏出は認められないのに対して、*Eogt* 変異マウス（下段）では、血管外への染色が認められた。左図の拡大図を右に示す。スケールバー：左　50μm; 右　20μm。

考　察

今回の研究から、EOGT による Notch 受容体の精密制御が、脳毛細血管のバリア機能に重要であることが明らかになった。これまでに、Notch シグナルの血管形成における役割について、血管新生、動脈分化、そして血管の恒常性の維持における役割が報告されている。また、N-カドヘリンを介した血管内皮とペリサイト間の接着に関与すること、そして、Non-canonical Notch シグナル経路が VE-カドヘリンを介した接着に関与することも報告されている。*Eogt*$^{-/-}$マウスの解析より、これらの分子機能に加えて、新たに、タイトジャンクション形成における糖鎖修飾依存的な Notch シグナルの関与が示唆された。

これまでの報告で、O-フコースを修飾する L-FRINGE は、DLL4 を介した Notch1 シグナルを増強し、JAG1 を介した Notch 1 シグナルを阻害することが報告されている。しかしながら、L-FRINGE の欠損マウスの血管機能におけ

る詳細な解析は行われておらず、今回の研究は、NOTCH 受容体糖鎖の血管 integrity における重要性を初めて示唆するものである。今回の成果により、糖鎖修飾の NOTCH 受容体における機能的な重要性が確立した一方で、解析方法の限界で、NOTCH 受容体糖鎖の時空間分布に関する情報は限られている。今後の研究で、O-GlcNAc をはじめとする NOTCH 受容体糖鎖の発現変化と病態との関連性の理解が進むことで、糖鎖を標的にした神経保護薬などの開発に道を開くことが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、名古屋大学大学院医学系研究科分子細胞化学研究室の澤口翔伍博士、小川光貴博士である。

文　献

1) Okajima T, Lei L, Irvine K. Regulation of Notch signaling by O-fucose glycans. Cell. 2002 Dec 13;111(6):893-904. PMID: 12526814
2) Okajima T, Xu A, Lei L, Irvine K. Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase 1 promotes Notch receptor folding. Science. 2005 Mar 11;307(5715):1599-603. Epub 2005 Feb 3. PMID: 15692013 DOI: 10.1126/science.1108995
3) Okajima T, Xu A, Irvine KD. Modulation of notch-ligand binding by protein O-fucosyltransferase 1 and fringe. J Biol Chem. 2003 Oct 24;278(43):42340-5. Epub 2003 Aug 8. PMID: 12909620 DOI: 10.1074/jbc.M308687200
4) Matsuura A, Ito M, Sakaidani Y, Kondo T, Murakami K, Furukawa K, Nadano D, Matsuda T, Okajima T. O-linked GlcNAc is Present on the Extracellular Domain of Notch Receptors. J Biol Chem. 2008 Dec 19;283(51):35486-95. Epub 2008 Oct 23. PMID: 18948267 DOI: 10.1074/jbc.M806202200
5) Sakaidani Y, Nomura T, Matsuura A, Ito M, Suzuki E, Murakami K, Nadano D, Matsuda T, Furukawa K, Okajima T. O-linked-N-acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interactions. Nat Commun. 2011 Dec 13;2:583. PMID: 22158438 DOI: 10.1038/ncomms1591
6) Sawaguchi S, Varshney S, Ogawa M, Sakaidani Y, Yagi H, Takeshita K, et al. O-GlcNAc on NOTCH1 EGF repeats regulates ligand-induced Notch signaling and vascular development in mammals. Elife. 2017 Apr 11;6. pii: e24419.　PMID: 28395734 PMCID: PMC5388531 DOI: 10.7554/eLife.24419