

悪性腫瘍の運命決定プログラミングを制御しうる 糖鎖スイッチの解析

名古屋大学大学院

医学系研究科 助教 小川光貴

1, 研究の背景・目的

EGF 受容体(EGFR/ErbB1R) は、上皮系や神経系などの細胞膜表面に発現する受容体型チロシンキナーゼである。上皮成長因子(リガンド)は EGFR に結合することで、EGFR の2量体形成が誘発され、EGFR シグナルが惹起される。興味深いことに、EGFR に結合するリガンドの種類によって、EGFR シグナルの「量的違い」だけではなく「質的違い」も生じていることが報告された [Freed et al., 2017 Cell]。即ち、EGF が EGFR に結合した場合には左右対称(symmetry) の EGFR 2量体が形成されるが、Epiregulin が結合した場合には EGFR の構造変化が生じて、左右非対称(asymmetry) の EGFR 2量体が形成される。この結果、EGF が EGFR に結合した場合は一過性に強いシグナルが下流に伝達されて MCF-7 細胞が増殖するのに対して、Epiregulin が結合した場合には持続的に弱いシグナルが伝達されて MCF-7 細胞が脂肪細胞様に分化転換する。しかし、Epiregulin-EGFR シグナルの強度は、Epiregulin を分泌するガン細胞ごとに多様性があるので、Epiregulin の性質を制御する未知の因子がある可能性が高いことが示されている [Qu et al., 2016 Oncogene]。

申請者は、糖転移酵素 小胞体局在型 O-GlcNAc 転移酵素 (EOGT) の新しい基質を探索している中で、Epiregulin が EOGT の基質 (つまり、細胞外 O-GlcNAc 修飾タンパク質) であることを見出した [Ogawa et al., 未発表]。そして、Epiregulin の O-GlcNAc glycan は少なくとも5種類の糖鎖構造多様性があることを見出しており、その中で4種類は全く新しい糖鎖構造であった。Epiregulin の O-GlcNAc glycan は、EGFR との結合や左右非対称(symmetry) の EGFR 2量体形成に最も重要であるアミノ酸残基に生じていた。また、O-GlcNAc glycan の生合成に関わる糖転移酵素の発現パターンは細胞種によって大きく異なることも明らかになった。

本研究課題の核心をなす学術的な問いは、以下の通りである。① 糖転移酵素 EOGT は Epiregulin は、Epiregulin-EGFR シグナルの精密制御因子か? ② O-GlcNAc glycan の糖鎖構

造多様性の意義は何か？本研究課題では、これまでに明らかにできなかった学術的な問いを申請者の見出した独自の研究成果から明らかにするものである。

本研究課題の目的は、糖転移酵素 EOGT が Epiregulin-EGFR シグナルの精密制御因子であることを実証することである。また、申請者が独自に見出した Epiregulin の O-GlcNAc glycan の糖鎖構造多様性の意義を明らかにする。これまでに、EGFR を含めた受容体に生じる N 型糖鎖修飾が、受容体の 2 量体形成やリガンド結合に関与することは多数報告されている [Coskun et al., 2011 PNAS]。一方、リガンドの糖鎖修飾が EGFR の 2 量体形成やリガンド結合能に関与しているという報告例は一切ない。本研究が実証できれば、申請者が見出したリガンドの糖鎖修飾が、受容体とリガンドの結合や 2 量体形成、受容体の立体構造を制御するという全く新しい概念が得られるであろう。

2. 研究の対象ならびの方法

課題 A: O-GlcNAc glycan 糖鎖構造多様性の意義

- ・ O-GlcNAc glycan の糖鎖構造多様性の意義を明らかにする為に、異なる性質を示す細胞株の O-GlcNAc glycan の存在比率を質量分析装置にてプロファイリングをした。
- ・そして、上記のプロファイリングで明らかになった Epiregulin の O-GlcNAc glycan 糖鎖構造多様性を模倣した Epiregulin 糖鎖ライブラリーを作製している。

課題 B: 新しい糖鎖修飾の糖転移酵素の同定

- ・本研究で明らかになった新しい糖鎖構造(O-GlcNAc-Gal-Fuc)のフコース転移酵素を明らかにする為に、13種類あるフコース転移酵素の発現ベクターを入手した。
- ・Epiregulin と各種フコース転移酵素を HEK293T 細胞に過剰発現させ、Epiregulin を精製後、質量分析装置にて O-GlcNAc glycan をプロファイリングした。

課題 C: MCF-7 の増殖・分化転換実験

- ・O-GlcNAc glycan の生物学的機能を明らかにする為に、各細胞から精製した Epiregulin で MCF-7 を刺激した際の細胞増殖率と分化転換効率を求めた。

課題 D: EGFR シグナルアッセイ

- ・O-GlcNAc glycan の生物学的機能を明らかにする為に、各細胞から精製した Epiregulin で MCF-7 を刺激した際の EGFR シグナリングを評価した。
- ・上記の実験系では内在性の Epiregulin が無視できない為、S2 細胞に human EGFR を発現させた安定発現株を樹立し、EGFR シグナルアッセイを実施することにした。

課題 E: X 線構造解析による Epiregulin-EGFR の立体構造解析

- ・O-GlcNAc glycan が Epiregulin の立体構造に影響を与えている可能性を検証する為に、Epiregulin と EGFR の発現ベクターを入手し、S2 細胞に安定発現株を樹立した。
- ・現在、X 線構造解析を目指して Epiregulin と EGFR を大量精製中である

3. 研究結果

課題 A: O-GlcNAc glycan 糖鎖構造多様性の意義

大腸がんを含む複数の細胞における Epiregulin の O-GlcNAc glycan の糖鎖構造を明らかにする為に、レンチウイルス系で Epiregulin-His の発現ベクターを構築した。また、複数の癌細胞(特に大腸癌)を用いて Epiregulin-His の安定発現株を樹立した。そして、それぞれの細胞に発現する Epiregulin の O-GlcNAc glycan を質量分析装置で解析した。その結果、正常細胞では Epiregulin が O-GlcNAc glycan を受けている割合が低いのに対して、がん細胞では O-GlcNAc glycan を受けている割合が高いことが分かった。現在、網羅的に O-GlcNAc glycan の解析を実施するために、数十種類の細胞株にて Epiregulin -His の安定発現株を樹立している最中である。

また、上記のプロファイリングで明らかになった Epiregulin の O-GlcNAc glycan 糖鎖構造多様性を模倣した Epiregulin 糖鎖ライブラリーを作製する為、リコンビナント humanEREG-His を作製する為に、humanEREG-His の大腸菌発現用ベクターを樹立し、大腸菌からの精製をニッケルカラムと HPLC で試みた。アッセイに十分な量の humanEREG-His を精製することができた。しかしながら、精製した humanEREG-His と EOGT、UDP-GlcNAc を用いた EOGT 糖転移アッセイにて O-GlcNAc の転移反応を実施し、MALDI-TOF-MS で糖転移酵素反応量を測定した結果、糖転移反応の効率が悪かった。ポジティブコントロールで用いた dEGF20-His には効率良く転移反応が生じていることから、大腸菌から精製した humanEREG-His のフォールディング効率が悪いと結論付けた。現在、

S2 細胞の humanEREG-His の安定発現細胞を取得したところであり、大量培養後、EOGT 糖転移アッセイにて O-GlcNAc の付加反応をしたい。

課題 B: 新しい糖鎖修飾の糖転移酵素の同定

本研究で明らかになった新しい糖鎖構造(O-GlcNAc-Gal-Fuc)のフコース転移酵素を明らかにする為に、13種類あるフコース転移酵素の発現ベクターを入手した。そして、Epiregulin と各種フコース転移酵素を HEK293T 細胞に過剰発現させ、Epiregulin を精製後、質量分析装置にて O-GlcNAc glycan をプロファイリングした。その結果、FUT1 と FUT2、FUT9 が O-GlcNAc-Gal にフコースを転移する糖転移酵素であることが分かった。

課題 C: MCF-7 の増殖・分化転換実験

レンチウイルス系で樹立した Epiregulin-His の安定発現細胞から Epiregulin-His を精製し、MCF-7 細胞にそれぞれの細胞から精製した Epiregulin-His で刺激した。その結果、HEK293T 細胞や HEK293T EOGT KO 細胞、正常細胞から精製した Epiregulin-His で刺激した MCF-7 細胞は細胞が増殖したのに対して、がん細胞から精製した Epiregulin-His で刺激した MCF-7 細胞は細胞が分化した。これは、Epiregulin-His 上の O-GlcNAc glycan が MCF7 細胞の分化・増殖のスイッチングを制御している可能性を示している。

課題 D: EGFR シグナルアッセイ

糖転移酵素 EOGT が EREG-EGFR シグナルに与える影響を調べる為に、EREG-EGFR シグナルアッセイ系の樹立を試みた。当初、ヒトの細胞における EGFR シグナルアッセイ系の樹立を試みたが、内在性の EGF 等の影響により正確な評価が出来なかった。そこで、humanEREG の受容体が存在しない S2 細胞に humanEGFR が安定的に発現する細胞を樹立し、アッセイ系の構築を目指した。S2 細胞用の EGFR の発現ベクターを入手し、安定発現株を取得した。現在、樹立した細胞におけるアッセイ系を評価している最中である。

課題 E: X 線構造解析による Epiregulin-EGFR の立体構造解析

O-GlcNAc glycan が Epiregulin の立体構造に影響を与えている可能性を検証する為に、Epiregulin と EGFR の発現ベクターを入手し、S2 細胞に安定発現株を樹立した。現在、X

線構造解析を目指して Epiregulin と EGFR を大量精製中である。

4. 考察

4 種類の正常細胞と 2 種類のがん細胞で O-GlcNAc glycan を比較した場合、正常細胞では Epiregulin が O-GlcNAc 修飾を受けている割合が 15%前後だったのに対して、がん細胞では 50%以上であった。また、4 種類の正常細胞由来の Epiregulin は MCF7 細胞を増殖させるのに対して、2 種類のがん細胞由来の Epiregulin は MCF7 細胞を分化させた。今後、解析対象にする細胞を増やすことで、Epiregulin 上の O-GlcNAc glycan の機能について更に詳細に解析したい。また、リコンビナント human EREG-His を精製し、各種 O-GlcNAc glycan を作成することで、それぞれの O-GlcNAc glycan の機能についても明らかにしたい。最後に、O-GlcNAc 修飾をされた Epiregulin と EGFR の 2 者複合体を解析することで、分子レベルにおける O-GlcNAc の機能も明らかにしたい。

5. 学会発表

Delta-like1 homolog の O 型糖鎖修飾による細胞膜発現制御機構の解析

田嶋優子,後藤和佳子,妹尾勇弥,塚本 庸平,池田和貴,小川光貴,竹内英之,岡島徹也

第 42 回日本分子生物学会年会 2019 年 12 月 4 日

Notch1 受容体上の O-GlcNAc glycan は細胞外環境に応答する

与儀賢太朗,小川光貴,妹尾勇弥,池田和貴,竹内英之,岡島徹也

第 42 回日本分子生物学会年会 2019 年 12 月 4 日

Identification of fucose-containing novel O-GlcNAc glycan

Mitsutaka Ogawa,Kentarou Yogi,Yuya Senoo,Kazutaka Ikeda,Hideyuki Takeuchi,Tetsuya Okajima

第 42 回日本分子生物学会年会 2019 年 12 月 4 日

Notch 受容体糖鎖による生体機能の精密制御機構の理解を目指したグライコプロテオミクス研究

岡島徹也,小川光貴,竹内英之

第 9 回 名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム 2019 年 9 月 28 日

Notch 受容体上の O- 結合型糖鎖修飾の質量分析計を用いた網羅的解析

塚本庸平,妹尾勇弥,浦田悠輔,齊木颯,小川光貴,池田和貴,竹内英之,岡島徹也

第 92 回日本生化学会大会 2019 年 9 月 19 日

Notch1 受容体上の O-GlcNAc glycan は細胞外環境に応答する

小川光貴,与儀賢太郎,妹尾勇弥,池田和貴,竹内英之,岡島徹也

第 92 回日本生化学会大会 2019 年 9 月 18 日

Effect of N-glycan on ER localized O-GlcNAc transferase (EOGT) and O-GlcNAcylation on Notch1 extracellular domains

Sayad Md. Didarul Alam,Mitsutaka Ogawa,Yuko Tashima,Hideyuki Takeuchi,Tetsuya Okajima

第 38 回日本糖質学会年会 2019 年 8 月 21 日

Delta-like 1 homolog の細胞膜発現の制御機構の解析

田嶋優子,後藤和佳子,妹尾勇弥,塚本庸平,池田和貴,小川光貴,竹内英之,岡島徹也

第 38 回日本糖質学会年会 2019 年 8 月 20 日

血液凝固第 XII 因子の活性化における EGF 様ドメインの O-結合型糖鎖修飾 の役割

中村澄香,小川光貴,竹内英之,岡島徹也,有森貴夫,高木淳一,相川京子

第 38 回日本糖質学会年会 2019 年 8 月 20 日

構造学的なアプローチによる 細胞外 O-GlcNAc 修飾の分子機能解析

小川光貴,矢木宏和,田嶋優子,妹尾勇弥,池田和貴,加藤晃一,竹内英之,岡島徹也

第 38 回日本糖質学会年会 2019 年 8 月 20 日

Notch 受容体上の O-結合型糖鎖修飾の質量分析計を用いた網羅的解析

塚本庸平,浦田悠輔,齊木颯,小川光貴,竹内英之,岡島徹也

第 38 回日本糖質学会年会 2019 年 8 月 19 日