

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18414

研究課題名(和文)心肥大の分子メカニズム解明を目指した比較グライコプロテオミクス

研究課題名(英文)Comparative glycoproteomics for elucidating molecular mechanism of cardiac hypertrophy

研究代表者

岡谷 千晶(Okatani, Chiaki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：30633648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：心肥大・心不全に至る分子メカニズムの解明は心不全治療法の開発における重要課題である。本研究では、心肥大モデルにおいて生じるタンパク質上糖鎖修飾の異常を網羅的に明らかにすることを目的とした。心肥大モデル細胞を用いた検討から、肥大刺激により細胞表面の糖鎖プロファイルが変化すること、またその変化は肥大刺激に用いる薬剤の種類によって異なることが判った。一方、心不全モデルマウスを用いた検討から、主目的の心肥大に関連した糖鎖変化は見られなかったものの、心筋線維化と関連した糖鎖変化の特徴を明らかにできた。これらの成果は、心不全をもたらす心筋異常の分子基盤における糖鎖修飾の意義の解明に貢献すると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、心肥大・心不全と関連した糖鎖変化およびその変化を示す糖タンパク質群を網羅的に明らかにした。本成果により、これらの糖鎖変化を指標とした新たな診断法の開発への応用が期待できる。また、これらの糖鎖変化とタンパク質の機能異常との関連性を詳細に調べることで、新たな心肥大・心不全の発症・進展メカニズムが明らかになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It is of significant importance to elucidate the molecular mechanisms underlying cardiac hypertrophy and consequent heart failure, especially for the development of novel strategies for the therapeutic treatments. In this study, we aimed to comprehensively characterize cardiac hypertrophy/heart failure-related alterations in protein glycosylations, which have pivotal roles in the modulation of protein functions. We characterized glycosylation alterations in the cell surface of cardiac myocytes treated with hypertrophic agonists, which exhibited discrete consequences depending on the type of agonists. Using a heart failure mouse model, we also identified cardiac fibrosis-related glycosylation alterations, which had discrete characteristics from the changes observed in cardiac myocytes. These findings are expected to contribute to elucidation of the significance of protein glycosylations in the molecular mechanisms underlying myocardial impairment that leads to heart failure.

研究分野：糖鎖生物学、グライコミクス、グライコプロテオミクス

キーワード：疾患関連糖鎖変化 心不全 心肥大 心筋線維化 糖鎖プロファイル解析 グライコプロテオーム解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 心不全は、日本人の死因の2位を占める心疾患の主要因である。心不全に対する根治的治療法は未だ確立されておらず、治療法の開発が強く求められている。心臓に対する物理的負荷または内分泌的負荷を成因とする心不全では、まず心筋が心機能を維持するための適応反応として心肥大を引き起こし、負荷状態が続くと代償機構に破綻が生じ、心不全へと移行する。そのため、心不全治療法の開発にあたっては、心肥大発症にあたり心筋細胞に生じる生理的変化および心肥大から心不全に至る分子メカニズムの解明が重要である。

(2) 糖鎖修飾は主要なタンパク質の翻訳後修飾であり、タンパク質の立体構造や局在、機能発現に影響を及ぼすことが知られている。例えば、心不全マーカーとして汎用されている心臓由来の循環調節ホルモン、B型ナトリウム利尿ペプチドの前駆体にムチン型O型糖鎖が付加すると活性化へのプロセッシングが阻害されることが示されており、この糖鎖変化が慢性心不全患者の重症化メカニズムとして提唱されている。また申請者は、心不全モデルラットを用いて心肥大・心不全状態の心臓組織、特に心筋細胞ではN型糖鎖コアフコースが減少し、ムチン型O型糖鎖修飾が亢進することを示している。これらの知見から、心筋細胞の機能および心肥大シグナルの制御や破綻において、N型糖鎖およびムチン型O型糖鎖の変化が重要な意義を有すると考えられる。

2. 研究の目的

タンパク質の糖鎖修飾機構は広範なタンパク質群をターゲットとすることから、心肥大状態の心筋細胞では複数のタンパク質上で糖鎖変化が生じており、そしてその中で、糖鎖変化によって機能異常を引き起こすタンパク質が心筋細胞の制御の破綻に関与する可能性が考えられる。しかし、糖鎖構造の複雑さから、心筋細胞での網羅的な糖鎖解析は行われておらず、心肥大と関連した糖タンパク質や糖鎖構造については断片的にしか分かっていない。そこで本研究では、N型糖鎖およびムチン型O型糖鎖に焦点を当て、肥大状態の心筋細胞において生じる糖鎖変化およびそのキャリアタンパク質を網羅的に同定することにより、心肥大シグナルにおけるタンパク質上糖鎖修飾の実態および意義を分子レベルで明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 薬剤曝露により肥大刺激を与えたラット心筋細胞(H9C2)および不死化ヒト心筋細胞を心肥大モデル細胞とした。肥大刺激(+)/(-)細胞の培養上清(分泌タンパク質画分)、細胞親水性画分、細胞疎水性画分、および細胞膜画分を調製し、45種のレクチンから成るレクチンマイクロアレイを用いた糖鎖プロファイリング技術により、各画分のグリコームを比較解析することで、肥大刺激による糖鎖変化を検討した。

(2) ムチン型O型糖鎖の意義解明およびグリコプロテオーム解析による糖鎖付加位置の網羅的決定のため、CRISPR/Cas9システムによりムチン型O型糖鎖生合成酵素ノックアウト心筋細胞を作出した。野生型細胞、Cas9発現細胞、ノックアウト細胞について(1)と同様に各画分を調製し、レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイリングを行った。

(3) 心不全モデルマウス(4C30)および正常マウスのホルマリン固定パラフィン包埋心臓組織切片を作製し、レクチンマイクロアレイを用いた組織糖鎖プロファイリング技術により、左心室組織片のグリコームを比較解析することで、心不全群に特徴的な糖鎖構造を検討した。

(4) これらの比較グリコーム解析、および、タンパク質試料のレクチンプロット解析およびレクチンによる細胞・組織染色から、心肥大・心不全と関連した糖鎖変化およびそのキャリアタンパク質の捕集に有用なレクチンを選出した。

(5) 選出された心不全関連糖鎖認識レクチンを用い、心不全群/対照群間で顕著な増加が認められた試料から糖タンパク質を捕集し、安定同位体標識(IGOT)-LC-MS/MS解析により糖タンパク質およびN型糖鎖付加部位を網羅的に同定した。この結果の妥当性を検証するため、分析に用いた試料について、同定タンパク質の特異的抗体および当該レクチンを用いた二重染色を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞面積およびアクチンフィラメント染色により肥大の程度を評価することで、最適な培養条件(培地組成、コーティング剤および播種密度)、薬剤濃度および薬剤曝露時間を最適化した。最適化した条件にて培養した肥大刺激(+)/(-)細胞の各画分の比較糖鎖プロファイル解析から、細胞膜画分では肥大刺激により複数の糖鎖構造の変化が認められた。その糖鎖変化は肥大刺激として使用した薬剤(angiotensin II、endothelin-1、phenylephrine、isoproterenol)によって異なっており、特にisoproterenolについて肥大刺激(+)/(-)細胞間の糖鎖プロファイルに顕著な差が認められた(図1)。

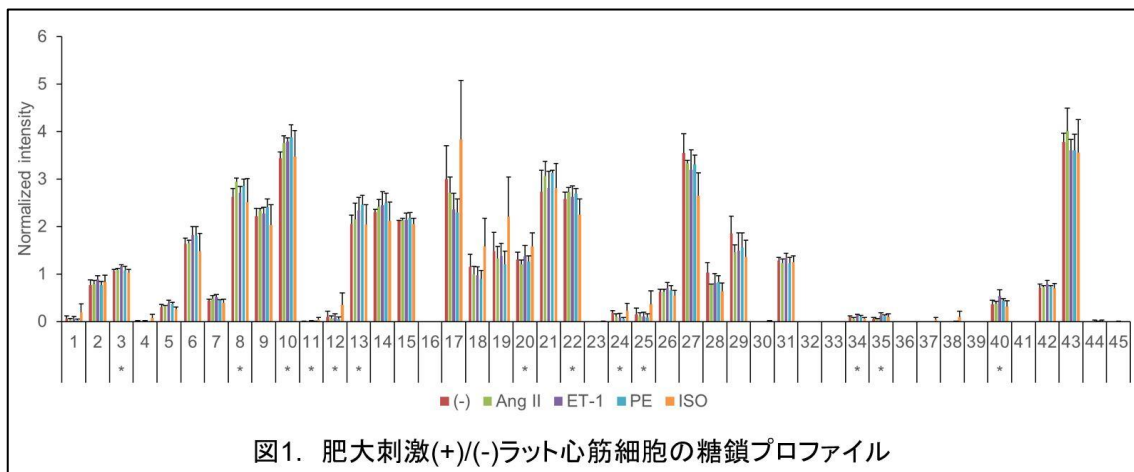


図1. 肥大刺激(+)/(-)ラット心筋細胞の糖鎖プロファイル

(2) ラット心筋細胞および不死化ヒト心筋細胞について、ムチン型 *O* 型糖鎖生合成酵素ノックアウト心筋細胞を作出することに成功した。これらの細胞では当該遺伝子のノックアウトは致死性ではなかったが、不死化ヒト心筋細胞では増殖遅延が認められた。ラット心筋細胞の野生型、Cas9 発現株、ノックアウト株は、上記 4 種の薬剤により同程度の肥大を示したことから、当該遺伝子のノックアウトは心肥大シグナルには影響しないことが示唆された。これら 3 種の細胞ライセートの糖鎖プロファイル解析から、遺伝子ノックアウトにより想定通りの *O* 型糖鎖伸長阻害が確認され、このノックアウト細胞が *O* 型糖鎖付加位置特異的グリコプロテオーム解析に使用可能であると考えられた。

(3) 心不全モデルマウスおよび正常マウスの心臓組織切片の比較糖鎖プロファイル解析から、心不全群では 9 種のレクチンについてシグナル増加が認められた。この結果の妥当性を検証するため、心不全モデル・正常マウスの心臓組織切片をこれらのレクチンで染色したところ、心筋細胞を染色するレクチンは認められなかった。一方、*Wisteria floribunda* agglutinin (WFA) は、マッソン・トリクローム染色およびピクロシリスレッド染色により検出したコラーゲン線維と類似した染色パターンを示した (図 2)。I 型コラーゲンタンパク質特異的抗体と WFA との二重染色では共局在が認められなかったことから、線維化部位特異的な WFA 染色はコラーゲン線維タンパク質への結合によるものではないことが示唆された。また、*N* 型糖鎖特異的グリコシダーゼ (PNGase F) の処理により線維化特異的 WFA 染色が消失したことから、この染色は線維化部位に発現する *N* 型糖鎖への WFA の結合によることが示された。

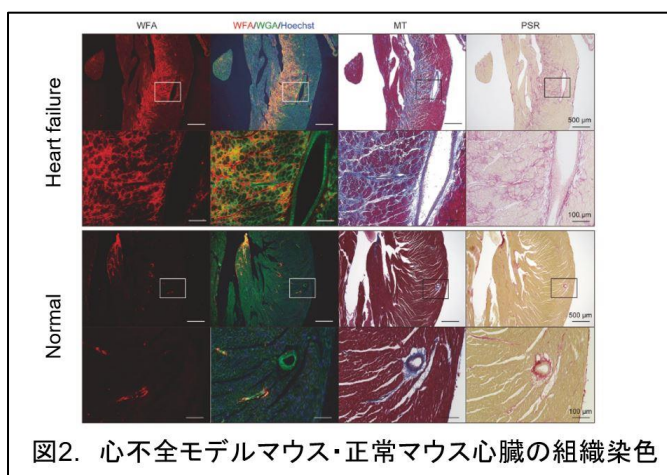
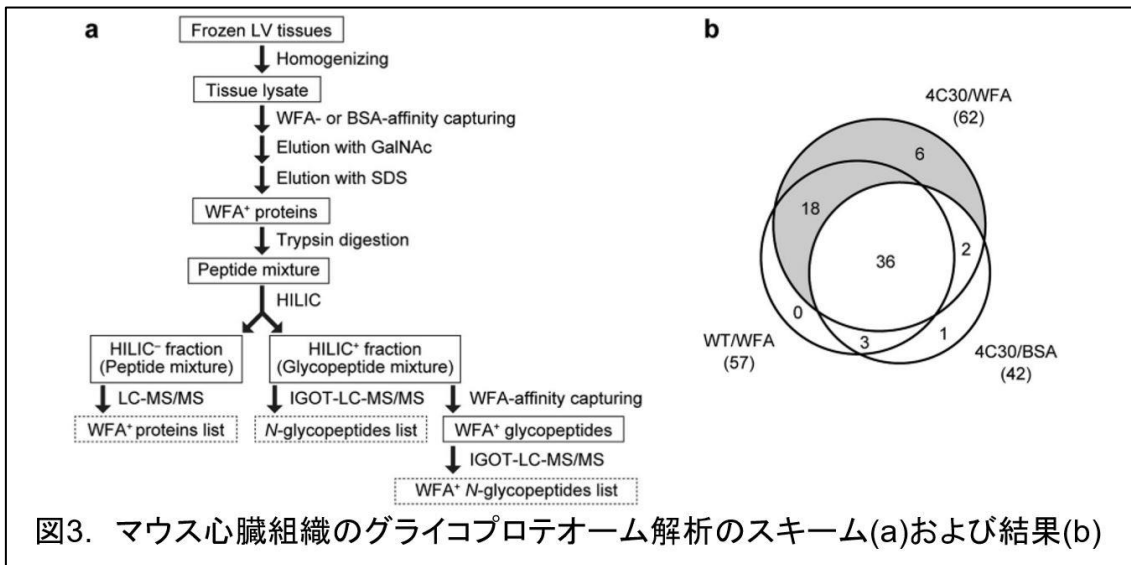


図2. 心不全モデルマウス・正常マウス心臓の組織染色

(4) 上記の結果を基に、心不全モデルマウスおよび正常マウスの左心室組織ライセートから WFA と結合する糖タンパク質を捕集し、プロテオーム解析により WFA 結合糖タンパク質を網羅的に同定した。また、WFA 結合糖タンパク質をトリプシン消化した後、親水性カラムクロマトグラフィーにより捕集した糖ペプチド、および、さらに WFA カラムにて捕集した WFA 結合糖ペプチドについて、IGOT-LC-MS/MS 法による *N* 型糖鎖特異的グリコプロテオーム解析に供した。また、ネガティブコントロールとして、WFA の代わりに Bovine serum albumin を用いて同様の試料調製・解析を行った。その結果、心不全モデルマウス心臓から、主要な WFA 結合糖タンパク質として 24 種の糖タンパク質が同定された (図 3)。Gene Ontology 解析から、同定糖タンパク質のうち 13 種は線維化と関連する細胞外マトリックス (ECM) タンパク質であった。また、WFA 結合糖ペプチドの解析結果から、その 13 種のうち 7 種については、糖ペプチドとして WFA と結合することが確認された。さらに、同定された計 24 種の WFA 結合糖ペプチドのうち 21 種は ECM タンパク質であり、心不全モデルマウスでは検出されたが、正常マウスでは検出されなかった。これらの結果から、線維化部位特異的な WFA 染色は、主に ECM タンパク質上の WFA 結合 *N* 型糖鎖への結合によることが示唆された。



(5) 上記のグリコプロテオーム解析結果の妥当性を検証するため、心不全モデルマウス心臓にて WFA 結合糖鎖を有することが示された ECM 糖タンパク質のうち、非線維性コラーゲンタンパク質 Co16a6 について、特異的抗体と WFA との共染色を行った。その結果、心不全モデルマウス心臓の線維化部位において、Co16a6 染色と WFA 染色のオーバーラップが認められた。WFA 染色部位の一部のみが Co16a6 陽性であったことから、グリコプロテオーム解析結果から示唆されるように、線維化部位特異的な WFA 染色には複数の糖タンパク質が寄与していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nagai-Okatani Chiaki, Nishigori Mitsuhiro, Sato Takashi, Minamino Naoto, Kaji Hiroyuki, Kuno Atsushi	4. 巻 99
2. 論文標題 Wisteria floribunda agglutinin staining for the quantitative assessment of cardiac fibrogenic activity in a mouse model of dilated cardiomyopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1749 ~ 1765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0279-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岡谷 (永井) 千晶	4. 巻 45
2. 論文標題 新規バイオマーカーの開発を目指した、拡張型心筋症における心筋線維化に伴うタンパク質上糖鎖変化の同定	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical science digest	6. 最初と最後の頁 668 ~ 669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 岡谷千晶、錦織充広、佐藤隆、南野直人、梶裕之、久野敦
2. 発表標題 心筋線維化の定量的評価法のための新規糖鎖マーカー開発に向けた、拡張型心筋症モデルマウス心臓のグライコーム・グライコプロテオーム解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagai-Okatani Chiaki, Nishigori Mitsuhiro, Sato Takashi, Minamino Naoto, Kaji Hiroyuki, Kuno Atsushi
2. 発表標題 Glycomic and glycoproteomic approaches for development of novel glyco-biomarkers of cardiac fibrogenesis using a mouse model of dilated cardiomyopathy
3. 学会等名 18th Human Proteome Organization World Congress (HUP02019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡谷千晶、錦織充広、佐藤隆、南野直人、梶裕之、久野敦
2. 発表標題 Identification of Wisteria Floribunda Agglutinin as a Specific Lectin for Detection of Cardiac Fibrosis in a Dilated Cardiomyopathy Mouse Model Using Lectin Microarray-Based Glycomic Analysis
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----