

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06120

研究課題名(和文) O-GlcNAc修飾を介したスフィンゴ糖脂質代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation mechanism of Glycosphingolipids metabolism by O-GlcNAcylation

研究代表者

郷 慎司 (Go, Shinji)

名古屋大学・糖鎖生命コア研究所・特任准教授

研究者番号：10458218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胞内(細胞質・核)タンパク質の翻訳後修飾「O-GlcNAc化(タンパク質のセリン/スレオニン残基にN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)という糖が付加される)」による細胞の糖鎖修飾の統合的発現制御機構に関して解析を行ってきた。
本研究では、糖脂質の生合成、糖鎖に重要な糖：シアル酸の代謝、糖鎖の異化(分解)に関わるリソソーム機能の3点において、O-GlcNAc化が制御していること初めて明らかにした。これらから、細胞はGlcNAcをセンサーとして、細胞の糖鎖状況を感じ、適切な糖鎖代謝を統合的に制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、糖鎖の生合成、分解は個別に研究が進められてきた。今回、GlcNAcを中心として(特にO-GlcNAc化を介して)、細胞の糖鎖代謝が統合的に連動して制御されていることを見出した。
また、GlcNAcアナログを用いた、糖鎖発現制御に関する道筋が得られており、創薬、研究ツール開発にもつながることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have been analyzing the integrated regulatory mechanism of cellular glycosylation by "O-GlcNAcylation (addition of the sugar N-acetylglucosamine (GlcNAc) to serine/threonine residues of proteins)," a post-translational modification of intracellular (cytoplasmic and nuclear) proteins.
In this study, it was clarified for the first time that O-GlcNAcylation regulates the biosynthesis of glycolipids, the metabolism of sialic acid, a sugar important for glycans, and lysosomal functions involved in the catabolism (degradation) of glycans. These findings suggest that cells may use GlcNAc as a sensor to sense the status of cellular glycans and to control appropriate glycan metabolism in an integrated manner.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 糖脂質 シアル酸 リソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

機関番号： 13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2018~2023

課題番号：18K06120

研究課題名(和文) O-GlcNAc 修飾を介したスフィンゴ糖脂質代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation mechanism of Glycosphingolipids metabolism by O-GlcNAcylation

研究代表者：郷 慎司(GO, Shinji) 名古屋大学・糖鎖生命コア研究所・特任准教授

研究者番号：10458218

交付決定額(研究期間全体): 4,290,000 (直接経費) 3,300,000

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ糖脂質は細胞膜外層の成分の一つであり、多様な構造体が存在する。細胞種によって発現するスフィンゴ糖脂質の構造と量は厳密に制御されており各細胞の機能を制御する。スフィンゴ糖脂質の構造多様性の意義を解明するうえで、その代謝制御機構の理解は必須である。細胞内のタンパク質翻訳後修飾の一つ、“O-GlcNAc 修飾”を介したスフィンゴ糖脂質代謝制御機構の存在を見出した。細胞が有する O-GlcNAc 修飾を介した糖脂質代謝制御機構を紐解くことで、糖脂質合成酵素遺伝子操作だけでは困難であった糖脂質の緻密な発現制御法の開発につながるものであると考える。

2. 研究の目的

本研究では「細胞が有するスフィンゴ糖脂質発現制御機構の解明」とその知見に基づく「新たなスフィンゴ糖脂質発現 改変法の開発」を行い応用することで、「スフィンゴ糖脂質の新たな機能の解明」を目指す。

3. 研究の方法

“O-GlcNAc 修飾”は、細胞内タンパク質の特定のセリン/スレオニン残基に、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が結合する翻訳後修飾であり、そのタンパク質の機能・安定性・細胞内局在など様々な性質を制御している。スフィンゴ糖脂質(以下糖脂質)はセラミドに順次糖が付加されて合成される。各糖脂質の細胞内の生合成場所は異なり、その輸送機構も異なることが提唱されている。糖脂質合成酵素および輸送関連分子の発現・活性、細胞内局在制御に関与する分子群で、O-GlcNAc 修飾を受けて制御されている分子の同定を行う。発現する糖脂質分子種が異なるヒト由来細胞株に対し O-GlcNAc 修飾を変動させたときの糖脂質量およびその代謝中間産物の量を HPLC、LC-MS を用いて詳細に定量解析し、各糖脂質代謝のどの点に O-GlcNAc 修飾タンパク質が関与するかを明らかにする。その代謝点を中心に糖脂質合成酵素の活性を測定するとともに、各合成酵素(およびその転写制御因子)輸送に関わるとされるタンパク質群の発現変動と O-GlcNAc 修飾の影響を解析する(ウェスタンブロット、定量 PCR)。また、ゲノム編集技術を用いて糖脂質代謝関連タンパク質に蛍光タンパク質を付与し、内在性の各タンパク質の局在を明らかにするとともに、O-GlcNAc 修飾改変時の細胞内局在変化を観察する。蛍光タンパク質を付与した糖脂質代謝関連タンパク質を発現させた細胞に、蛍光標識した各糖脂質を取り込ませて細胞内での糖脂質の動き・局在を可視化し時間経過を追って見る。各段階で細胞分画を行い、各細胞内小器官に含まれる各糖脂質および蛍光タンパク質を解析することで、これらによって O-GlcNAc 修飾によって制御を受ける糖脂質代謝関連タンパク質の同定、糖脂質合成の細胞内の流れ・場の同定を行う。O-GlcNAc 修飾は、ドナー基質の UDP-GlcNAc の量、修飾酵素である O-GlcNAc 転移酵素(OGT)、除去酵素である O-GlcNAcase(OGA)の発現・活性バランスによって制御される。OGT、OGA の活性・発現制御機構と、UDP-GlcNAc の量を、環境(栄養条件、ストレスなど)細胞周期の観点から解析する。最終的に糖転移酵素遺伝子欠損株、過剰発現株の作製を行うとともに、上記までの O-GlcNAc 修飾改変に基づく糖脂質発現制御法を組み合わせ、任意にスフィンゴ糖脂質の種類・量を変化させた細胞株を樹立する。HEK293 や HeLa などの一般的な細胞株を用いて増殖・接着を指標に各糖脂質の機能評価を行うとともに、GM3 合成欠損患者で重篤な症状が出る神経および筋のモデル細胞株を用いて、分化を指標に各糖脂質機能を評価する

4. 研究成果

糖脂質発現制御の機構の解明のため、タンパク質翻訳後修飾 O-GlcNAc 化と糖・エネルギー代謝、糖鎖代謝機構に注目して研究を行った。

糖脂質 Gb3 の生合成と O-GlcNAc 化

細胞の O-GlcNAc 化修飾状態を変動させる (GlcNAc の添加、O-GlcNAc 転移酵素の阻害・過剰発現、O-GlcNAc 分解酵素の阻害・過剰発現) と顕著に糖脂質 Gb3 の量が変動した。O-GlcNAc 化が増加すると Gb3 が減少し、O-GlcNAc 化が減少すると Gb3 が増加した。Gb3 の代謝経路にかかわるタンパク質の O-GlcNAc 修飾の有無、サイトの同定を試みた。Gb3 合成に必須と考えられる細胞内の糖脂質輸送タンパク質 FAPP2 に関して、O-GlcNAc 化が FAPP2 の安定性に影響していることを見出した。糖脂質生合成に関して糖脂質輸送経路に依存した Gb3 生合成制御に O-GlcNAc 化が関与していることが明らかとなった。

リソソーム機能と O-GlcNAc 化

O-GlcNAc 化の鍵となる UDP-GlcNAc は細胞内では新規合成とリソソームでのタンパク質分解からサルベージ経路で供給される。リソソーム機能を阻害した場合、細胞内の O-GlcNAc 化が大きく変化することを見出し、リソソーム機能と糖脂質代謝のあらたな接点を見出した。加えて、リソソーム機能・オートファジーを制御する因子：TFEB の細胞質-核間移動が O-GlcNAc 化によって変化することを新たに見出した。

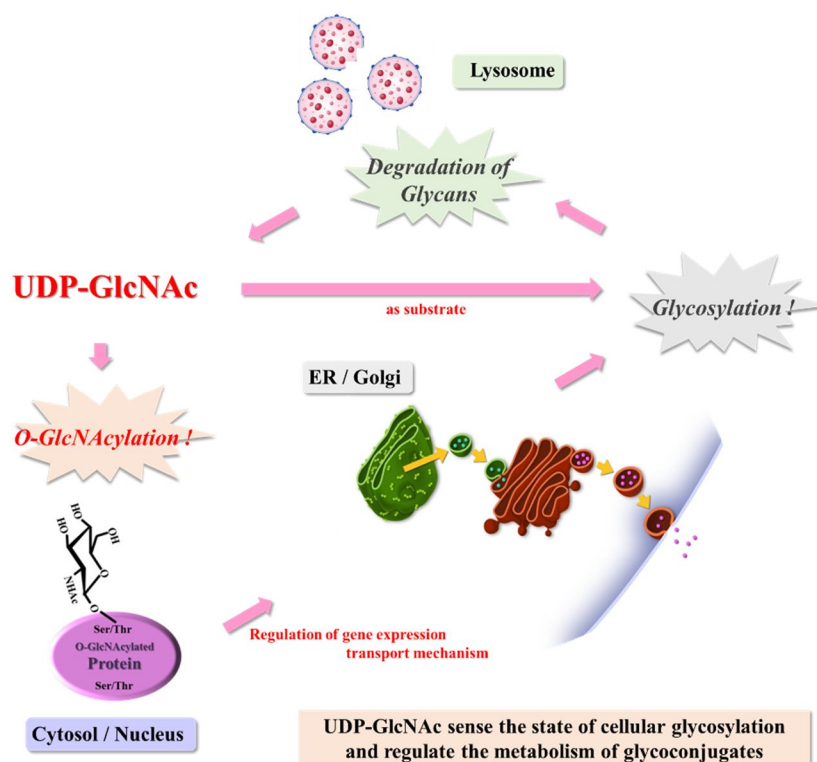
これらの結果は、細胞内の糖鎖の生合成、分解の状態が、GlcNAc の量によって感知され、相互に制御していることを示唆する初めての知見となった。

シアル酸代謝と O-GlcNAc 化

シアル酸は、糖鎖の最末端に存在し、細胞間認識の他様々な機能の中心となる糖鎖の中でも最重要の糖残基である。シアル酸の生合成は、UDP-GlcNAc を基質としており、O-GlcNAc 化と競合する因子であると考えられる。

O-GlcNAc 化を変動させる (GlcNAc の添加、O-GlcNAc 転移酵素の阻害・過剰発現、O-GlcNAc 分解酵素の阻害・過剰発現) と、シアル酸の代謝に関わる酵素 GNE、SPL、CSS の発現、細胞内局在 (細胞質 核) が大きく変動することを新たに見出した。

～ の結果から、O-GlcNAc が中心となり、糖鎖の生合成・代謝関連の酵素の局在、発現量、機能、安定性を制御し、統合的に細胞の糖鎖修飾が制御されていることを見出した。



O-GlcNAc 修飾を介したシアル酸代謝制御機構
日本生化学会 (2018)

The Urinary Bladder is Rich in Glycosphingolipids Composed of Phytoceramides

Watanabe T., Suzuki A., Ohira S., Go S., Ishizuka Y., Moriya T., Miyaji Y., Nakatsuka T., Hirata K., Nagai A., Matsuda J.

Journal of Lipid Research (10.1016/j.jlr.2022.100303)

Implication of N-glycolylneuraminic acid in regulation of cell adhesiveness of C2C12 myoblast cells during differentiation into myotube cells

Go S., Sato C., Hane M., Go S., Kitajima K.

Glycoconjugate Journal (10.1007/s10719-022-10049-9)

Involvement of acid ceramidase in the degradation of bioactive N-acyl ethanolamines

Tsuboi K., Tai T., Yamashita R., Ali H., Watanabe T., Uyama T., Okamoto Y., Kitakaze K., Takenouchi Y., Go S., Rahman I.A.S., Houchi H., Tanaka T., Okamoto Y., Tokumura A., Matsuda J., Ueda N.

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids (10.1016/j.bbalip.2021.158972)

Reduction in miR-219 expression underlies cellular pathogenesis of oligodendrocytes in a mouse model of Krabbe disease

Inamura N., Go S., Watanabe T., Takase H., Takakura N., Nakayama A., Takebayashi H., Matsuda J., Enokido Y.

Brain Pathology (10.1111/bpa.12951)

Homeostatic and pathogenic roles of GM3 ganglioside molecular species in TLR4 signaling in obesity

Kanoh H., Nitta T., Go S., Inamori K.-I., Veillon L., Nihei W., Fujii M., Kabayama K., Shimoyama A., Fukase K., Ohto U., Shimizu T., Watanabe T., Shindo H., Aoki S., Sato K., Nagasaki M., Yatomi Y., Komura N., Ando H., Ishida H., Kiso M., Natori Y., Yoshimura Y., Zonca A., Cattaneo A., Letizia M., Ciampa M., Mauri L., Prinetti A., Sonnino S., Suzuki A., Inokuchi J.-I.

EMBO Journal (10.15252/embj.2019101732)

Visual Function in Mice Lacking GM3 Synthase

Hiraoka M., Ohkawa E., Abe A., Murata M., Go S., Inokuchi J.-I., Ohguro H.

Current Eye Research (10.1080/02713683.2019.1576206)

Developmental defects and aberrant accumulation of endogenous psychosine in oligodendrocytes in a murine model of Krabbe disease

Inamura N., Kito M., Go S., Kishi S., Hosokawa M., Asai K., Takakura N., Takebayashi H., Matsuda J., Enokido Y.

Neurobiology of Disease (10.1016/j.nbd.2018.08.023)

Biology of GM3 Ganglioside

Inokuchi J.-I., Inamori K.-I., Kabayama K., Nagafuku M., Uemura S., Go S., Suzuki A., Ohno I., Kanoh H., Shishido F.

Progress in Molecular Biology and Translational Science (10.1016/bs.pmbts.2017.10.004)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsuboi K, Tai T, Yamashita R, Ali H, Watanabe T, Uyama T, Okamoto Y, Kitakaze K, Takenouchi Y, Go S, Rahman IAS, Houchi H, Tanaka T, Okamoto Y, Tokumura A, Matsuda J, Ueda N.	4. 巻 1866(9)
2. 論文標題 Involvement of acid ceramidase in the degradation of bioactive N-acyl ethanolamines.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.	6. 最初と最後の頁 158972-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2021.158972.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Inamura N, Go S, Watanabe T, Takase H, Takakura N, Nakayama A, Takebayashi H, Matsuda J, Enokido Y.	4. 巻 31(5)
2. 論文標題 Reduction in miR-219 expression underlies cellular pathogenesis of oligodendrocytes in a mouse model of Krabbe disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Pathol.	6. 最初と最後の頁 12951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bpa.12951.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hiraoka Miki, Ohkawa Ei, Abe Akira, Murata Masaki, Go Shinji, Inokuchi Jin-ichi, Ohguro Hiroshi	4. 巻 44
2. 論文標題 Visual Function in Mice Lacking GM3 Synthase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Eye Research	6. 最初と最後の頁 664 ~ 670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/02713683.2019.1576206	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 -
1. 著者名 Kanoh Hirotaka, Nitta Takahiro, Go Shin, Cattaneo Anna, Letizia Marilena, Ciampa Maria, Mauri Laura, Prinetti Alessandro, Sonnino Sandro, Suzuki Akemi, Inokuchi Jin ichi	4. 巻 39
2. 論文標題 Homeostatic and pathogenic roles of <sc>GM</sc> 3 ganglioside molecular species in <sc>TLR</sc> 4 signaling in obesity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 1~20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2019101732	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 -

1. 著者名 Tsuboi Kazuhito, Tai Tatsuya, Yamashita Ryouhei, Ali Hanif, Watanabe Takashi, Uyama Toru, Okamoto Yoko, Kitakaze Keisuke, Takenouchi Yasuhiro, Go Shinji, Rahman Iffat Ara Sonia, Houchi Hitoshi, Tanaka Tamotsu, Okamoto Yasuo, Tokumura Akira, Matsuda Junko, Ueda Natsuo	4. 巻 1866
2. 論文標題 Involvement of acid ceramidase in the degradation of bioactive N-acyl ethanolamines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 158972 ~ 158972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2021.158972	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 -

1. 著者名 Go Shiori, Sato Chihiro, Hane Masaya, Go Shinji, Kitajima Ken	4. 巻 39
2. 論文標題 Implication of N-glycolylneuraminic acid in regulation of cell adhesiveness of C2C12 myoblast cells during differentiation into myotube cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glycoconjugate Journal	6. 最初と最後の頁 619 ~ 631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10719-022-10049-9	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 -

1. 著者名 Watanabe Takashi, Suzuki Akemi, Ohira Shin, Go Shinji, Ishizuka Yuta, Moriya Takuya, Miyaji Yoshiyuki, Nakatsuka Tota, Hirata Keita, Nagai Atsushi, Matsuda Junko	4. 巻 63
2. 論文標題 The Urinary Bladder is Rich in Glycosphingolipids Composed of Phytoceramides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 100303 ~ 100303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jlr.2022.100303	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 郷 慎司
2. 発表標題 O-GlcNAc修飾を介したシアル酸代謝制御機構
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------