

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2007 ~ 2008
課題番号：	19590306
研究課題名(和文)	O結合型Nアセチルグルコサミン(O型糖鎖)による筋小胞体タンパク質の制御機構
研究課題名(英文)	The regulatory mechanism on cardiac SR proteins by O-linked N-acetylglucosamine
研究代表者	
	朝日 通雄 (Asahi Michio)
	大阪医科大学・医学部・教授
	研究者番号： 10397614

研究成果の概要：

筋小胞体カルシウムポンプ(SERCA)は、心筋の機能に重要な働きをしており、収縮、弛緩に深く関わっている。その制御タンパク質であるホスホランバン(PLN)やサルコリピン(SLN)によるSERCAの制御は心機能に重要な役割を演じている。本研究では、O型糖鎖であるO結合型NアセチルグルコサミンがPLNと結合し、そのリン酸化を制御することによりSERCAに対するその阻害活性を制御し、心機能に影響していることを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,600,000	780,000	3,380,000
20年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子病態学、循環器内科学、循環薬理学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：糖鎖、筋小胞体タンパク質、循環器疾患、ストレス

1. 研究開始当初の背景

心臓は、神経支配によりその機能が制御されている。カテコラミンが神経末端から放出されると、アデニル酸シクラーゼが活性化され、サイクリックAMPが増加しプロテインキナーゼA(PKA)を活性化する。そして、PKAによりホスホランバンがリン酸化され、筋小胞体のカルシウムポンプ(SERCA)との結合状態に変化が起こり、ホスホランバンによるSERCAの抑制がはずれ、その活性が上昇し、

筋小胞体内カルシウムが増加することにより心収縮力を高める。リアノジンレセプターも自らリン酸化される上、ソルシンなどのリン酸化タンパク質によりその活性が制御され、SERCA活性の上昇に伴う筋小胞体内カルシウム貯蔵の増加を有効に心収縮力の増加へと誘導していると考えられる。このように筋小胞体は、心筋の機能に重要な働きをしている細胞内小器官で、既述したこれらの筋小胞体タンパク質は生理的に収縮、弛緩に深く

関わっているだけでなく、それらの機能異常は心機能不全に深く関わっていることが分かってきた。

糖鎖は、複合糖質(糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカン)の形で、様々な生命現象、たとえば細胞増殖、分化や癌の転移、浸潤などに関与している。タンパク質への糖鎖転移の様式は、大きく2つに分類され、1つはN-結合型糖付加であり、もう1つはO-結合型糖付加である。O-結合型N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)は後者に属し、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が一つだけO-グリコシド結合した糖鎖である。近年、このO-GlcNAcという糖鎖が、そのタンパク質の修飾部位でセリン、スレオニンキナーゼのリン酸化部位と競合することから、リン酸化の調節、細胞内シグナル伝達、あるいは核内での転写の制御に重要な役割を演じていることが報告されている(Slawson, C and Hart, GW, Current Opinion in Structural Biology 2003, 13:631-636)。心臓の機能は、様々なタンパク質のリン酸化で制御されているので、そのリン酸化にO-GlcNAcが影響しているとする、O-GlcNAcが心機能の新たな調節因子ということも考えられる。とりわけO-GlcNAcは、糖尿病により産生が亢進するので、糖尿病性心筋症の病態に関わっている可能性は高いと思われる。しかし、心臓におけるO-GlcNAcの役割についての報告はほとんど存在しない。O-GlcNAcによるカルシウムシグナルタンパク質の制御、さらに心機能の制御が確認できれば、心不全治療の新しい方向性を提示できると思われる。

2. 研究の目的

O-GlcNAcという糖鎖は、セリン、スレオニンキナーゼのリン酸化部位に競合することにより細胞内シグナル伝達に重要な役割を演じている。心臓の機能は、様々なタンパク質のリン酸化で制御されているので、そのリン酸化にO-GlcNAcが影響しているとする、O-GlcNAcが心機能の新たな調節因子ということも考えられる。本研究では、特に、心機能に中心的役割を演じているカルシウムシグナルタンパク質のリン酸化にO-GlcNAcがどのように関与するかを検討し、心不全などの心疾患治療の新しい方向性を模索するの

が目的である。

3. 研究の方法

(1) O-GlcNAc修飾による心機能との関連を明らかにするため、ラット単離アダルト心筋細胞の単離培養系を用い、O-GlcNAcaseの阻害剤であるPUGNAcの添加によりO-GlcNAcの修飾を促進し、1~3Hzで電気刺激を与え、心機能(短縮率など)やカルシウムトランジェント(Fura-2を用いて)を測定した。

(2) さらに、レンチウイルス発現系を用いて、OGTやOGaseをラット単離アダルト心筋細胞に強発現させ、1~3Hzで電気刺激を与え、心機能(短縮率など)やカルシウムトランジェント(Fura-2を用いて)を測定した。

(3) O-GlcNAcの転移酵素であるOGTや離脱酵素であるOGaseのcDNAをレンチウイルスベクターにクローニング後、ラット単離アダルト心筋細胞に強制発現させ、1~3Hzで電気刺激を与え、心機能(短縮率、収縮速度や拡張速度など)やカルシウムトランジェント(Fura-2で染色後、浜松フォトニクス社のAquacosmos/Ratioを用いて)を測定した。

(4) 正常マウスと心不全マウスのO-GlcNAc転移酵素であるO-GlcNAc transferase(OGT)や離脱する酵素であるO-GlcNAcase(OGase)の発現をウェスタンブロットあるいはリアルタイムRT-PCRで調べた。また、O-GlcNAcやOGaseによるタンパク修飾を、O-GlcNAcの抗体によるウェスタンブロットを用いて行い、心不全という病態でOGT、OGaseとその産物のO-GlcNAcの量が増えているかどうかを検証した。

(5) 低酸素(ハイポキシア)とO-GlcNAc O-GlcNAcがハイポキシアによる心筋の細胞死(アポトーシス、ネクローシス)に与える影響を検討するため、心筋細胞を低酸素チャンバーで培養し、OGT、OGaseの発現変化を検討するとともに、OGT、OGaseをレンチウイルスを用いて強制発現させ、低酸素に対する耐性変化を調べた。心筋細胞がハイポキシアの実験系に不適切と判断された場合、HeLa細胞やHEK293細胞などプラスミドによるトランスフェクションに適した細胞を用い、細胞死のシグナルに対するO-GlcNAcの影響を検討した。

4. 研究成果

本研究は *O*-GlcNAc によるカルシウムシグナルタンパク質の制御およびその心機能への影響を検討する目的で行ったが、心機能の制御に中心的役割を演じている筋小胞体タンパク質の一つであるホスホランバンが *O*-GlcNAc による修飾を受けること、またその修飾がリン酸化を抑制していることを証明した(論文投稿中)。ホスホランバンのリン酸化の抑制あるいは *O*-GlcNAc 化そのものにより、心機能が低下している可能性も示唆された。さらに、ホスホランバンのホモログであるサルコリピンにおいても *O*-GlcNAc による修飾の可能性が示唆された。

また、*O*-GlcNAc が低酸素など ER ストレスによる細胞死 (アポトーシス) シグナルに与える影響についても脂肪前駆細胞である 3T3-L1 細胞を用いて検討し、*O*-GlcNAc 試薬の前処理の有無により ER ストレスの刺激に対する IRE-1, eIF-2 α , ATF6 などのシグナル分子がどのように影響を受けるかについて一定の成果が挙がり、現在論文を作成中である。

O-GlcNAc という糖鎖は、糖尿病、アルツハイマー病などの病態で増加し、それらの病態と深く結びついていると考えられるが、その分子メカニズムはよくわかっていない。本研究は、心不全の分子メカニズムの一つを解明しその新しい治療の可能性を示唆したという点で意義があると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

①Schmitt JP, Ahmad F, Lorenz K, Hein L, Schulz S, Asahi M, MacLennan DH, Seidman CE, Seidman JG, Lohse MJ., Alterations of phospholamban function can exhibit cardiotoxic effects independent of excessive sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase inhibition., *Circulation*, 119(3), 436-44, 2009, 査読有

②Narisada M, Kawamoto S, Kuwamoto K, Moriwaki K, Nakagawa T, Matsumoto H, Asahi M, Koyama N, Miyoshi E., Identification of an inducible factor secreted by pancreatic cancer cell lines that stimulates the production of

fucosylated haptoglobin in hepatoma cells., *Biochem Biophys Res Commun.*, 377(3), 792-6, 2008, 査読有

③Morita T, Hussain D, Asahi M, Tsuda T, Kurzydowski K, Toyoshima C, MacLennan DH., Interaction sites among phospholamban, sarcolipin, and the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 369(1), 188-94, 2008, 査読有

④Takahashi M, Yokoe S, Asahi M, Lee SH, Li W, Osumi D, Miyoshi E, Taniguchi N, N-glycan of ErbB family plays a crucial role in dimer formation and tumor promotion., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1780(3), 520-4, 2008, 査読有

⑤Moriwaki K, Noda K, Nakagawa T, Asahi M, Yoshihara H, Taniguchi N, Hayashi N, Miyoshi E., A high expression of GDP-fucose transporter in hepatocellular carcinoma is a key factor for increases in fucosylation., *Glycobiology*, 17, 1311-20, 2007, 査読有

⑥Hikoso S, Ikeda Y, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hirotsu S, Kashiwase K, Yamada M, Asahi M, Matsumura Y, Nishida K, Matsuzaki M, Hori M, Otsu K., Progression of heart failure was suppressed by inhibition of apoptosis signal-regulating kinase 1 via transcortical gene transfer., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 50, 453-62, 2007, 査読有

⑦Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N, Otsu K., The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nature Med.*, 13, 619-24, 2007, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① 横江俊一、藤原範子、江口裕伸、崎山晴彦、吉原大作、朝日通雄、谷口直之、鈴木敬一郎、ホスホランバンの *O*-GlcNAc 修飾が糖尿病性心筋症へ及ぼす影響について、日本メーラード学会、平成20年11月28日(東京)

② Yokoe S, Asahi M, Suzuki K, Taniguchi N, Miyoshi E, *O*-GlcNAcylation of phospholamban induces cardiac dysfunction, 日本生化学会, 07.12.13 (Yokohama)

- ③ Mizuno Y, Asahi M, Misumi Y, Yamauchi M, Sano M, Wang X, Taniguchi N, Miyoshi E, Abnormality of Glutathione Metabolism in Fut8 Null-mice: Implications for Their Newborn Death, 07.12.13 (Yokohama)
- ④ Yokoe S, Asahi M, Suzuki K, Taniguchi N, Miyoshi E, *O*-GlcNAcylation of phospholamban induces cardiac dysfunction, *Glycobiology*2007, 07.11.13 (Boston)
- ⑤ Mizuno Y, Asahi M, Misumi Y, Yamauchi M, Sano M, Taniguchi N, Miyoshi E, Abnormality of Glutathione Metabolism in Fut8 Null-mice: Implications for Their Newborn Death, 札幌癌セミナー, 07.7.11-13 (Sapporo)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝日 通雄 (Asahi Michio)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：10397614