

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07058

研究課題名(和文)グリセロールリン酸含有糖鎖の生物学的意義の解明

研究課題名(英文) Investigation of the biological significance of glycerol phosphate-containing glycan

研究代表者

今江 理恵子 (Imae, Rieko)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：60584000

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)：CDP-グリセロール(CDP-Gro)はグリセロールリン酸が糖鎖に導入される際の供与体となる。本研究において、CDP-Groがヒト細胞やマウス臓器にも存在することを初めて明らかにした。マウス臓器では特に肝臓においてCDP-Gro含有量が多く、また、癌細胞では正常細胞に比べてCDP-Groが多い傾向が見られた。さらに、CDP-Groの合成酵素としてPCYT2を同定し、グリセロール-3-リン酸とCTPからCDP-Groが合成されるという新たな代謝経路を発見した。また、PCYT2の発現抑制によりCDP-Groを減少させると、 α -ジストログリカンにおけるラミニン結合性糖鎖の合成が亢進することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖は細胞表面に多く存在し、細胞接着やシグナル伝達などの様々な生命現象に関わるほか、疾患の発症にも深く関わっている。一方、糖鎖はその構造的な複雑さから解析が難しく、未知の糖鎖構造や糖鎖機能が多く残されていると考えられる。近年、哺乳動物の糖鎖の新たな構成因子としてグリセロールリン酸が報告されたが、グリセロールリン酸を含む糖鎖の生物学的意義はほとんど明らかになっていない。本研究からグリセロールリン酸含有糖鎖の合成に関わる分子基盤が明らかになったことで、その機能に迫ることが可能となった。今後、肝臓や癌等に着目して本糖鎖の役割を解析することで、新たな治療標的の創出につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：CDP-glycerol (CDP-Gro) is a donor substrate for the transfer of glycerol phosphate into the glycan. In this study, we identified CDP-Gro in cultured human cells or mouse tissues for the first time. Among the various mouse tissues, liver contains high amount of CDP-Gro. In addition, cultured cancer cells tend to contain high amount of CDP-Gro compared to normal cells. Furthermore, we identified PCYT2 as a responsible enzyme for CDP-Gro synthesis, and found a novel metabolic pathway which produces CDP-Gro from glycerol-3-phosphate and CTP. We also found that the synthesis of laminin-binding glycan on α -dystroglycan was enhanced by reducing the cellular content of CDP-Gro with PCYT2 suppression.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：CDP-グリセロール PCYT2 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

形質膜に存在するジストロフィン-糖タンパク質複合体は、細胞外マトリックスとアクチン細胞骨格とを繋ぐ役割を果たしている。このうち、細胞表面に位置する α -ジストログリカン (α -DG) は高度に糖鎖修飾を受けており、core M3 型糖鎖と呼ばれる *O*-マンノース型糖鎖を介してラミニンなどの細胞外マトリックス成分と結合する。

α -DG の core M3 型糖鎖に異常が生じると、中枢神経系の障害を伴う筋ジストロフィー症の原因となるほか、網膜色素変性症や癌の進行が引き起こされる。近年、 α -DG の糖鎖構造の全貌が明らかになり、新規の糖鎖構成因子である「リビトールリン酸 (RboP)」が 2 つタンデムにつながった構造が含まれることが分かった (図 1A) (Kanagawa *et al.*, *Cell Rep* 14, 2209-2223, 2016)。この構造は、糖転移酵素である FKTN と FKRP が、CDP-リビトール (CDP-Rbo) を供与体 (ドナー) として RboP を順に転移することで形成される。

一方で、 α -DG の糖鎖には、RboP の代わりにグリセロールリン酸 (GroP) が含まれる糖鎖構造が存在することが報告された (図 1B,C) (Yagi *et al.*, *Mol Cell Proteomics* 15, 3424-3434, 2016)。これは、糖鎖における GroP の存在を示した初めての知見である。我々は、FKTN と FKRP は RboP 転移活性だけでなく、CDP-グリセロール (CDP-Gro) を供与体として GroP を転移する活性も有しており、FKTN によって GroP が転移されると、さらなる糖鎖の伸長は起こらず、細胞外マトリックス結合能が失われることを明らかにした (図 2)。また、CDP-Gro は FKTN や FKRP の RboP 転移活性を阻害する効果を持つことも見出した。これらの結果から、CDP-Gro は α -DG の糖鎖伸長の阻害因子であることを提唱した (Imae *et al.*, *J Biol Chem* 293, 12186-12198, 2018)。しかし、哺乳動物では CDP-Gro の存在やその合成機構について全く分かっておらず、また、GroP が糖鎖に含まれることが生物学的にどのような意義があるのか、についてもほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、GroP を含む糖鎖の生物学的意義を明らかにするために、まず、GroP の供与体である CDP-Gro に着目し、その存在を確認する。さらに、生体内の GroP 含有糖鎖の合成制御を可能にするために、CDP-Gro の生合成機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CDP-Gro の定量分析

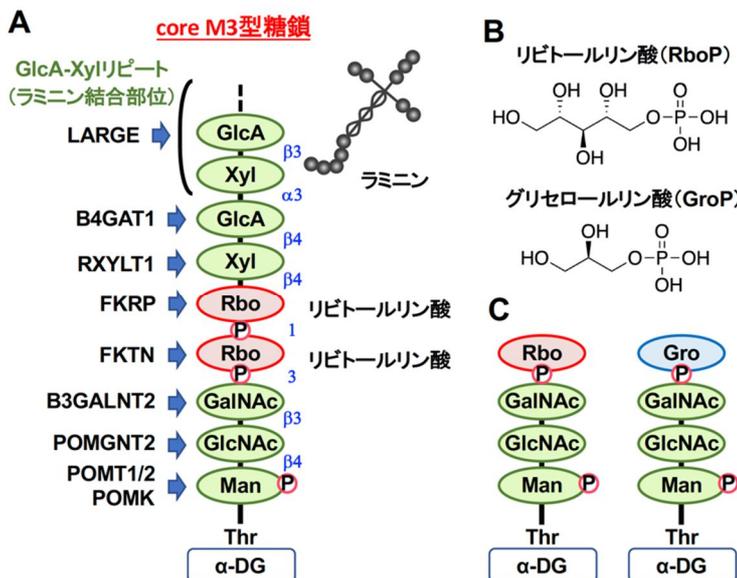


図 1 (A) ラミニン結合性 core M3 型糖鎖の構造と生合成酵素. (B) RboP、GroP の構造式. (C) RboP または GroP を含む core M3 型糖鎖の構造.

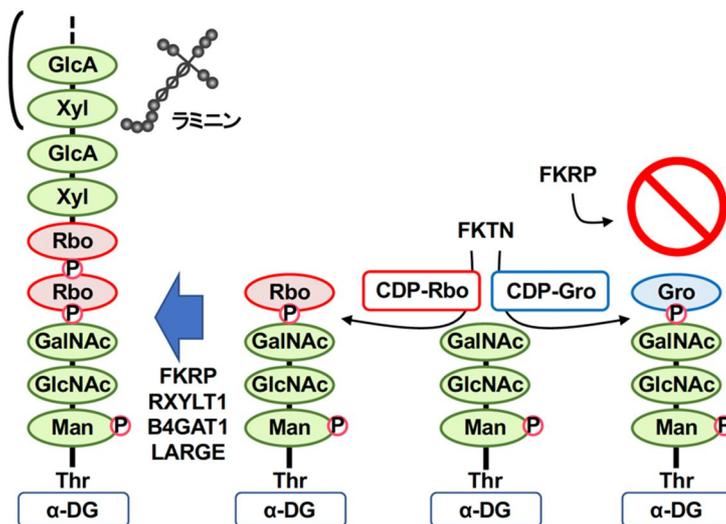


図 2 FKTN による GroP 転移と糖鎖伸長阻害.

細胞やマウス臓器における微量な CDP-Gro を定量するため、高分解能精密質量分析が可能なオービトラップを搭載した Q Exactive ハイブリッド四重極-質量分析計 (ThermoFisher) を用いた LC-MS/MS による CDP-Gro の定量分析系を構築した。細胞やマウス臓器サンプルについては、まず 75%エタノールによる極性化合物の抽出、ブタノールによる脂質成分の除去の後、ENVI-Carb SPE (固相抽出) による糖ヌクレオチド画分の濃縮を行ったものを LC-MS/MS に供した。サンプル前処理による CDP-Gro の回収率については、予めサンプルに添加した [¹³C]CDP-Gro の回収率から計算した。 [¹³C]CDP-Gro は、超好熱菌由来の CDP-グリセロール合成酵素 GCT を用いて [¹³C]CTP とグリセロール-3-リン酸から合成した。

(2) CDP-Gro 合成酵素の同定

バクテリア等では、CDP-Gro は Glycerol-3-phosphate cytidyltransferase (GCT) によってグリセロール-3-リン酸と CTP から合成される。哺乳動物には GCT のホモログは存在しないが、GCT が属する cytidyltransferase ファミリーには哺乳動物の PCYT1A, PCYT1B, PCYT2 という分子が存在する。これらの分子の中に CDP-Gro 合成活性を持つものがある可能性を考え、ヒト PCYT1A, PCYT1B, PCYT2 遺伝子の発現プラスミドを作成した。これらを用いて HCT116 細胞に PCYT1A, PCYT1B, PCYT2 をそれぞれ発現させて酵素活性を測定した。活性測定の基質にはグリセロール-3-リン酸と [¹³C]CTP を用い、 [¹³C]CDP-Gro の合成を上記の LC-MS/MS により確認した。さらに、活性が確認された分子について、HAP1 細胞と HCT116 細胞を用いて siRNA のトランスフェクションによる発現抑制を行い、細胞内 CDP-Gro 量の測定を行った。

(3) -DG 糖鎖合成の解析

細胞に 1% Triton X-100 TBS (protease inhibitor 含有) を添加してライセートを調製した後、WGA-agarose を用いて糖タンパク質を濃縮した。ウェスタンブロットティングにより、-DG のラミニン結合性糖鎖 (1 次抗体: 11H6) 及び -DG コアタンパク (1 次抗体: 3D7) の分子量を解析することで、-DG における糖鎖修飾度合いを調べた。また、ラミニン結合アッセイにより、ラミニン結合性糖鎖の量を解析した。

4. 研究成果

(1) CDP-Gro の定量分析

精密質量を用いた LC-MS/MS による CDP-グリセロールの定量分析系を構築することができた。この分析系を用いて、ヒト培養細胞 (HEK293T, HAP1, HCT116) やマウス臓器において CDP-Gro が存在することを初めて明らかにした (図 3A)。また、細胞種によって CDP-Rbo と CDP-Gro の比率が異なることも見出し (図 3B)、これらのドナー基質量の制御による糖鎖伸長制御機構の存在が示唆された。マウス臓器においては、多くの臓器では CDP-Gro の含有量は低い、肝臓では高い含有量が認められた。また、培養細胞においては、癌細胞で正常細胞と比較して CDP-Gro の含有量が高い傾向が見られた。これらの結果から、実際に生体内で CDP-Gro による -DG の糖鎖伸長阻害が起こり得ること、また、CDP-Gro/GroP 含有糖鎖は特に肝臓や癌細胞において何らかの役割を持つことが示唆された。

(2) CDP-Gro 合成酵素 PCYT2 の同定

CDP-Gro 合成酵素の候補分子 PCYT1A, PCYT1B, PCYT2 を発現させた細胞のライセートを用いて活性測定を行った結果、PCYT2 を発現させた細胞において CDP-Gro 合成活性が増加することが分かった。次に、HAP1 細胞と HCT116 細胞を用いて siRNA による PCYT2 発現抑制系を構築した。siRNA は 2 種類使用し、トランスフェクション後 72 時間で細胞を回収したところ、いずれの siRNA でも PCYT2 の発現が顕著に減少することを確認した。この細胞において CDP-Gro の量を測定したところ、いずれの細胞種でも、またいずれの siRNA でも、CDP-Gro 量がコントロールと比較して顕著に減少していることが分かった。以上の結果から、PCYT2 は哺乳動物における CDP-Gro 合成酵素であることが明らかとなった (図 3C)。一方、PCYT2 はホスホエタノールアミンと CTP から CDP-エタノールアミンを合成する酵素として知られており、生体膜リン脂質の主要な成分であるホスファチジルエタノールアミン (PE) の合成において重要な役割を担っている。実際、PCYT2 の発現抑制により、CDP-エタノールアミン量も減少することが確認された。

(3) PCYT2 発現抑制による -DG 糖鎖伸長への影響の解析

これまで、CDP-Gro の -DG 糖鎖伸長阻害は *in vitro* においてのみ示されていたが、実際に細胞レベルで CDP-Gro が -DG 糖鎖伸長においてどの程度寄与しているかは不明であった。そこで HAP1 細胞における PCYT2 発現抑制系を用いて、-DG 糖鎖修飾の程度を解析した。PCYT2 の発現抑制から -DG のターンオーバーにかかる時間を考慮し、siRNA のトランスフェクション後 72 時間で再度 siRNA をトランスフェクションし、その後 72 時間の時点で細胞を回収した。この細胞における CDP-Gro や CDP-エタノールアミンの量を解析したところ、コントロールと比較して CDP-Gro 量は顕著に低下しており、ほぼ検出限界以下であった。一方、CDP-エタノールアミン量に関しては、CDP-Gro 量ほど顕著な低下は見られず、特に 1 つの siRNA では CDP-エタノールアミン量が 7 割程度残っていた。この細胞を用いて -DG のラミニン結合性糖鎖や -DG コアタンパ

クの抗体によるウェスタンブロッティングを行ったところ、ラミニン結合性糖鎖の量の増加、および α -DG コアタンパクの分子量の増加が確認され、糖鎖伸長が亢進していることが示唆された。さらに、タンパク質を転写したメンブレンを用いてラミニン結合アッセイを行った結果からも、ラミニン結合性糖鎖量の増加が確認できた。PCYT2 の発現抑制により CDP-Gro 量は顕著に減少するが、CDP-エタノールアミンは大きな減少は見られないことから、 α -DG 糖鎖伸長亢進作用は CDP-Gro が減少したことによる可能性が高いと考えられる。以上より、細胞レベルにおいても CDP-Gro が α -DG 糖鎖伸長を阻害していることが強く示唆された。

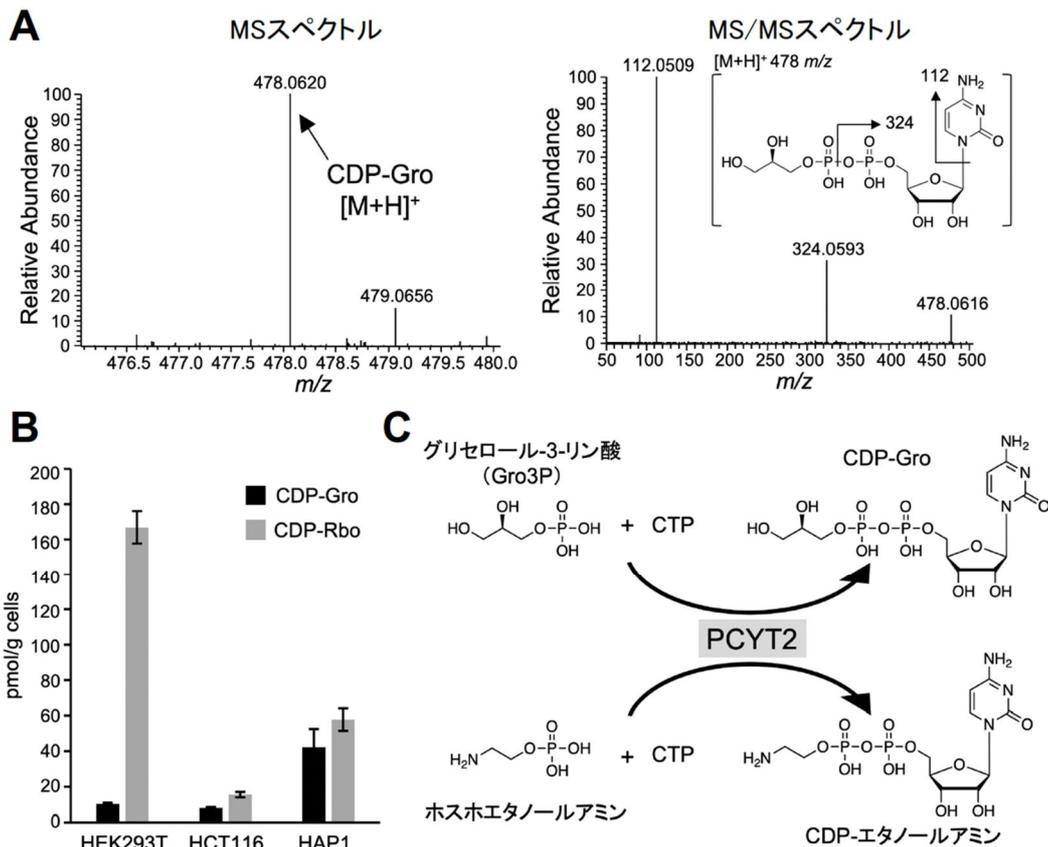


図 3 哺乳動物における CDP-Gro の発見と生合成経路の同定. (A) 精密質量分析計を用いた HAP1 細胞における CDP-Gro の同定. (B) ヒト培養細胞種における CDP-Gro と CDP-Rbo の含有量の違い. (C) PCYT2 による CDP-Gro の生合成.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Rieko Imae, Naoyuki Kuwabara, Hiroshi Many, Tomohiro Tanaka, Masato Tsuyuguchi, Mamoru Mizuno, Tamao Endo, Ryuichi Kato	4. 巻 26
2. 論文標題 The structure of POMGNT2 provides new insights into the mechanism to determine the functional O-mannosylation site on α -dystroglycan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 485-494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12853	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 Rieko Imae, Hiroshi Many, Hiroki Tsumoto, Yuri Miura, Tamao Endo	4. 巻 170
2. 論文標題 PCYT2 synthesizes CDP-glycerol in mammals and reduced PCYT2 enhances the expression of functionally glycosylated α -dystroglycan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 183-194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvab069	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 Rieko Imae, Hiroshi Many, Tamao Endo	4. 巻 26
2. 論文標題 Biosynthetic mechanisms and biological significance of glycerol phosphate-containing glycan in mammals.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 6675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules26216675	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 Imae R, Kuwabara N, Many H, Kato R, Endo T	4. 巻 32
2. 論文標題 Biosynthetic mechanisms of a unique ribitol phosphate-containing glycan by FKRP, a ribitol phosphate transferase.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E195-200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4052/tigg.2008.1E	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 今江 理恵子、桑原 直之、萬谷 博、加藤 龍一、遠藤 玉夫	4. 巻 92
2. 論文標題 筋ジストロフィー症原因遺伝子産物FKRPによるリビトールリン酸含有糖鎖の合成機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 811-816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920811	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 Kuwabara N, Imae R, Many H, Tanaka T, Mizuno M, Tsumoto H, Kanagawa M, Kobayashi K, Toda T, Senda T, Endo T, Kato R.	4. 巻 11
2. 論文標題 Crystal structures of fukutin-related protein (FKRP), a ribitol-phosphate transferase related to muscular dystrophy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-14220-z.	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 今江 理恵子、萬谷 博、津元 裕樹、三浦 ゆり、遠藤 玉夫
2. 発表標題 CDP-エタノールアミン合成酵素PCYT2によるCDP-グリセロールの合成および -ジストログリカンの制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星野 駿介、今江 理恵子、萬谷 博、遠藤 玉夫
2. 発表標題 哺乳動物細胞におけるリビトールリン酸生成経路の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 萬谷 博、今江 理恵子、桑原 直之、田中 智博、露口 正人、水野 真盛、加藤 龍一、遠藤 玉夫
2. 発表標題 構造解析に基づくO-マンノース型糖鎖の生合成機構
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 露口 正人、桑原 直之、萬谷 博、今江 理恵子、田中 智博、水野 真盛、遠藤玉夫、加藤 龍一
2. 発表標題 筋ジストロフィー症に関わる糖転移酵素POMGNT2の基質認識の分子機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今江 理恵子、萬谷 博、津元 裕樹、三浦 ゆり、遠藤 玉夫
2. 発表標題 CDP-エタノールアミン合成酵素PCYT2によるCDP-グリセロール生合成機構の発見および -ジストログリカンの機能制御
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 星野 駿介、今江 理恵子、萬谷 博、遠藤 玉夫
2. 発表標題 哺乳類におけるリピトールリン酸産生酵素の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今江 理恵子、桑原 直之、萬谷 博、加藤 龍一、遠藤 玉夫
2. 発表標題 リピトールリン酸転移酵素FKRPによるO-マンノース型糖鎖伸長機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今江 理恵子、桑原 直之、萬谷 博、加藤 龍一、遠藤 玉夫
2. 発表標題 O-マンノース型糖鎖の伸長過程におけるFKRPによるリピトールリン酸転移機構
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今江 理恵子、桑原 直之、萬谷 博、加藤 龍一、遠藤 玉夫
2. 発表標題 筋ジストロフィー症原因遺伝子産物FKRPによるO-マンノース型糖鎖へのリピトールリン酸転移機構
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今江 理恵子、萬谷 博、津元 裕樹、石渡 俊行、遠藤 玉夫
2. 発表標題 グリセロールリン酸供与体CDP-グリセロールの哺乳動物における定量分析
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今江 理恵子、萬谷 博、津元 裕樹、石渡 俊行、遠藤 玉夫
2. 発表標題 哺乳動物培養細胞および組織におけるCDP-グリセロールの定量分析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今江 理恵子、萬谷 博、津元 裕樹、遠藤 玉夫
2. 発表標題 -ジストログリカン糖鎖合成阻害因子CDP-グリセロールの定量分析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020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