

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2008～2013

課題番号：20249018

研究課題名(和文) アセチルグルコサミン糖鎖サイクルの生体制御機構の解析

研究課題名(英文) Biological Regulation of GlcNAc cycle

研究代表者

谷口 直之(Taniguchi, Naoyuki)

独立行政法人理化学研究所・システム糖鎖生物学研究グループ・グループディレクター

研究者番号：90002188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,200,000円、(間接経費) 11,460,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では新たな切り口として「糖鎖サイクル」という糖鎖の一生を形作る生合成、機能発現を統合的に捉える概念を提案し、生活習慣病や神経変性疾患との関わりについて検討した。細胞外からの単糖流入を追跡する糖ヌクレオチド代謝動態追跡法、細胞内糖ヌクレオチドの一斉定量法、糖ヌクレオチドから各糖鎖への合成の流れを追跡する方法を確立することによりGlcNAcの細胞内動態を追跡した。グルコサミン転移酵素-IIIは、1-6フコース転移酵素欠損時に補完的な働くことを見出した。他、GnT-IXのエピジェネティックな遺伝子発現制御やゴルジ体での酵素活性調節など糖鎖の生合成が多段階で制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We proposed a fundamental paradigm "GlcNAc cycle" that living cell regulates biosynthesis and catabolism of glycans in response to pathological changes. We could grasp the dynamic cellular information by analyzing the each step in glycosylation. Nucleotide sugars level were simultaneously determined by ion-pair HPLC. Mass isotopomer analysis of metabolically labeled nucleotide sugars and N- and O-glycans revealed the UDP-GlcNAc metabolisms. We also developed a HPLC method for various GlcNAc transferases activities, and found the endogenous inhibitory factor for GlcNAc transferase-IX (GnT-IX) in Neuro2a cells. Brain-specific expression of the GnT-IX was also regulated by epigenetic histone modifications. In addition, GnT-III compensated for the loss of core fucose functions. These data suggested that glycosylation is regulated by multiple stages in cellular GlcNAc metabolisms.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医化学、基礎医学

キーワード：糖鎖修飾 糖ヌクレオチド 糖転移酵素

1. 研究開始当初の背景

糖鎖付加は最も主要な翻訳語修飾であり、多くの生命科学の領域において糖鎖が重要な機能をもっていることは周知の事実である。そして糖鎖が癌、糖尿病などの生活習慣病や神経変性疾患といった病態で、その成因、診断や治療に直接あるいは間接的に関与することが指摘されている。申請者らはこれまで糖タンパク質の N 結合型糖鎖の枝分かれを合成する糖転移酵素の多くを分離精製、遺伝子クローニング、その遺伝子を導入した糖鎖改変動物や細胞を用いた表現型解析などを通じて、糖鎖の生理的意義の解明を進めてきた。更に各糖転移酵素が作用する標的タンパク質をグライコプロテオミクス手法により同定した後、標的糖タンパク質が本来もっている機能を調べることによって機能グリコミクス研究を推進してきた。その一方で、これらの糖タンパク質糖鎖の機能は糖ヌクレオチドや糖ヌクレオチド輸送体などによっても制御されることも報告した。このような長年の研究成果に基づいて、我々は新しい切り口として「糖鎖サイクル」という糖鎖の一生を形作る生合成、機能発現までの流れを統合的に捉えることの必要性に到達した。

N-アセチルグルコサミン糖鎖サイクルにおいて、グルコースは細胞外からグルコース輸送体 (GLUT2) によって細胞内に取り込まれ、ヘキソサミン経路によって糖ヌクレオチドである UDP-GlcNAc に変換される。UDP-GlcNAc の一部は細胞内や核に存在する O-GlcNAc 転移酵素のドナーとして使われ、O-GlcNAc 化されるが、その他は UDP-GlcNAc 輸送体によってゴルジ体に入り、そこで GlcNAc 転移酵素のドナーとして使われる。GLUT2 の場合、GnT-IV などの転移酵素により GLUT2 に GlcNAc を付加して、糖タンパク質 (GLUT2) 本来の機能を発揮される。このサイクルのいずれかが異常を来すると GLUT2 の機能は失われる。すなわち糖鎖修飾は極めて合理的に細胞環境に応じて、その合成・分解を調節し適切な応答を行っていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では糖タンパク質のもつ糖鎖機能を個別に解析するのではなく、「糖鎖サイクル」として糖鎖の生合成を担う、1) 単糖の代謝、2) 糖ヌクレオチド、3) 糖ヌクレオチド輸送体、4) 糖転移酵素、5) 細胞膜受容体糖鎖、それぞれの機能を理解して最終的にそれらを統合的に理解する。具体的には、これらの各々のステップを効率よく捉える解析法の確立から、病態における糖鎖シグナルを解明し、疾患の発生機構、治療への基盤的な研究を進めることを目的とする。

3. 研究の方法

糖ヌクレオチドの一斉定量

細胞試料由来の糖ヌクレオチドは、エタノール沈殿して得られる画分を、更にグラファイトカーボンカラムを用いた固相抽出により精製した。特定のオクタデシルカラムを用いる最適化したイオンペア逆相 HPLC 法により分析した。

質量同位体測定による糖鎖修飾の動態追跡

上記 HPLC 法を MS と直結し、更に安定同位体単糖 $^{13}\text{C}_6$ -グルコースにより標識した糖ヌクレオチドの質量同位体のパターンを測定するシステムを構築した。得られた同位体分布は、もともと天然に存在する同位体の割合を差し引いて、 $^{13}\text{C}_6$ でラベルされた各部位の割合を百分率として数値化した。

同様に糖ヌクレオチドがどの糖鎖にどの程度取り込まれたか、その全貌を追跡するため $^{13}\text{C}_2$ -グルコサミン (GlcN) で標識した糖鎖の質量同位体分布を測定した。代謝標識した細胞から糖タンパク質由来 N 結合型糖鎖、O 結合型糖鎖を糖アルコール体としてキャピラリー LC-ESI-MS により各々の糖鎖がラベルされた割合を数値化した。

GlcNAc 転移酵素の酵素活性測定法

細胞可溶化液の存在下で N 型糖鎖の分岐に関わる酵素群の活性を HPLC により測定する方法を確立した。各々の GnT の基質になりうるピリジルアミノ化糖鎖を選定し、それらと酵素反応生成物を一斉分離する条件により GnT-III, IV, V, および IX の酵素活性を測定した。

糖転移酵素間における補完的メカニズムの解析

糖転移酵素を欠損したマウス由来の繊維芽細胞株を用いて、野生株と欠損株における単糖代謝フラックス、糖ヌクレオチド、GlcNAc 転移酵素の活性、糖鎖構造の質的・量的変動を比較した。本研究ではコアフコース酵素欠損マウスにおける GnT-III の発現誘導について着目して生化学的解析を行った。

GnT-IX の内在性阻害因子の同定

上記 GlcNAc 転移酵素の活性測定法を利用して、特に脳・神経系に限定して発現して、O-マンノース糖鎖の分岐鎖合成を担う糖転移酵素 (GnT-IX) に対する阻害因子を探索した。神経芽細胞腫細胞株に認められた GnT-IX に対する阻害効果を見出した。阻害因子はクロマトグラフィーを用いて生化学的に精製後して同定した。

GnT-IX のエピジェネティックな発現制御素

GnT-IX を発現しているマウス脳の細胞と発現していない腎臓の細胞株を用いて、この遺伝子の周辺にあるヒストンの活性化の様

子を解析した。クロマチン沈降法とゲルシフト法などによりヒストンの活性化状態を明らかにするとともに、GnT-IX の発現制御する転写因子を同定した。

GnT-IX の脱髄疾患における役割解明

GnT-IX 欠損マウスと野生型マウスにそれぞれクプリゾン投与し、人為的に脱髄を進行させて両者の組織学的解析を行った。生化学的解析をもとに GnT-IX の生理的基質を探索し、GnT-IX による再ミエリン化の抑制メカニズムを検討した。

4. 研究成果

N アセチルグルコサミンサイクルを捉える解析技術の確立

糖鎖修飾に関わる糖ヌクレオチド (UDP-GlcNAc を含む) とヌクレオチドの一斉分離に世界で初めて成功した。糖ヌクレオチドの一斉定量が可能になった。癌細胞株では正常細胞株に比べて UDP-GlcNAc レベルが有意に高いことがわかった。癌細胞株の由来組織によって、癌微小環境における糖ヌクレオチドの低グルコース刺激に対する応答が異なった。膵臓がん細胞株においては、特異的に UDP-Gal や UDP-GlcNAc が劇的に減少することを見出した。

確立した単糖代謝動態を追跡により、UDP-GlcNAc の代謝経路をモニターできることを明らかにした。具体的には UDP-GlcNAc と CMP-NeuAc の質量同位体分布から UDP-GlcNAc の生合成に関わるヘキサミン経路、核酸合成経路、解糖系、利用経路に関わる CMP-NeuAc の合成系の流れを数値化することに成功した。応用例として、肝癌細胞株と膵臓細胞株 (インスリノーマ) を比較したところ、膵臓細胞株では解糖系や CMP-NeuAc の合成系が極めて遅いことがわかった。

$^{13}\text{C}_2$ グルコサミンでラベルされた割合は、糖鎖の合成速度を反映することがわかった。応用例として同様に、肝癌細胞株と膵臓細胞株 (インスリノーマ) を比較した結果、膵臓細胞株のシアロ糖鎖の含量が少なく、且つ、シアロ酸残基がラベルされにくいことがわかった。この結果は、CMP-NeuAc の合成速度が遅いことがシアロ酸修飾に影響を及ぼしていることを示す。更に、糖尿病条件下の膵臓細胞株においてヘキサミン経路や解糖系の UDP-GlcNAc 合成経路が亢進していることも確認した。

In-vitro や過剰発現系でしか測定できなかった GnT-IX の活性測定法を確立した。この方法の確立に伴って、N 結合型糖鎖の分岐に関わる酵素群 (GnT-III, GnT-IV, GnT-V および GnT-IV) の活性を HPLC により一斉評価することが可能になった。

GlcNAc サイクルの制御機構の解析

GnT-III とコアフコース転移酵素 (FuT-8) において補完的なメカニズムあることを突き止めた。具体的には Fut-8 欠損マウスの繊維芽細胞や血清中の免疫グロブリンの糖鎖を定量解析したところ、GnT-III により作られるバイセクティング GlcNAc を有する糖鎖が 3 倍に増加していた。野生型に比べて GnT-III の発現に関わる mRNA が 3 倍に、その酵素活性も 8 倍に増加していた。原因を解明するため、Fut8 欠損 MEF 細胞の遺伝子変化を調べたところ、同細胞内でシグナル伝達物質である Wnt のターゲット遺伝子群が増加していること、また遺伝子の転写を活性化するカテニンが蓄積していることがわかった。

神経芽細胞腫細胞株から GlcNAc 転移酵素 (GnT-IX) の酵素活性調節因子 (エクトヌクレオチドピロホスファターゼ / ホスホジエステラーゼ 3: ENPP3) を同定した。その酵素学的解析から、ENPP3 により UDP-GlcNAc が加水分解されて生じる UMP が、UDP-GlcNAc に対する競争的阻害因子として働いて GnT-IX の活性を阻害していることを明らかにした。

GnT の組織特異的な遺伝子発現制御機構を明らかにするため、GnT-IX のプロモーター部分に対するクロマチン沈降実験を行った結果、脳以外の組織では抑制性クロマチンが結合しているのに対して、脳では活性化クロマチンが結合していることがわかった。さらにニューロン系の細胞では CTCF や NeuroD1 などの転写因子がリクルートされて GnT-IX の転写活性化が起きていることがわかった。

GnT-IX ノックアウトマウスの解析結果から、GnT-IX が受容体型プロテインチロシンホスファターゼ β (RPTP β) を生理的基質とすることを明らかにした。RPTP β は脱髄に関する役割があることが知られていたため GnT-IX 欠損マウスを用いて可逆的な脱髄モデルを作成した。GnT-IX 欠損マウスは野生型マウスに比べて脱髄が軽症であることを明らかにした。さらに脳梁部分のアストログリオシスが減衰していること、その結果としてオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化が促進されていることなどを見出し、GnT-IX は再ミエリン化を抑制する役割を持つことがわかった。

血管内皮スカベンジャー受容体 SREC-1 を一例として、細胞膜受容体糖鎖の役割を明らかにした。SREC-1 を発現した CHO 細胞を樹立し、3 カ所の糖鎖修飾部位を同定、各々の糖鎖構造と機能を検討した。各付加部位の糖鎖がリガンドとの結合、膜輸送、プロテアーゼに対する抵抗性に関わっていることを明らかにした。

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 15 件)

- (1) Okahara K, Kizuka Y, Kitazume S, Ota F, Nakajima K, Hirabayashi Y, Maekawa M, Yoshikawa T, Taniguchi N. Ceramide galactosyltransferase expression is regulated positively by Nkx2.2 and negatively by OLIG2. *Glycobiology*. (in Press)
- (2) Kizuka Y, Kitazume S, Okahara K, Villagra A, Sotomayor EM, Taniguchi N. Epigenetic regulation of a brain-specific glycosyltransferase N-acetylglucosaminyltransferase-IX (GnT-IX) by specific chromatin modifiers. *J Biol Chem*. 2014 Apr 18;289(16):11253-61. (Epub 2014 Mar 10.) 10.1074/jbc.M114.554311. 査読有
- (3) Kurimoto A, Kitazume S, Kizuka Y, Nakajima K, Oka R, Fujinawa R, Korekane H, Yamaguchi Y, Wada Y, Taniguchi N. The absence of core fucose upregulates GnT-III and Wnt target genes: a possible mechanism for an adaptive response in terms of glycan function. *J Biol Chem*. 2014 Apr 25;289(17):11704-14. (Epub 2014 Mar 10.) 10.1074/jbc.M113.502542. 査読有
- (4) Korekane H, Park JY, Matsumoto A, Nakajima K, Takamatsu S, Ohtsubo K, Miyamoto Y, Hanashima S, Kanekiyo K, Kitazume S, Yamaguchi Y, Matsuo I, Taniguchi N. Identification of Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 3 (ENPP3) as a Regulator of N-Acetylglucosaminyltransferase GnT-IX (GnT-Vb). *J. Biol. Chem.*, 288(39): 27912-27926, 2013. 10.1074/jbc.M113.474304. 査読有
- (5) Ito E, Nakajima K, Waki H, Miseki K, Shimada T, Sato TA, Kakehi K, Suzuki M, Taniguchi N, Suzuki A. Structural characterization of pyridylaminated oligosaccharides derived from neutral glycosphingolipids by high-sensitivity capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 2013 Aug 20;85(16):7859-65. (Epub 2013 Aug 9.) 10.1021/ac401460f. 査読有
- (6) Kobayashi S, Fujinawa R, Ota F, Kobayashi S, Angata T, Ueno M, Maeno T, Kitazume S, Yoshida K, Ishii T, Gao C, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Betsuyaku T, Kida K, Taniguchi N. A Single Dose of LPS into Mice with Emphysema Mimics Human COPD Exacerbation as Assessed by

Micro-CT. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2013 Dec;49(6):971-7. 10.1165/rcmb.2013-00740C. 査読有

- (7) Kanekiyo K, Inamori K, Kitazume S, Sato K, Maeda J, Higuchi M, Kizuka Y, Korekane H, Matsuo I, Honke K, Taniguchi N. Loss of branched O-mannosyl glycans in astrocytes accelerates remyelination. *J. Neurosci.*, 33(24): 10037-10047, 2013. 10.1523/JNEUROSCI.3137-12.2013. 査読有
 - (8) Nakajima K, Ito E, Ohtsubo K, Shirato K, Takamiya R, Kitazume S, Angata T, Taniguchi N. Mass isotopomer analysis of metabolically labeled nucleotide sugars and N- and o-glycans for tracing nucleotide sugar metabolisms. *Mol. Cell Proteomics*, 12(9): 2468-2480, 2013. 10.1074/mcp.M112.027151. 査読有
 - (9) Shirato K, Gao C, Ota F, Angata T, Shogomori H, Ohtsubo K, Yoshida K, Lepenies B, Taniguchi N. Flagellin/Toll-like receptor 5 response was specifically attenuated by keratan sulfate disaccharide via decreased EGFR phosphorylation in normal human bronchial epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 435(3): 460-465, 2013. 10.1016/j.bbrc.2013.05.009. 査読有
 - (10) Ohtsubo K, Takamatsu S, Gao C, Korekane H, Kurosawa TM, Taniguchi N. N-Glycosylation modulates the membrane sub-domain distribution and activity of glucose transporter 2 in pancreatic beta cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 434(2): 346-351, 2013. 10.1016/j.bbrc.2013.03.076. 査読有
- (他 5 件)

〔学会発表〕(計 20 件)

- (1) Naoyuki Taniguchi, Glycomics or glycoproteomics as essential tools for cancer biomarker discovery, US-Japan Joint Meeting on Biomarkers for Early Cancer Detection, 2014年2月10日, Rockville, MD at the new National Cancer Institute(NCI) Shady Grove Facility (Maryland, USA)
- (2) Naoyuki Taniguchi, Systems Glycobiology Approach for Understating the Disease Onset, Biomarker and Therapeutics, IUBMB 10th International Symposium on

- Cell Surface Macromolecules, 2014年1月22日, Fortune Park Panchwati, Kolkata, India
- (3) Naoyuki Taniguchi, The establishment of the Joint Research Center for Systems Chemical Biology, 4th Meeting for Max Planck Centers, 2014年1月13日, Max Planck Society, Munich, Germany
- (4) 谷口 直之, 多様な糖鎖の働きと疾患の発症、診断、治療への役割、山口大学 アカデミックドクター育成プログラム FD講演会、2013年12月18日、山口大学 総合研究棟 1階 S1講義室
- (5) Naoyuki Taniguchi, Systems Glycobiology for Understating the Disease Onset, Biomarker and Therapeutics, 17th KAST International Symposium, 2013年11月26日, Yonsei University, Seoul, Korea
- (6) Naoyuki Taniguchi, Global Network on Systems Glycobiology, The 3rd Austria/Japan Seminar Comparative and Developmental Glycobiology (第3回比較発生糖鎖生物学とその医工学の応用に関する日本・オーストリア2国間セミナー), 2013年7月2日, (独)理化学研究所(和光)鈴木梅太郎記念ホール
- (7) Naoyuki Taniguchi, The complex interplay of “yin and yang” in branched N-glycans: from bisecting GlcNAc to core fucose, GLYCO22, 2013年6月24日, conventioncenter of Dalian Institute of Chemical Physics, Dalian, China
- (8) Naoyuki Taniguchi, Glycosyltransferases involved in N-glycan branching: From biological functions to disease implication, Workshop on Cancer Research biological and molecular basis, 2013年5月17日, IMPIUP, Porto, Portugal
- (9) Naoyuki Taniguchi, Glycosyltransferases involved in N-glycan branching: From biological functions to disease implication, COS-Lecture, 2013年5月15日, Center for Organismal Studies Heidelberg, Germany
- (10) 谷口 直之, 糖鎖が拓く超域研究：疾患の発症から診断・治療まで、第13回京滋ハートセミナー、2013年5月9日、京都ホテルオークラ
- (11) 谷口 直之, 糖鎖と疾患：診断から治療への関わり、第101回日本泌尿器科学会総会、2013年4月26日、さっぽろ芸術文化の館
- (12) 谷口 直之, 糖鎖と疾患：診断から治療への関わり、愛媛大学プロテオサイエンスセンター開所式、2013年4月18日、松山 全日空ホテル 4階 ダイヤモンドボールルーム
- (13) Naoyuki Taniguchi, Alpha1,6 Fucosyltransferase, Fut8 is Implicated in Sensitivity to Emphysema in Mice and a Possible Predictive Marker for Disease Progression and Exacerbations in Chronic Obstructive Pulmonary Disease(COPD), RIKEN-Academia Sinica Joint Conference on Chemical Biology, 2013年3月2日, Conference Room 2, Building for Humanities and Social Sciences Academia Sinica, Taipei
- (14) 谷口 直之, 糖鎖を知る ~ 病気の診断から治療まで ~、SSH公開講演会、2013年2月2日、武庫川女子大学 公江記念講堂
- (15) Naoyuki Taniguchi, alpha1,6-Fucosyltransferase (Fut8) is implicated in vulnerability to smoke-induced emphysema in mice and a possible non-invasive predictive marker for human chronic obstructive pulmonary disease (COPD), Joint Meeting for Society for glycobiology and American Society for Matrix Biology, 2012年11月13日, San Diego Sheraton Hotel and Marina

(他5件)

〔図書〕(計9件)

- (1) Ryoji Nagai and Naoyuki Taniguchi, Elsevier, Medical Biochemistry 4th ed.(in Press)
- (2) Hideyuki Ihara, Hiroki Tsukamoto, Jianguo Gu, Eiji Miyoshi, Naoyuki Taniguchi, and Yoshitaka Ikeda, Springer, Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes Second Edition Volume1, 2014, 53:581-596
- (3) Kei-ichiro Inamori, Michael Pierce, and Naoyuki Taniguchi, Springer, Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes Second Edition Volume1, 2014, 22:247-256
- (4) James W. Dennis, Naoyuki Taniguchi, and Michael Pierce, Springer, Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes Second Edition Volume1, 2014, 21:233-246
- (5) Kazuaki Ohtsubo and Naoyuki Taniguchi, Springer, Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes Second Edition Volume1, 2014, 20:223-232
- (6) Ihara H, Tsukamoto H, Taniguchi N, Ikeda Y., Springer, Glycosyltransferases Methods in Molecular Biology Volume 1022 2013, 335-348
- (7) Taguchi T, Taniguchi N., Springer, Glycosyltransferases Methods in Molecular Biology Volume 1022 2013, 299-305
- (8) Takamatsu S, Korekane H, Ohtsubo K, Oguri S, Park JY, Matsumoto A, Taniguchi N., Springer, Glycosyltransferases Methods in Molecular Biology Volume 1022 2013, 283-298
- (9) Yoshitaka Ikeda, Hideyuki Ihara, Hiroki Tsukamoto, Jianguo Gu and Naoyuki Taniguchi, Springer, Handbook

of Glycosyltransferases and Related Genes Second Edition Volume1, 2014, 19:209-222

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷口 直之 (Taniguchi, Naoyuki)
(独)理化学研究所・グローバル研究クラスター 理研-マックスプランク連携研究センター システム糖鎖生物学研究グループ・グループディレクター
研究者番号：90002188

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

中嶋 和紀 (Nakajima, Kazuki)
(独)理化学研究所・脳科学総合研究センター 神経膜機能研究チーム・研究員
研究者番号：10442998

大坪 和明 (Ohtsubo, Kazuaki)
熊本大学・大学院生命科学研究部 先端生命医療科学部門 医療技術科学講座
研究者番号：30525457

是金 宏昭 (Korekane, Hiroaki)
(独)理化学研究所・グローバル研究クラスター 理研-マックスプランク連携研究センター システム糖鎖生物学研究グループ 疾患糖鎖研究チーム・研究員
研究者番号：50421912