

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2010～2012
課題番号：	22590297
研究課題名（和文）	心筋カルシウム制御タンパク質及びイオンチャンネルにおける糖鎖機能の解明
研究課題名（英文）	Functional analyses on the glycosylation in cardiac calcium-regulating proteins and ion channels
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（和文）：

糖鎖はタンパク質の主要な翻訳後修飾分子の一つであり、様々なタンパク質の機能を制御している。糖鎖には N 型糖鎖と O 型糖鎖があるが、O 型糖鎖の中で、O-GlcNAc という糖鎖による修飾に着目し、カルシウムシグナルタンパク質やイオンチャンネルに対する影響について研究を行った。ラット成体心筋細胞を用いて様々なタンパク質について検討したが、心機能の制御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心機能を低下させることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The glycosylation is one of the major post-translational modification, which regulates the function of various proteins. There are two types of glycosylation, N-linked and O-linked. Here, I studied about the effect of O-GlcNAcylation, one of the O-linked glycosylation, on the function of cardiac calcium-regulating proteins and ion channels. Although we examined such various proteins in rat adult cardiomyocytes, it was found that O-GlcNAcylation of phospholamban, which plays a crucial role in the regulation of cardiac function, was increased, and, simultaneously, its phosphorylation was inhibited, resulting in the reduction of cardiac function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学

1. 研究開始当初の背景

心臓の収縮は、心筋収縮関連タンパク質に

より制御されているが、その中でもカルシウム制御タンパク質による細胞内カルシウム

の変化が重要な役割を演じている。カルシウム制御タンパク質は局在により二つに分類でき、1、細胞膜にあるカルシウムチャネルやトランスポーター（L型カルシウムチャネル、Na-Ca交換体、細胞膜Ca-ATPaseなど）2、心筋小胞体タンパク質（筋小胞体Ca-ATPase、ホスホランバン、リアノジン受容体、カルセクエストリン、サルコリピンなど）となっており、これらのタンパク質の異常により心筋症が発症している。また、心臓のリズムは、ナトリウムチャネルやカリウムチャネルなどのイオンチャネルが重要な役割を演じていて、それらの異常が致死性不整脈の原因となっているという報告は枚挙に暇がない。

タンパク質の50%以上は糖鎖修飾を受けており、翻訳後修飾反応の中で最も頻度が高い。多くの生命科学の領域で、糖鎖が重要な機能をもっていることが明らかになり、癌、感染症、アレルギー、生活習慣病、神経変性疾患、筋肉変性疾患、糖鎖不全症といった病態で、その成因、診断や治療に直接あるいは間接的に糖鎖の関与が指摘されている。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（N型糖鎖）であり、もう1つはO-結合型糖付加（O型糖鎖）であるが、申請者らはこれまでそれらの機能解析を行ってきた。両者における代表となる実績を示す。

N型糖鎖 N型糖鎖は、細胞膜タンパク質に高率に修飾し、それらの機能や局在に関与しているが、申請者らは癌遺伝子であるErbファミリーの一つのErbB3の糖鎖を解析し、ある糖鎖の付加部位に変異を入れると、リガンドの存在なしに自己リン酸化し、ErbB2とのヘテロダイマーを形成し、Erbのシグナルが常に走ることにより細胞が癌化すること、すなわち、糖鎖がないとレセプターが正常に機能しないことを証明した。

O型糖鎖 O結合型β-N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)というO型糖鎖に焦点を絞った。O-GlcNAcのタンパク質への修飾部位がセリン、スレオニンであることからセリン、スレオニンキナーゼのリン酸化部位と競合し、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。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。申請者らは最近、主要な心筋収縮関連タンパク質であるSERCA2aの制御因子であるホスホランバンがO-GlcNAcの修飾を受けることを証明した。

2. 研究の目的

糖鎖はタンパク質の主要な翻訳後修飾分子の一つであり、様々なタンパク質の機能を制御している。本研究では、心筋の収縮に重要な働きをしているカルシウム制御タンパク質や心調律と関連性のあるイオンチャネルに対してN型糖鎖やO型糖鎖による修飾がどのように影響するかを追求することにより、心筋収縮機能や心調律に与える糖鎖の影響を明らかにし、糖鎖を標的とした心不全や不整脈の治療に対するin vivoを含めた基礎データを提供することを目的とした。将来的には糖鎖だけでなく、他の翻訳後修飾による心機能や不整脈の制御メカニズムにも視野を広げていく予定である。

3. 研究の方法

N型糖鎖による制御の検討

1) 細胞膜にあるイオンチャネルやトランスポーター（ナトリウムチャネル、カリウムチャネル、L型カルシウムチャネル、Na-Ca交換体など）のN型糖鎖修飾の有無とその役割の検討

(i) 糖鎖付加部位の同定

心機能や不整脈に関与すると考えられる心筋細胞膜タンパク質（ターゲットタンパク質）に対して、N型糖鎖の修飾の有無をペプチド:N-グリカナーゼ（PNGase）などの切断酵素により調べ、修飾の確認されたターゲットタンパク質に対して、その部位を同定する。糖鎖修飾の欠失したタンパク質（アスパラギン残基の変異体）を作製し分子量の変化の有無を確認した。

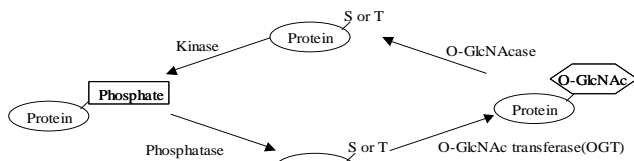
(ii) ターゲットタンパク質の糖鎖機能や局在変化の検討

糖鎖欠失ターゲットタンパク質を COS-1 細胞に発現させ、野生型タンパク質に比し局在に変化が見られないかどうかについて共焦点レーザー顕微鏡などを用いて検討した。イオンチャネル機能はパッチクランプ法によって検討した。(Ai T. et al Circulation 105:2592-2594, 2002)。

O 型糖鎖 (O-GlcNAc) による制御の検討

2) 心筋小胞体タンパク質 (筋小胞体 Ca-ATPase、リアノジン受容体、カルセクエストリン、サルコリピンなど) の O 型糖鎖 (O-GlcNAc) の役割の検討

近年 O 型糖鎖である O-GlcNAc が注目され、それによるタンパク質の修飾部位がセリン、スレオニンであることからセリン、スレオニンキナーゼのリン酸化部位と競合し、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きている (図 1)。



(図 1) リン酸化とO-グリコシル化におけるセリン(S)、スレオニン(T)残基の共有

申請者らは心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 により修飾され、そのリン酸化が抑制されることを証明した。本研究ではその他の心筋小胞体タンパク質 (筋小胞体 Ca-ATPase、リアノジン受容体、カルセクエストリン、サルコリピンなど) やイオンチャネルに対して、そのリン酸化による制御に O-GlcNAc の関与があるかについて検討した。リン酸化に影響しない場合でも、タンパク質が O-GlcNAc 化されることにより機能変化を起こす可能性もあるため、それも合わせて検討した。

(i) O-GlcNAc が心筋小胞体タンパク質やイオンチャネルに結合しているかについて免疫沈降法を用いて検討した。

(ii) 結合が認められたら、その修飾がそのタンパク質のリン酸化に影響を及ぼしているかを、O-GlcNAc の修飾の存在、非存在下

で、in vitro でリン酸化酵素を反応させ、リン酸化抗体によるウエスタンブロットにより検討した。

(iii) 心機能との関連を明らかにするため、ラット単離成体心筋細胞を用い、O-GlcNAc の修飾の存在、非存在下で、1~3 Hz 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(Nakai, A. et al Nat. Med. 13: 619-624, 2007)。また、イオンチャネル機能は、ラット単離成体心筋細胞を用い、パッチクランプ法で測定した。

4. 研究成果

心機能の制御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。さらに、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が示唆され、糖尿病性心筋症の 1 つのメカニズムと考えられた。現在、ホスホランバンノックアウトマウスを入手し、O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) マウスとの交配により in vivo において検証し、データが揃ってきている。その他、心筋に発現しているイオンチャネルやトランスポーターについても解析し、データの集積中である。

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、その病態の分子メカニズムを解明しそれらの治療の基礎研究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 4 件)

1. Sekiguchi H, Ii M, Jujo K, Thorne T, Ito A, Klyachko E, Hamada H, Kessler JA,

- Tabata Y, Kawana M, Asahi M, Hagiwara N, Losordo DW, Estradiol promotes neural stem cell differentiation into endothelial lineage and angiogenesis in injured peripheral nerve., *Angiogenesis.*, 16(1), 45-58, 2013, 査読有
2. Jujo K, Sekiguchi H, Klyachko E, Misener S, Tanaka T, Tongers J, Roncalli J, Renault MA, Thorne T, Ito A, Clarke T, Kamide C, Tsurumi Y, Hagiwara N, Qin G, Asahi M, Losordo DW, CXC-chemokine receptor 4 antagonist AMD3100 promotes cardiac functional recovery after ischemia/reperfusion injury via endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism., *Circulation*, 127(1), 63-73, 2013, 査読有
 3. Sano M, , Korekane H, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Kato M, Shibukawa Y, Tajiri M, Adachi H, Wada Y, Asahi M, and Taniguchi N, N-glycans of SREC-I (scavenger receptor expressed by endothelial cells): essential role for ligand binding, trafficking and stability, *Glycobiology*, 22(5), 714-24, 2012, 査読有
 4. Asai J, Takenaka H, Ii M, Asahi M, Kishimoto S, Katoh N, Losordo DW, Topical application of ex vivo expanded endothelial progenitor cells promotes vascularisation and wound healing in diabetic mice., *Int Wound J.*, 2012, 査読有
2. 原田智、梅垣英次、朝日通雄、樋口和秀、HO-1 発現誘導を介したインドメタシン起因性小腸粘膜傷害の抑制機序、第 31 回消化器病態生理勉強会、2012 年 07 月 28 日、京王プラザホテル
 3. 依田有紀子、中川孝俊、朝日通雄、ラット小腸上皮細胞 IEC-6 における lansoprazole による HO-1 発現誘導分子機構の検討、第 59 回日本生化学会近畿支部例会、2012 年 05 月 19 日、京都大学宇治おうばくプラザ

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

[学会発表] (計 3 件)

1. 中川孝俊、朝日通雄、アドレナリン受容体のリサイクルはソーティングネキシン 27 に依存しリサイクリングエンドソームを経由している、第 86 回 日本薬理学会年会、2013 年 03 月 21 日～2013 年 03 月 23 日、福岡国際会議場