

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 24 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460397

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ネルの機能における糖鎖修飾の役割

研究課題名(英文) Role of glycosylation on the functions of 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病患者の心臓は、冠状動脈が正常であっても機能低下していることが多い。心筋自体の問題が生じてると考えられ、糖尿病性心筋症と言われている。しかし、そのメカニズムの詳細は分かっていない。

本研究では、糖尿病で増加すると言われているO型糖鎖であるO-GlcNAcによる修飾に注目して、心機能との関連性を調べた。その結果、心機能の維持に関わっているタンパク質がO-GlcNAc修飾されることにより、機能異常を起こし、心機能低下の原因になっていることが分かってきて、糖尿病性心筋症の一つのメカニズムと考えられた。今後は病態をつかむだけでなく、これらの基礎データをもとに心不全治療薬の開発に結び付けていきたい。

研究成果の概要(英文)：The cardiac function in diabetic patients is often reduced, although coronary arteries are intact. Metabolic abnormality of cardiac muscle might be involved in the etiology, and the pathologic condition is named diabetic cardiomyopathy. However, the mechanism was not fully understood. In this study, we focused on O-GlcNAcylation which was augmented in diabetes, and examined how the modification affected the cardiac function. As a result, we found that some proteins related to cardiac function were inactivated by O-GlcNAcylation. The downregulation of cardiac function by O-GlcNAcylation might be one of the cause of diabetic cardiomyopathy. In the future, based on this basic research, I would like to connect it with new drug development.

研究分野：循環薬理学

キーワード：O-GlcNAc修飾 O-GlcNAc転移酵素 大動脈縮窄術 NFAT GSK3 ホスホランパン STIM-1

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、その中でも筋小胞体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、ナトリウムチャンネルやカリウムチャンネルなどのイオンチャンネルが重要な役割を演じていて、それらの異常が心不全や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 (Yokoe et al. *Cancer Res.*, 67:1935-1942, 2007)。また、マクロファージや血管内皮細胞に発現しているスカベンジャーレセプターの SREC1 には 3 本の N 型糖鎖が修飾していることを明らかにし、それぞれがタンパク質のリガンド結合性、細胞膜への局在、安定性という別々の機能に関わっていることを証明した (業績 3 : Sano et. al. *Glycobiology*, 22 (5), 714-724, 2012)。O 型糖鎖 O 結合型 -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ている。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と、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。研究代表者らは研究開始当初、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パンが O-GlcNAc の修飾を受けることを証明し、それがホスホランパン

の PKA によるリン酸化を阻害し心機能に影響を与えていることを証明した (業績 10:Yokoe, S. et al. *Glycobiology*, 10:1217-1226, 2010)。

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、心筋収縮機能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ンネルに対して、N 型糖鎖や O 型糖鎖による修飾がそれらの機能に与える影響を明らかにし、それらの機能を制御する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する。

3. 研究の方法

本研究では、N 型糖鎖と O 型糖鎖 (O-GlcNAc) の修飾の影響を平行して解析し、糖鎖ターゲットタンパク質が見出されたら *in vivo* の機能解析に随時移行していく。

N 型糖鎖による制御の検討

イオンチャンネル、心筋カルシウム制御タンパク質に焦点を絞り、N 型糖鎖修飾の有無、部位を明らかにした後、機能にどのように影響しているかを COS-1 や HEK293 細胞に N 型糖鎖欠損タンパク質を発現させ検討する。機能解析として、心筋収縮能は単離心筋細胞やラット心臓 (*in vivo*) を用いて血行動態パラメーターや細胞内カルシウム動態を調べることであり、またイオンチャンネル機能はパッチクランプ法によって検討する。

O 型糖鎖 (O-GlcNAc) による制御の検討

心筋カルシウム制御タンパク質、イオンチャンネルを中心に、それらの O-GlcNAc 修飾の有無、部位を明らかにし、そのタンパク質が持つ機能に対する影響を調べる。機能解析は上述の N 型糖鎖の機能解析と同様の方法を用いて検討する。

4. 研究成果

まず、心筋小胞体タンパク質の一つであるホスホランパンが O-GlcNAc 修飾され、そのリン酸化が抑制されることを突き止めた。また、筋小胞体のカルシウムセンサーである STIM-1 も O-GlcNAc 修飾されその機能を抑制することを見出し、現在はどのアミノ酸が O-GlcNAc 修飾されるかを検討中であると同時に、STIM-1 ノックアウトマウスを用いた *in vivo* 実験で心不全との関連性を調べていく予定である。O-GlcNAc 転移酵素である OGT の高発現マウス (Ogt-Tg) を用いた *in vivo* 実験も行い、野生型マウスでは大動脈縮窄術 (TAC) 4 週間後に心不全状態になるが、Ogt-Tg ではその心機能低下が野生型より顕著であること (心不全の悪化) を見出した。そのメカニズムとして、OGT の過剰発現により増加した O-GlcNAc 修飾が GSK3 という分子に起こり、そのリン酸化が抑制されることにより活性化することが一因と考えられた。それを検

証するため、GSK3 阻害剤を TAC 前後で投与した。その結果、適度な心肥大が起こり、4 週間後の心機能が改善した(論文準備中)。このことは GSK3 の O-GlcNAc 修飾が NFAT という心肥大を起こす転写因子を活性化し、心筋壁の菲薄化を防ぎ圧負荷による心不全を改善した可能性を示唆していると考えられる。

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)

1. Tonegawa K, Otsuka W, Kumagai S, Matsunami S, Hayamizu N, Tanaka S, Moriwaki K, Obana M, Maeda M, Asahi M, Kiyonari H, Fujio Y, Nakayama H. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2017;312(3):H501-H514 (査読有)
2. Nakagawa, T., Yokoe. S., Asahi, M. Phospholamban degradation is induced by phosphorylation-mediated ubiquitination and inhibited by interaction with cardiac type Sarco(endo)plasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. Biochem Biophys Res Commun. 2016;472(3):523-30. (査読有)
3. Kime C, Sakaki-Yumoto M, Goodrich L, Hayashi Y, Sami S, Derynck R, Asahi M, Panning B, Yamanaka S, Tomoda K. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Nov 1;113(44):12478-12483. (査読有)
4. Nagata H, Ii M, Kohbayashi E, Hoshiga M, Hanafusa T, Asahi M. Cardiac Adipose-Derived Stem Cells Exhibit High Differentiation Potential to Cardiovascular Cells in C57BL/6 Mice. Stem Cells Transl Med. 2016;5(2):141-51. (査読有)
5. Yokoe S, Nakagawa T, Kojima Y, Higuchi K, Asahi M. Indomethacin-induced intestinal epithelial cell damage is mediated by pVHL activation through the degradation of collagen I and HIF-1. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Dec 25;468(4):671-6 (査読有)
6. Harada S, Nakagawa T, Yokoe S, Edogawa S, Takeuchi T, Inoue T, Higuchi K, Asahi M. Autophagy Deficiency Diminishes Indomethacin-Induced Intestinal Epithelial Cell Damage through Activation of the ERK/Nrf2/HO-1 Pathway. J Pharmacol Exp Ther. 2015 Dec;355(3):353-61. (査読有)
7. Kanaya K, Ii M, Okazaki T, Nakamura T, Horii-Komatsu M, Alev C, Akimaru H, Kawamoto A, Akashi H, Tanaka H, Asahi M, Asahara T.

Sonic Hedgehog signaling regulates vascular differentiation and function in human CD34 positive cells: vasculogenic CD34(+) cells with Sonic Hedgehog. Stem Cell Res. 2015 Mar;14(2):165-76. (査読有)

[学会発表](計 8 件)

1. 2017/3/15~17 第 90 回日本薬理学会学術総会 長崎ブリックホール、他 「Culture conditions affect epigenetic features of pluripotent stem cells」 友田紀一郎, 朝日通雄
2. 2017/3/15~17 第 90 回日本薬理学会学術総会 (長崎ブリックホール) 「Phospholamban is degraded via ubiquitin-proteasome pathway by pVHL in failing hearts」横江俊一, 朝日通雄
3. 2017/3/15~17 第 90 回日本薬理学会学術総会 (長崎ブリックホール) 「O-GlcNAcylation of GSK-3 exacerbates pressure overload-induced heart failure in OGT transgenic mice」松野真人, 横江俊一, 伊井正明, 朝日通雄
4. 2016/9/15~16 第 25 回日本形成外科学会基礎学術集会 ナレッジキャピタル コングレ・コンベンションセンター 「W9 ペプチドのヒト脂肪由来幹細胞に対する骨分化促進作用についての検討」大槻祐喜, 岡田 雅, 上田 晃一, 伊井 正明, 朝日通雄
5. 2016/4/1~7 EB San Diego 2016 San Diego Convention Center 「Phospholamban is localized in autophagosome in dilated cardiomyopathy mouse model, TgPLNR9C mice」Shunichi yokoe, David H. MacLennan, Michio Asahi
6. 2015/4/25 第 79 回日本循環器学会学術集会 (大阪国際会議場) Crosstalk between O-GlcNAcylation and Phosphorylation Regulates Autophagy in Diabetes Mellitus and OGT-Tg Mice Exposed to Intermittent Hypoxia 野田拓誠、野村篤生、吉村文、加藤隆児、井尻好雄、山口雄大、泉康雄、葭山実、朝日通雄、林哲也
7. 2015/3/28~4/1 Experimental Biology 2015 (Boston) Lethal Arg9Cys phospholamban mutation increases the mitochondrial fission protein (Drp-1) activity Shunichi Yokoe, Michio Asahi, Elena Zvaritch, Olga Sizova, Allen Teng, Anthony Gramolini, David MacLennan
8. 2014/5/17 第 61 回日本生化学会近畿支部例会(京都産業大学) 「O-Linked N-Acetyl Glucosamine (O-GlcNAc) Regulates Autophagy and Apoptosis in Cardiomyocytes: a Double-Edged Sword in

Intermittent Hypoxia-Induced Cardiac Remodeling」
Nakagawa T, Sasaki M, Watanabe A, Furukawa Y, Nomura A, Uehashi W, Kato R, Ijiri Y, Hayashi T, Asahi M.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/pha/index.htm>

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

(2)研究分担者

中山 博之 (Nakayama Hiroyuki)
大阪大学・薬学研究科・准教授
研究者番号：40581062

(3)連携研究者

東 治人 (Azuma Naoto)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：40231914

(4)研究協力者

伊井 正明 (Ii Masaaki)
中川 孝俊 (Nakagawa Takatoshi)
森脇 一将 (Moriwaki Kazumasa)
藍 智彦 (Ai Tomohiko)