

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月12日現在

機関番号：84409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14481

研究課題名(和文)糖鎖とレドックスの融合による新規病態メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathological mechanisms by integration glycans and redox

研究代表者

谷口 直之(Taniguchi, Naoyuki)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局等・糖鎖オンコロジー部部長

研究者番号：90002188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗酸化酵素SOD3の抗酸化機能がSOD3上の糖鎖構造によって変化することを明らかにした。特に複合型糖鎖を欠損するSOD3は通常のSOD3と異なるがん抑制効果を示すことから、SOD3の糖鎖が、がんの進展に關与する可能性を明らかにした。またマクロファージにおいて、酸化ストレスが糖鎖合成酵素群の発現変化を引き起こし、そのことが異物貪食能を亢進することを明らかにした。これらのことは「糖鎖」と「レドックス」が密接に制御し合う協調システムを明らかにしたものであり、現在、成果を論文としてまとめつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、「糖鎖」と「レドックス」という細胞が持つ一見独立した2つのシステムが密接に制御し合う協調システムを新たに見出し、Glyco-Redox制御異常を背景とする様々な疾患の病因解明と治療法探索に繋がる新しい知見を得ることを目的としていた。本研究で明らかになった、抗酸化酵素SOD3の糖鎖による機能制御、および酸化ストレスによるマクロファージの糖鎖解析と機能解明は、まさに目的としたGlyco-Redoxシステムの一端を明らかにしたものであり、今後、関連疾患の病因解明に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We have revealed that the antioxidative functions of SOD3 were modulated by N-glycans carried on them. SOD3 lacking complex type glycans expressed different anticancer effects compared with SOD3 carrying complex type glycans, which indicated N-glycans on SOD3 were involved in development of cancers. We also revealed that oxidative stress changed the expression levels of multiple glycosyltransferases in macrophage, which enhanced phagocytosis. These results demonstrate the biological linkage between glycans and redox. We are now trying to publish these results.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 糖転移酵素 レドックス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らはこれまで多くの糖鎖生合成酵素(糖転移酵素)の精製・遺伝子クローニングを行ってきた。それらの欠損マウスの解析から、糖鎖の形成不全が癌、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、2型糖尿病などの病態形成に深く関与することを発見し、そのメカニズムとして細胞膜受容体や接着分子など特定の糖タンパク質の機能が糖鎖によって調節されていることを明らかにしてきた。しかしどの糖鎖がどの疾患に関わるのかは分かりつつあるものの、糖鎖が関与する詳細な病態メカニズムは不明な点が多い。それを解明するヒントとして、糖鎖とレドックスというこれまで独立して働くと考えられていた2つのシステムが相互に制御しあう可能性「Glyco-Redox」に思い至った。すなわちレドックスバランスの乱れが細胞表面糖鎖の構造をダイナミックに変動させ、その結果生じる糖鎖機能の変化がさらにレドックスバランスを変動させ、それらが様々な疾患の根底にあると予想した。

## 2. 研究の目的

本研究は、「糖鎖」と「レドックス」という細胞が持つ一見独立した2つのシステムが密接に制御し合う協調的システムを新たに見出し、「Glyco-Redox」制御異常を背景とする多くの疾患の全体像を解明、また治療法探索につながる新しい知見を得ることを目的とした。それにより、単独の糖鎖研究やレドックス研究では解決できなかった病態メカニズムの疑問を説明し、癌・COPD・糖尿病など現代人を脅かす生活習慣病の疾患メカニズムを「Glyco-Redox」という新たな側面から解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗酸化酵素 SOD3 の糖鎖機能の解明

生体内のROS(reactive oxygen species)を除去する主要なSOD(superoxide dismutase)酵素ファミリーの中で、唯一糖鎖修飾を受けて細胞外へ分泌されるSOD3に着目した。SOD3の糖鎖機能はほとんど不明であったため、その糖鎖付加部位に変異を導入した変異体を細胞に発現させて、酵素活性の測定や細胞外への分泌量を解析した。さらに、健常者の血液からSOD3を免疫沈降によって精製し、糖鎖構造をLC-MSによって同定した。その結果、主要な糖鎖エピソードの一つであるシアル酸に着目し、シアル酸が付加されないCHO変異細胞(Lec2細胞)を用いて、その活性、FurinによるC末端の切断、酵素活性への影響などを解析した。

### (2) レドックス応答糖鎖遺伝子 GnT-III の機能解明

レドックスバランスに応答する糖鎖遺伝子を同定する目的で、マクロファージをカドミウムなどの重金属で刺激したところ、Bisecting GlcNAcの合成酵素であるGnT-IIIの発現が選択的に高まることを見出した。その生理的、病的意義の解明のため、GnT-IIIが関わるアルツハイマー病のモデルマウスにおいて、酸化ストレスによってBisecting GlcNAcの発現が制御されているかどうかを検証した。

## 4. 研究成果

### (1) 抗酸化酵素 SOD3 の糖鎖機能の解明

SOD3の1箇所の糖鎖付加部位に変異を導入すると、様々な細胞においてSOD3が分泌されなくなった。一方で、一部分泌された変異SOD3は酵素活性を十分に有していたことから、

SOD3 の N 型糖鎖は細胞外への分泌に必須であることがわかった(Ota et al., FEBS Lett., 2016)。さらに、血中の SOD3 を精製して糖鎖構造を分析したところ、二本鎖でシアル化された糖鎖がメジャーであることがわかった。そこで、シアル化が起きない CHO 細胞の変異株 Lec2 細胞に SOD3 を発現させたところ、細胞外への分泌、Furin による C 末端の切断が低下することがわかった(Ota et al., Glycobiology, 2017)。以上より、抗酸化酵素 SOD3 の糖鎖、特にシアル酸は、SOD3 の C 末端の切断と分泌に不可欠であることが明らかになった。

## (2) レドックス応答糖鎖遺伝子 GnT-III の機能解明

マクロファージを様々な重金属で刺激したところ、調べた数種の N 型糖鎖関連酵素の中で、GnT-III (Mgat3) が特異的に upregulation されることがわかった(Taniguchi et al., Arch. Biochem. Biophys., 2016)。さらに、その発現上昇にはレドックス応答の主要な転写因子である Nrf2 が関わることを示唆された。一方研究代表者らの先行研究で、GnT-III はアルツハイマー病を促進する働きを持つことがわかっていました。また、脳内に蓄積した A $\beta$  は細胞に酸化ストレスを与えることが知られている(Taniguchi et al., Glycoconj. J., 2016)。そこで、アルツハイマー病モデルマウスの脳内を調べたところ、A $\beta$  の蓄積に伴って酸化ストレス産物のレベルが増加しており、それに伴って Bisecting GlcNAc の発現レベルが亢進していた。さらに、A $\beta$  産生酵素である BACE1 の Bisecting GlcNAc 修飾が増加することによって BACE1 はリソソームでの分解を受けにくくなり、結果的に A $\beta$  の産生が増大することがわかった(Kizuka et al., Biochem. J., 2016)。以上より、アルツハイマー病の脳内では、A $\beta$  産生、酸化ストレス、Bisecting GlcNAc 修飾、BACE1 レベルの増大、という悪循環に陥る可能性が示唆された(Kizuka et al., Glycoconj. J., 2018)。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Neural functions of bisecting GlcNAc.

Kizuka Y, Taniguchi N.

Glycoconj J. 査読有 2018 Aug;35(4):345-351. doi: 10.1007/s10719-018-9829-4.

Sialylation of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) enhances furin-mediated cleavage and secretion.

Ota F, Kizuka Y, Nakano M, Yamaguchi Y, Kitazume S, Ookawara T, Taniguchi N.

Glycobiology. 査読有 2017 Dec 1;27(12):1081-1088.

doi: 10.1093/glycob/cwx087.

N-glycans of growth factor receptors: their role in receptor function and disease implications.

Takahashi M, Hasegawa Y, Gao C, Kuroki Y, Taniguchi N.

Clin Sci (Lond). 査読有 2016 Oct 1;130(20):1781-92. doi: 10.1042/CS20160273.

Review.

N-Glycosylation is essential for the secretion of extracellular superoxide dismutase.

Ota F, Kizuka Y, Kitazume S, Adachi T, Taniguchi N.

FEBS Lett. 査読有 2016 Oct;590(19):3357-3367. doi: 10.1002/1873-3468.12378.

Enzymes for N-Glycan Branching and Their Genetic and Nongenetic Regulation in Cancer.

Kizuka Y, Taniguchi N.

Biomolecules. 査読有 2016 Apr 28;6(2). pii: E25. doi: 10.3390/biom6020025.

Disease-associated glycans on cell surface proteins.

Takahashi M, Kizuka Y, Ohtsubo K, Gu J, Taniguchi N.

Mol Aspects Med. 査読有 2016 Oct;51:56-70. doi: 10.1016/j.mam.2016.04.008.

Glyco-redox, a link between oxidative stress and changes of glycans: Lessons from research on glutathione, reactive oxygen and nitrogen species to glycobiology.

Taniguchi N., Kizuka Y, Takamatsu S, Miyoshi E, Gao C, Suzuki K, Kitazume S, Ohtsubo K.

Arch Biochem Biophys. 査読有 2016 Apr 1;595:72-80.

doi: 10.1016/j.abb.2015.11.024

Uncatalyzed Click Reaction between Phenyl Azides and Acrolein: 4-Formyl-1,2,3-Triazolines as “Clicked” Markers for Visualizations of Extracellular Acrolein Released from Oxidatively Stressed Cells.

Pradipta AR., Taichi M., Nakase I., Saigitbatalova E., Kurbangalieva A., Kitazume S., Taniguchi N., Tanaka K. ACS Sensors, 査読有 1, 623-632 (2016)

doi:10.1021/acssensors.6b00122

〔学会発表〕(計 18 件)

[招待講演](#)

【国際学会】

Taniguchi N.: “Branching N-glycans and their roles in disease onset, biomarker discovery and treatment”, 1st Academic Seminar of IPRC & IGRC, Dec., 2018

Taniguchi N., Expression of N-glycan Branching enzymes and their products in Disease implication. (Keynote lecture) 24th International Symposium on Glycoconjugates (Glyco24), Jeju Island, Korea, Aug., 2017

Taniguchi N., Branched N-glycans and their double-edged sword properties in disease (Plenary lecture), 19<sup>th</sup> European Carbohydrate Symposium (EUROCARB), Barcelona, Spain, Jul., 2017

Taniguchi N., Role of Glycans in disease; onset, diagnosis and treatment, (Plenary lecture), 12<sup>th</sup> Jenner Glycobiology and Medicine Symposium,

Dovrobnik, Croatia, May 7, 2017

Taniguchi N., Glyco-redox: new Sake in an old bottle, (Plenary lecture)  
12th International Symposium on the Maillard Reaction, Tokyo (Japan), Sep.,  
2015

#### 【国内学会】

谷口直之「Glycosylation と Redox 制御のクロストーク」第 35 回日本糖質学会  
(高知) 2016 年 9 月

谷口直之「糖鎖、特に分岐型 N - 型糖鎖の生理的病態的役割」第 38 回日本基礎  
老化学会大会 (横浜) 2015 年 6 月

#### 一般口頭発表

#### 【国際学会】

Taniguchi N., “Branching N-glycans and their roles in disease onset, biomarker  
discovery and treatment”, GlycoBioTec2019, Jan., 2019

Taniguchi N., “Branching N-glycans and diseases: approach from biochemistry to  
systems glycobiology”, 2018 Annual Meeting of the Society for Glycobiology,  
Nov., 2018

Taniguchi N., “Glycosyltransferases: Structure and Function I”, The 11th  
International Symposium on Glycosyltransferases (GlycoT 2018), Jun., 2018

Kizuka Y., Peerut Chienwichai, Naoyuki Taniguchi, Glyco-redox, a link of glycobiology  
and redox balance, is implicated in Alzheimer's disease, The 9th International  
Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide,  
The 16th Annual Scientific Meeting of the Nitric Oxide Society of Japan, Sendai,  
Japan, May (2016)

Taniguchi N., N-Acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) Is a Novel Drug Target for  
Alzheimer's Disease, HUP0 2015, Vancouver (Canada), Sep. 2015

#### 【国内学会】

谷口直之「糖鎖と病気の発症、診断、治療」山口大学医学部 講義 2018 年 10 月

谷口直之「Sugar chains (Glycans) and Cancer」  
第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月

谷口直之「糖鎖研究の目指すもの」  
オリエンタル酵母長浜研究所 研究会 2018 年 7 月

谷口直之「糖鎖研究の目指すもの」  
第 65 回日本生化学会近畿支部例会 2018 年 5 月

谷口直之「グルタチオン研究からシステム糖鎖生物学へ Old sake in a new bottle」  
日本 NO 学会日本酸化ストレス学会 2018 年 5 月

〔図書〕(計 3 件)

Taniguchi N., Endo T, Hirabayashi J, Nishihara S, Kadomatsu K, Akiyoshi K,  
Aoki-Kinoshita KF, eds.

Springer Singapore

Glycoscience: Basic Science to Applications - Insights from the Japan  
Consortium for Glycobiology and Glycotechnology -  
2019年 337 ページ

Baynes John W., Dominiczak Marek H, 谷口 直之, 岩井 一宏, 藤井 順逸, 本家 孝  
一 (担当:共著)

(監修・翻訳:谷口 直之, 岩井 一宏, 藤井 順逸, 本家 孝一)

著者・編集: Baynes JW, Dominiczak MH)

エルゼビア・ジャパン, 丸善出版 (発売)

ベインズ・ドミニチャク生化学 (原書 4 版)

2018年 728 ページ

Stanly P, Taniguchi N, Aebi M. (担当:共著, 範囲:N-Glycans)

Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG,  
Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, eds.

Cold Spring Harbor Laboratory Press

Essentials of Glycobiology 3rd Edition

2017年 823 ページ (範囲: N-Glycans)

〔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

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし