

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14655

研究課題名(和文)細胞質における糖鎖分解の造血発生制御における役割の解明

研究課題名(英文)Revealing a role of cytoplasmic de-glycosylation in the erythropoiesis

研究代表者

藤平 陽彦 (Fujihira, Haruhiko)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：50721057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では「Ngly1による糖鎖脱離・分解の造血発生制御における役割の解明」を研究目的とし、様々な解析に取り組んだ。その結果、マウスの発生過程でNgly1欠損は二次造血器官である胎仔肝臓において、転写因子Nrf1の異常なプロセッシングと肝細胞細胞質への蓄積、肝前駆細胞マーカーであるAFPの染色強度増強を引き起こすことがわかった。さらに、赤血球の成熟化にともなう赤芽球の脱核がNgly1-KOで減少することがわかった。つまり、Ngly1は胎仔肝臓の正常な発生に必要でそれにはNrf1が少なくとも部分的に寄与すること、Ngly1欠損により肝臓の発生に異常が生じることで、造血発生に異常を来すことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在まで、造血発生にNgly1による糖鎖脱離・分解が寄与するという報告は世界的にみてもない。本研究では初めて、細胞質での糖鎖脱離・分解に寄与する糖鎖脱離酵素Ngly1が、正常な肝臓および赤血球の発生において重要な役割を果たすことを明らかにした。また、そのメカニズムの一端として転写因子Nrf1が寄与することも明らかにした。造血発生や造血幹細胞については不明な点も残存しているが、本研究でNgly1が関与することが明らかになったので、Ngly1という新しい切り口から残存する不明点の解明に取り組むことで、新たな学術的知見を得られると期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is “Revealing the physiological role of Ngly1 on the murine hematopoiesis”. To this end, I analyzed embryonic liver and blood cells at the several time points of gestation. As a result, I found that the enucleation of erythroblast, which is known to occur along with the maturation of red blood cells, was significantly decreased in Ngly1-KO blood cells. I also found that the development of liver, which is judged by the staining intensity of AFP, was slightly delayed in Ngly1-KO embryos. In addition, an abnormal processing of Nrf1 and partial hepatocyte cytoplasmic accumulation of Nrf1 were observed. These results indicated that Ngly1-deletion causes delayed murine liver development, partially caused by the Nrf1 dysfunction, and as a result, causes defects of murine hematopoiesis such as delayed red blood cell maturation (decreased the number of enucleated erythroblast).

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：Ngly1 Nfe2l1 マウス造血発生 糖鎖脱離酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞質ペプチド:*N*-グリコナーゼ (PNGase, **Ngly1**) は、糖タンパク質から *N* 結合型糖鎖を切り離す反応を担う糖鎖脱離酵素である。Ngly1 は、生物にとって重要なタンパク質の品質管理機構の一つ、小胞体関連分解 (ERAD) にも寄与することが知られている¹。2012 年、ヒトの *NGLY1* 変異が原因で全身に重篤な症状を呈する遺伝子疾患、***NGLY1* 欠損症**、が報告されて以降^{2,4}、Ngly1 の生理機能が多くの注目を集めている。その結果、マウス、ショウジョウバエ、線虫などのモデル動物を用いた研究が盛んに行われ、*Ngly1* 欠損による異常と関連する様々な因子が同定されてきた⁵⁻⁹。特に、プロテアソームサブユニットの発現調節や酸化ストレス応答に関与する転写因子 nuclear factor erythroid-2-like 1 (Nrf1) との関連性について注目が集まっている^{7,8,10}。

申請者は研究開始当初まで、全身性の *Ngly1* 欠損 (*Ngly1*-KO) マウスや組織特異的な *Ngly1*-KO マウスの解析に取り組み、*Ngly1*-KO マウスは胚性致死となり⁶、その発生過程で造血発生異常に起因する表現型を示すこと⁶などを発見した。本研究では、マウスの造血発生において *Ngly1* がどのような役割を果たしているのかに着目し、その解明に取り組んだ。その際、*Ngly1* との機能的関連性が注目されている Nrf1 の寄与に着目し、詳細なメカニズムの解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究は、「*Ngly1* による糖鎖脱離・分解の造血発生制御における役割の解明」を研究目的として研究に取り組んできた。研究開始時点において、*Ngly1*-KO マウスは胚性致死となること、発生過程で造血発生異常に起因する異常 (貧血) を示すことを見出していたため⁶、*Ngly1* 欠損がどのような造血発生異常を引き起こすのか、そのメカニズムはどのようなものか、の解明に取り組んだ。

3. 研究の方法

本研究では、哺乳動物の造血発生制御における *Ngly1* の役割、その分子メカニズム (転写因子 Nrf1 との機能的関連性) を解明するため、下記の 2 項目に取り組んだ。

(1) *Ngly1*-KO 胎仔の肝臓および血球細胞における異常の解析

発生段階のいくつかの時点 (E13.5、E14.5、E15.5、E16.5) における胎仔を回収し、特に肝臓と血液細胞に関して、野生型と *Ngly1*-KO での違いを解析した。

(2) *Ngly1*-KO 胎仔の肝臓における Nrf1 の細胞内局在、糖鎖付加・プロセッシング状態の解析

第一項で回収した胎仔の肝臓の組織溶解液と組織切片を用いて、Nrf1 の局在とプロセッシング状態を調べた。

*本来であれば、*Ngly1*-KO マウス胚性線維芽細胞を用いて Nrf1 の転写活性も解析する予定だったが、実験期間内における研究棟と動物施設の移転、新型コロナウイルス流行による実験の停止があったため、取り組むことができなかった。

4. 研究成果

(1) *Ngly1*-KO マウス胎仔では造血発生において赤血球の成熟化に異常が生じる

研究開始当初の予備的知見に基づいて発生中期 (E13.5) に着目し、胎仔由来の血球細胞の解析を行った。解析の結果、*Ngly1* 欠損によって血球細胞が心臓では減少し、肝臓では増加することの再現が確認された。しかしながら、血球細胞をより詳細に組織学的に調べてみると、E13.5 では野生型と *Ngly1*-KO との間で大きな違いは見られなかった (図 1 上)。そこで、発生後期 (E16.5) における血球細胞を組織学的に調べたところ、*Ngly1*-KO 胎仔由来の血液において、赤血球の成熟化とともに観察される赤芽球の脱核が顕著に減少している、つまり、核を有する赤血球の数が

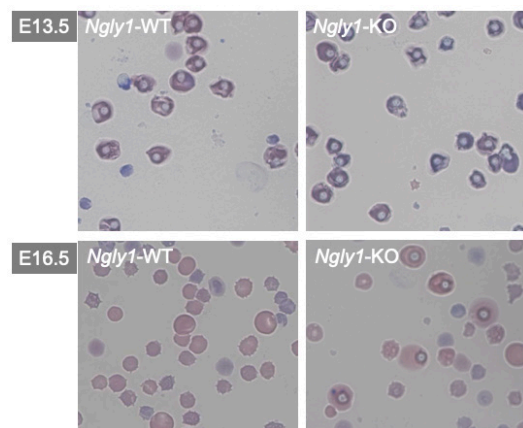


図 1. マウス胎仔血球細胞の組織像
(血液塗布標本のライトギムザ染色)

増加していることが明らかとなった (図 1 下)。以上の結果から、Ngly1 はマウス造血発生の中で特に赤血球の成熟化に寄与していることが明らかとなった。

(2) Ngly1-KO マウス胎仔肝臓では E13.5 に転写因子 Nrf1 のプロセッシング異常と肝細胞の細胞質への蓄積が生じる

第一項で明らかにした赤血球の成熟化異常に、Ngly1 がどのように寄与しているのかを解析した。その際、前述の通り、転写因子 Nrf1 に着目した解析を行った。E13.5 および E16.5 において、造血の場として機能しているのは胎仔肝臓であることから、肝臓における Nrf1 のプロセッシング状態と組織内局在を調べた。まず組織溶解液を用いて、Nrf1 のプロセッシング状態を調べると、E16.5 の肝臓においては野生型と Ngly1-KO との間で違いは見られなかった (図 2)。しかしながら、E13.5 の肝臓においては、Ngly1-KO において、野生型では見られない Nrf1 の異常なプロセッシングバンドが検出された (図 2)。そこで、E13.5 の胎仔肝臓における Nrf1 の局在を調べてみると、肝臓の一部ではあるが、肝細胞の細胞質に Nrf1 が蓄積していることがわかった (図 3)。以上の結果から、Ngly1 欠損は二次造血器官として機能し

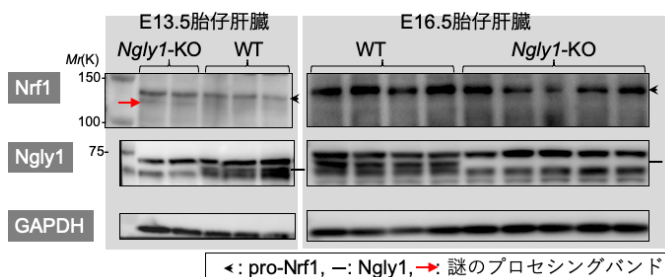


図 2. マウス胎仔肝臓における Nrf1 のプロセッシング状態と Ngly1 の発現

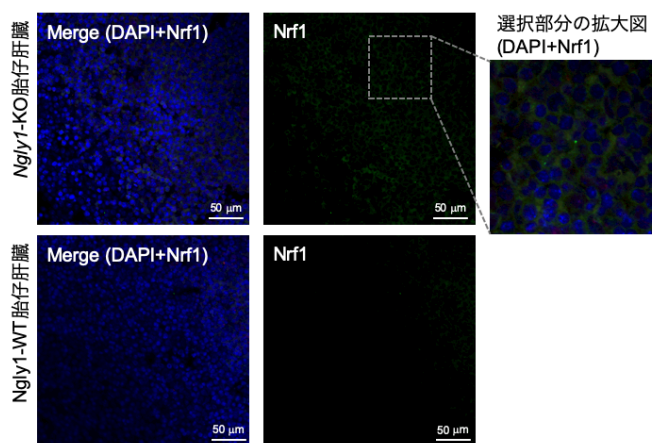


図 3. E13.5 マウス胎仔肝臓における Nrf1 の局在

ている胎仔肝臓において、E13.5 の時点で Nrf1 の異常なプロセッシングと肝細胞の細胞質への蓄積を生じさせていることが明らかとなった。つまり、E13.5 における上記の Nrf1 の異常が胎仔肝臓の発生や機能に異常を来し、赤血球の成熟化などに影響している可能性が示唆された。

(3) Ngly1-KO マウス胎仔肝臓では肝臓の発生が遅延している

Ngly1 欠損が肝臓自体の発生に影響しているのかを解析した。そのために、E13.5 の肝臓の組織切片を用いて、肝前駆細胞のマーカーである α -fetoprotein (AFP) の免疫染色を行なった。その結果、わずかなではあるが Ngly1-KO の肝臓において、AFP の染色の増強が観察された (図 4)。AFP は肝細胞の成熟化にともなって、その発現が低下することが知られていることから、Ngly1 欠損は肝臓自体の発生を遅延させていることが示唆される。

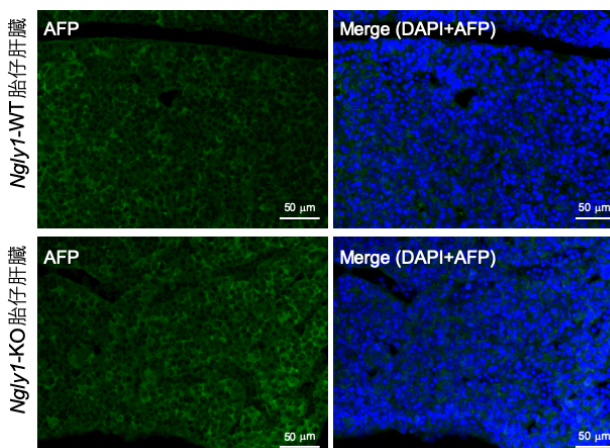


図 4. E13.5 マウス胎仔肝臓における AFP の染色

(4) まとめ

以上の結果から、Ngly1 はマウスの造血発生において、二次造血の場である胎仔肝臓の発生自体に影響を与え、結果として赤血球の成熟化などの異常を生じさせていると考えられる。さらにその過程においては、少なくとも部分的に Nrf1 が寄与していることも示唆された。本研究を通して得られた結果に関しては、他の発生段階における同様の解析、詳細なメカニズムの解明などを今後さらに行なっていく必要があると考えるが、細胞質での糖鎖分解と造血発生の関連性がわかったことは非常に学術的に面白いと考えている。

<参考文献>

¹Suzuki T., *Mol. Aspects Med.*, 51, 2016, ²Need A. C. et al, *J. Med. Genet.*, 49, 2012, ³Enns G. et al, *Genet. Med.*, 16, 2014, ⁴Lam C. et al, *Genet. Med.*, 24, 2017, ⁵Huang C. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 112, 2015, ⁶**Fujihira H.** et al, *PLOS Genet.*, 13, 2017, ⁷Lehrbach N. J. and Ruvkun G., *eLife*, 5, 2016, ⁸Tomlin F. M. et al, *ACS Cent. Sci.*, 3, 2017, ⁹Galeone A., et al, *eLife*, 6, 2017, ¹⁰Lehrbach N. J. et al, *Cell*, 177, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujihira Haruhiko, Masahara-Negishi Yuki, Akimoto Yoshihiro, Hirayama Hiroto, Lee Hyeon.-Cheol, Story A. Benjamin, Mueller F. William, Jakob Petra, Clauder-Munster Sandra, Steinmetz M. Lars, Radhakrishnan K. Senthil, Kawakami Hayato, Kamada Yoshihiro, Miyoshi Eiji, Yokomizo Takehiko, Suzuki Tadashi	4. 巻 1866(3)
2. 論文標題 Liver-specific deletion of Ngly1 causes abnormal nuclear morphology and lipid metabolism under food stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.	6. 最初と最後の頁 165588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2019.165588	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 Haruhiko Fujihira	4. 巻 31
2. 論文標題 Physiological Function fo the Cytosolic Peptide:N-glycanase (Ngly1)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E33-E39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.4052/tigg.1756.1E	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 Kun Yang, Ryan Huang, Haruhiko Fujihira, Tadashi Suzuki, Nan Yan	4. 巻 215(10)
2. 論文標題 N-glycanase NGLY1 regulates mitochondrial homeostasis and inflammation through NRF1.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 2600-2616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20180783.	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 Haruhiko Fujihira, Katsuaki Usami, Keita Matsuno, Hideyuki Takeuchi, Kaori Denda-Nagai, Jun-ichi Furukawa, Yasuro Shinohara, Ayato Takada, Yoshihiro Kawaoka & Tatsuro Irimura	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 A Critical Domain of Ebolavirus Envelope Glycoprotein Determines Glycoform and Infectivity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 5495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-23357-8.	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤平陽彦
2. 発表標題 マウス成体肝臓におけるNgly1の重要性
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 藤平陽彦、根岸-正原由紀、秋元義弘、川上速人、船越陽子、鈴木匡
2. 発表標題 肝臓におけるNgly1の生理機能
3. 学会等名 第91回日本生化学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤平陽彦、根岸-正原由紀、船越陽子、鈴木匡
2. 発表標題 細胞質での糖鎖分解の生物における重要性
3. 学会等名 第5回糖鎖免疫研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruhiko Fujihira
2. 発表標題 The defect caused by abnormal glycan degradation in mammals
3. 学会等名 Jiangnan University Seminar (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haruhiko Fujihira, Yuki Masahara Negishi, Masaru Tamura, Shigeharu Wakana, Daisuke Takakura, Nana Kawasaki, Yoko Funakoshi, Tadashi Suzuki
2. 発表標題 The defects caused by the loss of Ngly1 can be partially rescued by the additional deletion of Engase
3. 学会等名 International Symposium on ER stress, glycosylation, homeostasis and disease
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----