

機関番号：12608

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2008～2010

課題番号：20200016

研究課題名（和文）

人工糖鎖高分子によるビメンチン・デスミンの新機能に基づく生理的役割の解明

研究課題名（英文）

Elucidation of the physiological role of vimentin and desmin by artificial glycopolymers

研究代表者

伊勢 裕彦 (Ise Hirohiko)

東京工業大学・フロンティア研究機構・特任講師

研究者番号：10324253

研究成果の概要（和文）：

当該研究において、我々は細胞骨格分子であるビメンチンやデスミンが、細胞外に出現しN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)に対するレクチン活性を有することをGlcNAc含有糖鎖高分子(PV-GlcNAc)によって見出した。ビメンチン及びデスミンは、細胞膜表面上で4量体を形成し、GlcNAc結合部位であるrodIIドメインを細胞外に露出してPV-GlcNAcと結合していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we found that vimentin and desmin, cytoskeletal proteins, possess N-acetylglucosamine (GlcNAc)-binding lectin-like properties on cell surfaces. It was found that these molecules were localized to cells surface by the tetrameric formation and the rod II domains that are GlcNAc-binding site were exposed to cell surfaces.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2009年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2010年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
年度			
年度			
総計	22,100,000	6,630,000	28,730,000

研究分野：総合領域、生物学

科研費の分科・細目：人間医工学、生物科学・医用生体工学・生体材料学、細胞生物学

キーワード：バイオマテリアル、細胞骨格、レクチン、ビメンチン

1. 研究開始当初の背景

近年、申請者は心筋細胞に発現する新規の糖鎖結合分子（レクチン）について、糖鎖構造を模倣した合成糖鎖高分子（PV-sugar: N-p-vinylbenzyl-D-gluconamide）を用いて探索を行ったところ、細胞骨格分子であるビメンチン・デスミンが細胞表面に発現しN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)に対する結合活性を持つことを見出した。本申請課題では、合成糖鎖高分子を用いることでビメンチン・デスミンの細胞表面発現とGlcNAc結合活

性に関わる生理機能や病態に対する役割の解明とその事実から疾患に対する治療の開発を目的とする。

ビメンチン・デスミンは、中間径フィラメントと呼ばれ細胞骨格の構成成分の一つとして細胞内でその形態維持を行う主要な構造タンパク質として認知されており、生物の発生の初期段階から細胞や組織の分化成熟の段階まで多彩な細胞に発現し、細胞機能に必須なタンパク質として考えられている。しかし、意外なことにこれらの分子の欠損マウ

すは、胎生期に致死的影响を生ずることなく、ほぼ正常な個体として生まれることが判明している。このことから、生体内で最も豊富に存在する細胞内構造タンパク質でありながらこれらの分子の詳細な細胞生理機能や病的過程での役割はいまだ不明である。このような事実の中で、申請者の合成糖鎖高分子による解析によって初めて明らかになったこれらの分子の細胞表面発現とGlcNAc結合活性は、今まで知られていない新たな生理的役割を解明する知見としてたいへん興味深い。近年では、ビメンチン・デスミンは、器官生成や繊維化、発ガン等の上皮-間葉転換において、その発現がダイナミックに変化することが報告されている。このような現象に対するビメンチン・デスミンのGlcNAc結合活性の役割が明らかにできれば、細胞の形態維持という役割とは別の全く新しい概念による器官形成のメカニズムや病態の解明、そして合成糖鎖高分子を利用した病態に対する新たな治療戦略の開発が期待できる。本申請課題の革新的・独創的な点は、分子生物学的な手法と生体の複雑な機能分子を模倣した合成糖鎖高分子すなわちバイオマテリアル的な要素を用いる学際的な手法によって、今まで見過ごされてきたような分子から全く新しい事実を見出すことにより、生命のブラックボックスを解明していく研究手法である。

2. 研究の目的

細胞骨格であるビメンチン・デスミンは、発生の初期から分化成熟において様々な細胞に発現し、細胞形態を維持する分子として報告されている。近年では、細胞増殖や移動、接着において様々なリン酸化酵素によってリン酸化されダイナミックに変化することも報告されており、その発現は発ガンや上皮-間葉転換などの病態においても大きく変化することが報告されている。申請者は、糖鎖構造を人工的に模倣した糖鎖高分子を用いてビメンチン・デスミンが細胞表面に発現しGlcNAcに対するレクチン活性を持つことを明らかにした。このような報告は今までになく、病的過程や細胞機能において新たな生理機能の発見が期待できる。本研究では、ビメンチン・デスミンの細胞表面発現とGlcNAc結合活性が関わる新たな生理的役割を明らかにし、この性質を利用した病態に対する治療戦略（糖鎖を利用した薬物輸送システム等）の開発を目指す。

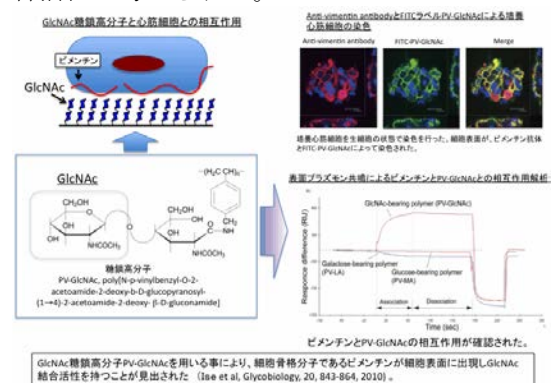
3. 研究の方法

研究目的を達成するための具体的な研究計画・方法として、計画の前半は、ビメンチン

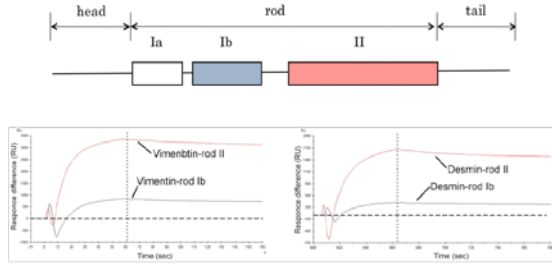
及びデスミンのGlcNAc認識部位の同定を行い、その部分を認識する抗体を作製することでその認識機構を明らかにする。この抗体と糖鎖高分子をもちいてガンの浸潤や上皮-間葉転換のin vitroのモデル系でビメンチンの細胞外出現やGlcNAc認識を解析していく。さらに生体内におけるこれらの現象についても病態などを通じて検討していく。次に0-GlcNAc化タンパク質を一つの指標として、ビメンチン・デスミンが認識する生体内に存在するGlcNAc糖鎖分子を同定する。そして、計画の後半では、ビメンチン・デスミンの糖鎖認識部位に変異をいれた分子を発現するミュータントマウスを作製し、発生から分化成熟にかけてGlcNAc認識能を失うことによる機能不全を検討する。さらに発ガンや炎症時の線維化といった病態に対して合成糖鎖高分子を用いた治療戦略が有効か検討していく。

4. 研究成果

平成20年度においては、ビメンチン・デスミンのN-アセチルグルコサミン結合活性の詳細な検討を行った。ビメンチン・デスミンにおけるGlcNAc結合部位の同定を試みた。ビメンチン・デスミンは、中間径フィラメントと呼ばれるファミリーに属し、それぞれ相同性が高い。これらの中間径フィラメントのRod IbドメインとRod IIドメインの組み替えタンパク質を作成し、人工糖鎖高分子であるPV-GlcNAcへの結合活性を表面プラズモン共鳴解析や共焦点レーザー顕微鏡による解析によって検討した。その結果、Rod IIドメインがPV-GlcNAcに対して非常に高い相互作用を示すことが明らかになった。さらにRod IIドメインの組み替えタンパク質を利用してこのRod IIドメインを特異的に認識する抗血清を作製し、細胞表面におけるビメンチン・デスミンの局在を免疫染色によって調べたところ、Rod IIドメインが細胞表面に局在していることが明らかになった。このRod IIドメインは、他の中間径フィラメント(GFAPやperipherin)においても高い相同性を持っており、他の分子の細胞外出現とGlcNAc結合活性が考えられた。

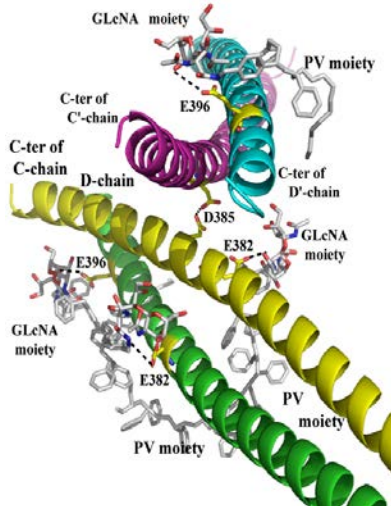


Determination of GlcNAc-recognizing site in vimentin and desmin

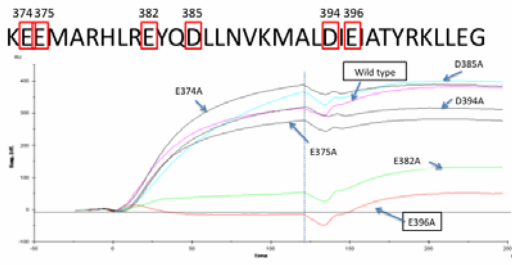


The GlcNAc-recognizing site was determined to be the rod II domain.

平成 21 年度では、ビメンチンと N-アセチルグルコサミン糖鎖高分子との相互作用について、Docking simulation を行い、詳細な結合様式を検討した。その結果、ビメンチンは GlcNAc 糖鎖高分子と相互作用するときに 4 量体を形成することがあきらかになった。そして、GlcNAc 糖鎖高分子のビメンチンに対する結合価を調べたところ、GlcNAc が 4 価以上必要であることが明らかになった。また、ビメンチンの GlcNAc 結合に関するアミノ酸を検討したところ、396 番目と 382 番目のグルタミン酸が重要であることがわかった。そこで、これらのアミノ酸をアラニンに換えた点変異型のビメンチンを作製したところ、GlcNAc 結合活性を喪失した。さらに GlcNAc 結合ドメインである rod II ドメインと非常に相同性の高い GFAP (グリア繊維酸性タンパク質) やペリフェリンとの GlcNAc 糖鎖高分子との相互作用を検討したところ、高い相互作用が観察された。これらのことから、GlcNAc 結合活性が Type III 型中間径フィラメントにおける共通の性質として考えられた。



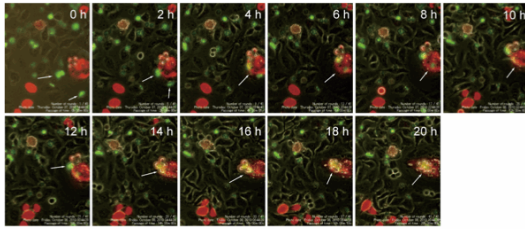
ビメンチンrod IIの後半34アミノ酸について、PV-GlcNAcとのドッキングシミュレーション計算から、結合に関わるアミノ酸の候補絞り込んだ。



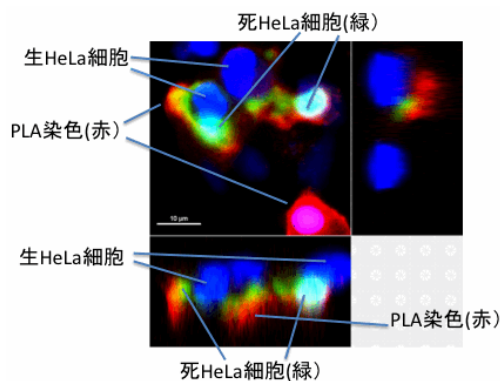
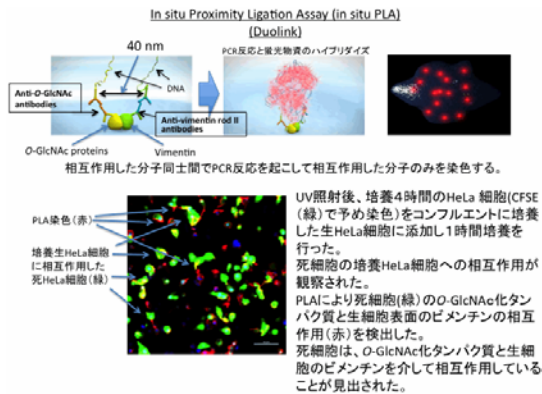
Vimentin-rod II のE382A及びE396Aの変異体において、GlcNAc結合活性が消失した。

平成22年度では、細胞骨格分子であるビメンチンの細胞外出現とN-アセチルグルコサミン結合活性という機能の生体内での生理的な役割の解明を行った。昨年度までは、ビメンチンはGlcNAc含有糖鎖高分子と高い相互作用を持つことを見出している。そこで、ビメンチンと結合する生体内のGlcNAcを持つ分子の探索を行った。その結果、ビメンチンは O-GlcNAc化タンパク質と高い相互作用を持つことを見出された。O-GlcNAc化は、核や核膜、細胞質のタンパク質において行われる糖鎖修飾として知られており、主に細胞内に存在することが報告されている。そこで、細胞表面のビメンチンとこのO-GlcNAc化タンパク質が相互作用する可能性について検討を行った。その結果、アポトーシスやネクローシスによって細胞死が引き起こされたときに、これらのO-GlcNAc化タンパク質が核に集積して細胞外に露出することが見出された。そこで、生細胞の細胞表面のビメンチンが、O-GlcNAc化タンパク質と相互作用するかどうかをin situ proximity ligation assay (PLA)を用いて検討した。この手法は、相互作用する二分子間を特異的に検出する方法で、相互作用している分子のみを染色することができる。そこで、死細胞を生細胞に添加したときに細胞表面上で死細胞のO-GlcNAc化タンパク質とビメンチンの相互作用をこのPLAで検出した。その結果、これらのO-GlcNAc化タンパク質は、細胞表面のビメンチンと相互作用していることが観察された。さらにこれらの死細胞のO-GlcNAc化タンパク質を貪食細胞のビメンチンが認識して細胞内に取り込んでいることが観察された。また、発生時のマウス四肢の水かき部分の退縮部分においても、このビメンチンのO-GlcNAc化タンパク質の相互作用がPLAによっても観察された。このことからビメンチンのGlcNAc結合に基づく機能の生理的役割として、貪食細胞の死細胞のクリアランス

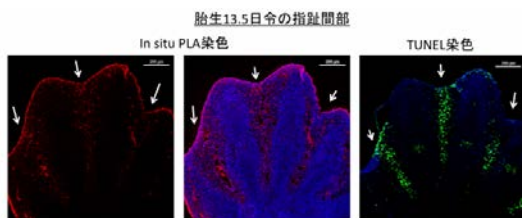
機構の一助を担っていることが示唆された。



緑色蛍光染色した死HeLa細胞をDsRed融合ビメンチンを発現するHeLa細胞に添加した。添加した死HeLa細胞を生HeLa細胞がビメンチンを介して取り込んでいることが観察された。



添加した死HeLa細胞の周辺においてPLA染色が観察された。死細胞のO-GlcNAc化タンパク質と生HeLa細胞のビメンチンの相互作用が観察された。



胎生13.5日令の指趾間部(矢印)のTUNEL染色によるアポトーシス(緑)とIn situ PLAによるO-GlcNAc化タンパク質とビメンチンの相互作用(赤)を検討した。指趾間部のアポトーシスが観察された部分において、ビメンチンとO-GlcNAc化タンパク質との相互作用が確認された。(DAPI染色:青)

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11件)

1. Kim SJ, Ise H (Corresponding author), Goto M, Komura K, Cho CS, Akaike T. Gene delivery system based on highly specific recognition of surface-vimentin with N-acetylglucosamine immobilized polyethylenimine. *Biomaterials* 32, 3471-3480 (2011)
2. Ise H (Corresponding author), Kobayashi S, Goto M, Sato T, Kawakubo M, Takahashi M, Ikeda U, Akaike T. Vimentin and desmin possess GlcNAc-binding lectin-like properties on cell surfaces. *Glycobiology*. 20, 843-864 (2010)
3. Kobayashi S, Ise H (Corresponding author), Takahashi M, Goto M, Akaike T, Ikeda U. Surface coating of bone marrow cells with N-acetylglucosamine for bone marrow implantation therapy. *Biomaterials*. 30, 574-582 (2009)
4. Misawa R, Soeda J, Ise H, Takahashi M, Kubota K, Mita A, Nakata T, Miyagawa S. Potential feasibility of early bone marrow cell injection into the spleen for creating functional hepatocytes. *Transplantation*. 87, 1147-1154 (2009)
5. Shiba Y, Takahashi M, Hata T, Murayama H, Morimoto H, Ise H, Nagasawa T, Ikeda U. Bone marrow CXCR4 induction by cultivation enhances therapeutic angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 81, 169-177 (2009)
6. Murayama H, Takahashi M, Takamoto M, Shiba Y, Ise H, Koyama J, Tagawa Y, Iwakura Y, Ikeda U. Deficiency of tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma in bone marrow cells synergistically inhibits neointimal formation following vascular injury. *Cardiovasc Res*. 80, 175-180 (2008)
7. Yajima N, Takahashi M, Morimoto H, Shiba Y, Takahashi Y, Masumoto J, Ise H, J Sagara, Nakayama J, Taniguchi S, Ikeda U. Critical role of bone marrow-derived ASC, an inflammasome adaptor molecule, in neointimal formation after vascular injury in mice. *Circulation*. 117, 3079-3087 (2008)
8. Morimoto H, Hirose M, Takahashi M, Kawaguchi M, Ise H, Kolattukudy PE, Yamada M, Ikeda U. MCP-1 induces cardioprotection against ischemia/reperfusion injury: Role of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res*. 78, 554-562 (2008)
9. Nagaoka M, Ise H, Harada I, Koshimizu U, Maruyama A, Akaike T. Embryonic undifferentiated cells show scattering activity on a surface coated with

immobilized E-cadherin. J Cell Biochem. 103, 296-310 (2008)

10. Kubota K, Soeda J, Misawa R, Mihara M, Miwa S, Ise H, Takahashi M, Miyagawa S. Bone Marrow-derived Cells Fuse with Hepatic Oval Cells but are not involved in Hepatic Tumorigenesis in the Choline-deficient Ethionine-supplemented Diet Rat Model. Carcinogenesis. 29, 448-454 (2008)

11. Tanabe T, Fujimoto K, Yasuo M, Tsushima K, Yoshida K, Ise H, Yamaya M. Modulation of mucus production by interleukin-13 receptor alpha in the human airway epithelium. Clin Exp Allergy. 38, 122-134 (2008)

〔学会発表〕 (計 28 件)

1. Ise H et al, N-acetylglucosamine-binding activity of vimentin found by artificial biomimicking Glycopolymers, ICBS2011, 2011年3月17日, Tsukuba

2. 伊勢裕彦他、N-アセチルグルコサミン結合活性に基づくビメンチンの役割の解明、BMB2010、2010年12月10日、神戸

3. 伊勢裕彦他、N-アセチルグルコサミン結合活性含有糖鎖高分子 PV-GlcNAc に見出された細胞骨格分子 Vimentin のレクチン活性の解明、第 32 回日本バイオマテリアル学会、2010年11月29日、広島

4. Ise H et al, Vimentin and desmin possess GlcNAc-binding lectin-like properties on cell surfaces, 25th International Carbohydrate Symposium, 3 August 2010, Tokyo

5. 伊勢裕彦他、ビメンチンの細胞外出現と N-アセチルグルコサミン結合活性の役割、第 62 回細胞生物学会大会、2010年5月19日、大阪

6. Ise H, Goto M, and Akaike T, Development of a drug delivery system using N-acetylglucosamine-conjugated liposomes, The 7th Asia 3 (China-Japan-Korea) Foresight Symposium on Gene Therapy and Biomaterials, Seoul, Korea, 25 May, 2009.

7. Ise H and Akaike T, Development of liver regenerative therapy using glycoside-modified bone marrow cells, The Okayama 2009 Joint Conference of the 10th biannual Cell Transplant Society Congress, Okayama, 20 April 2009.

8. Ise H, Kobayashi S, Goto M, and Akaike T, Novel cell delivery system of bone marrow cells for treatment of myocardial infarction by coating with N-acetylglucosamine on the cell surface, The Okayama 2009 Joint Conference of the 10th biannual Cell Transplant Society

Congress, Okayama, 20 April 2009.

〔図書〕 (計 1 件)

1. 伊勢裕彦、赤池敏宏、11 医療に向けた細胞認識機能性バイオマテリアル、バイオ研究のフロンティア 3 医療・診断をめざす先端バイオテクノロジー 関根光雄/編、工学図書株式会社、p98-p109.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊勢 裕彦 (ISE HIROHIKO)

東京工業大学・フロンティア研究機構

・ 特任講師

研究者番号 : 1 0 3 2 4 2 5 3