

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03207

研究課題名(和文)糖鎖の分岐形成によるがん・アルツハイマー病の悪性化メカニズム

研究課題名(英文)Mechanisms of cancer and Alzheimer's disease involving glycan branching

研究代表者

木塚 康彦(Kizuka, Yasuhiko)

岐阜大学・糖鎖生命コア研究所・教授

研究者番号：20564743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、疾患に関わる糖鎖に着目し、疾患時に起きる糖鎖の発現変化メカニズムを明らかにすることを目的として、これらの糖鎖を合成する糖転移酵素の活性制御や基質選択性に着目した研究を行った。その成果として、がんに関わる酵素GnT-Vの新たな分泌制御メカニズムや、本酵素が細胞外小胞(sEV)に存在して受け手細胞へ伝達されること、また糖タンパク質への作用に非触媒ドメインが必要なことなどを明らかにした。さらに、糖尿病に関わる酵素GnT-IVについて、C末端にレクチンドメインが存在し、それが酵素活性に必須であること、また2つのアイソザイムaとbの間で標的タンパク質選択性が異なることなどを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、疾患に関わるN型糖鎖合成酵素について、これまで不明であった基質タンパク質選択性や細胞内活性の新たな制御メカニズムを複数明らかにした。糖鎖は様々な疾患に深く関与しているが、その発現メカニズムの複雑さから、糖鎖を標的とした創薬はまだ十分に行われていない。本研究は、これまで不可能であったタンパク質特異的な糖鎖修飾や、そのための新たな化合物開発へ有用な知見を与えるものであり、将来的な糖鎖標的創薬に大きく貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, to understand the mechanisms by which glycan structures are changed upon disease development, we focus on glycosyltransferases in terms of their activity regulation and substrate specificity. As a result, regarding a cancer-related enzyme GnT-V, we found that its secretion is regulated, that it is loaded into small extracellular vesicles (sEVs) and transferred to recipient cells more glycan remodeling and that its non-catalytic domain is essential for activity toward glycoproteins. Moreover, regarding a diabetes-related enzyme GnT-IV, we found that it has a novel C-terminal lectin domain and that two GnT-IV isozymes a and b show different protein selectivity.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 糖転移酵素 bisecting GlcNAc がん アルツハイマー病 GnT-III (MGAT3) GnT-V (MGAT5) GnT-IVa (MGAT4A)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の50%以上は糖鎖を持っている。その豊富な含量と多様な構造バリエーションは、糖鎖が様々な生物現象と疾患に関わることを意味している。しかし、2003年のゲノム解読から16年が経過した現在でも、糖鎖の理解は十分には進んでいない。理解の不足はすなわち、糖鎖の機能制御や糖鎖異常に起因する疾患の治療がまだ困難であることを意味する。一方、臨床で実際に使われているがんマーカーの多くが(CA19-9, AFP-L3, STN など)糖鎖の変化を捉えたものであり、またタミフルに代表される糖鎖標的薬がウイルス感染に奏効することや、IgGの糖鎖改変で抗体医薬の効果が100倍高まるなど(ポテリジェント技術)、理解が進みつつある一部の糖鎖については臨床応用されている。すなわち、残された大多数の糖鎖についての理解と制御が進めば、今後の医療に飛躍的な進展がもたらされる可能性が極めて高い。

申請者はこれまで一貫して、タンパク質の糖鎖修飾を担う糖転移酵素に着目し、糖鎖の生合成メカニズムと糖鎖の機能・疾患との関わりについての研究を行ってきた。特に最近では、bisecting GlcNAc、 β 1,6分岐と呼ばれる糖鎖の分岐構造についての研究を行っている。そして糖鎖欠損マウスの解析などから、これらの糖鎖が特定の糖タンパク質の上に発現し、それらのタンパク質の局在や半減期を制御することでがん・アルツハイマー病(AD, Alzheimer's Disease)と深く関わることを明らかにしてきた(Kizuka et al., *EMBO Mol. Med.*, 2015; *Nat. Commun.*, 2018)。しかし、これらの糖鎖の分岐構造が特定のタンパク質にのみ発現するメカニズムや、これらのタンパク質の局在や安定性が糖鎖によりどのように制御されるのかについては全く不明である。さらに、ADやがんの治療薬候補と考えられる、これらの糖鎖合成の阻害剤もいまだ開発されていない。そこで本研究ではこれらの課題に取り組み、がん・ADの発症、悪性化の過程で起こる糖鎖変化の詳細なメカニズムの解明とその化学的制御に取り組む。

2. 研究の目的

本研究では、がん・アルツハイマー病(AD)に関わる糖鎖修飾に着目し、疾患時に起きる糖鎖の発現変化がどのようにこれらの疾患を悪性化していくのか、そのメカニズムを明らかにする。特に、ADを悪性化させる bisecting GlcNAc 分岐、がんを悪性化させる β 1,6分岐、糖尿病に関わる β 1,4分岐の3つの糖鎖分岐構造、に着目する。申請者や他の研究グループは、糖鎖欠損マウスや合成酵素の解析を通じて、これらの糖鎖が疾患悪性化の鍵となる特定の糖タンパク質上に発現してその機能を変化させることを明らかにした(Kizuka et al., *EMBO Mol. Med.*, 2015; *Nat. Commun.*, 2018)。一方、これらの糖鎖が特定の標的タンパク質に発現するメカニズムや、タンパク質の機能変化の詳細についてはまだ不明である。本研究ではそれらを明らかにし、がん・ADにおける糖鎖の分岐形成メカニズムとその意義を解明する。さらにこれらの糖鎖の合成阻害剤を開発し、がん・ADに対する治療薬候補としての可能性を検証する。

3. 研究の方法

本研究では、bisecting GlcNAc、 β 1,6分岐、 β 1,4分岐の3つの糖鎖が標的タンパク質選択的に発現する機構、bisecting GlcNAcがタンパク質のリソソーム移行を抑制する機構を解明し、これらの糖鎖を合成する GnT-III, GnT-V, GnT-IV の阻害剤をデザインする。具体的には、1) 特異的レクチンを用いた標的糖タンパク質の網羅的同定、2) bisecting GlcNAc のリソソーム移行を制御する分子の同定、3) 構造をもとにした GnT-V および GnT-IV のタンパク質選抜機構の解明、4) GnT-III, GnT-V, GnT-IV の阻害剤の開発、の4つの項目で研究を推進する。

4. 研究成果

(1) 特異的レクチンを用いた標的糖タンパク質の網羅的同定

Bisecting GlcNAcと選択的に結合するE4-PHAレクチンビーズを用いて脳より複数の標的糖タンパク質(シナプス関連タンパク質など)の同定に成功し、成果を学術論文として発表した(Ohkawa et al., *Int. J. Mol. Med.*, 2021)。本成果は、bisecting GlcNAcの神経細胞における生理機能を知る上でも重要な知見である。

さらに、腎臓においても、同様のレクチンビーズを用いた方法でGnT-IIIの基質タンパク質の同定に成功した。またGnT-III KOマウスにおけるレニン-アンジオテンシン系の異常を確認しており、GnT-IIIが標的タンパク質の糖鎖修飾を通じて腎機能にも重要であることを示唆している。

また、GnT-Vについては、L4-PHAレクチンビーズを用いて腎臓より2つの主要な標的糖タンパク質の同定に成功した。こちらも、GnT-V KOマウスを用いて修飾の特異性などを確認している。現在、これらの成果をまとめた論文を準備している。

(2) 構造をもとにしたGnT-V, GnT-IVのタンパク質選抜機構の解明

立体構造解析において、GnT-Vの中で機能未知のドメインを見出し、そのドメインが標的タンパク質の選択性に重要であることを明らかにした。このドメイン(Nドメイン)を欠損する変異体では、糖鎖に対する酵素活性は保持していたが、糖タンパク質に対する活性が激減していたこと

から、GnT-Vはこの非触媒ドメインを用いて基質タンパク質を選抜している可能性が見出された。これらの成果を学術論文として発表した(Ohsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 2022)。

さらに、類縁酵素であるGnT-IVについて、動物のN型糖鎖分岐酵素では初めて、C末端にレクチンドメインを持つことを見出し、本ドメインの糖鎖結合性や触媒活性への関与を明らかにした(Nagae et al., *Commun. Biol.*, 2022)。また、GnT-IVaおよびGnT-IVbの2つのアイソザイムについて、糖タンパク質選択性が異なっており、異なる機能を持つ可能性があることを発見し、論文発表した(Osada et al., *J. Biol. Chem.*, 2022)。

さらに、GnT-Vの細胞内活性が分泌により制御されていることを新たに発見した(Hirata et al., *Commun. Biol.*, 2022)。本酵素のSPPL3プロテアーゼによる切断分泌は、細胞が持つN型糖鎖の成熟度に依存しており、細胞糖鎖が未成熟化すると、分泌が抑制され、細胞内のGnT-Vの活性やその産物糖鎖が増加することを明らかにした。また、GnT-Vが、がん細胞が分泌する細胞外小胞(sEV)中に濃縮されていること、sEV中のGnT-Vが活性を保持した状態で受け手細胞に伝達され、遺伝子発現を介さずに糖鎖を改変することを世界で初めて見出した(Hirata et al., *iScience*, 2022)。

(3) GnT-III, GnT-V, GnT-IVの阻害剤の開発

有機化学的アプローチにより、GnT-Vの活性阻害剤の候補と考えられるUDP-GlcNAcのアナログ10種を合成した。それらの活性阻害剤候補物質10種類の解析結果について、学術論文に発表した(Vibhute et al., *BBA Gen. Subj.*, 2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 7件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Hirata Tetsuya, Harada Yoichiro, Hirotsawa Koichiro M., Tokoro Yuko, Suzuki Kenichi G.N., Kizuka Yasuhiko	4. 巻 26
2. 論文標題 N-acetylglucosaminyltransferase-V (GnT-V)-enriched small extracellular vesicles mediate N-glycan remodeling in recipient cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105747 ~ 105747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105747	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tomida Seita, Nagae Masamichi, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 298
2. 論文標題 The stem region of 1,6-fucosyltransferase FUT8 is required for multimer formation but not catalytic activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102676 ~ 102676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102676	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hirata Tetsuya, Yang Jing, Tomida Seita, Tokoro Yuko, Kinoshita Taroh, Fujita Morihisa, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 298
2. 論文標題 ER entry pathway and glycosylation of GPI-anchored proteins are determined by N-terminal signal sequence and C-terminal GPI-attachment sequence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102444 ~ 102444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102444	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Osada Naoko, Nagae Masamichi, Nakano Miyako, Hirata Tetsuya, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 298
2. 論文標題 Examination of differential glycoprotein preferences of N-acetylglucosaminyltransferase-IV isozymes a and b	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102400 ~ 102400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirata Tetsuya, Takata Misaki, Tokoro Yuko, Nakano Miyako, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 5
2. 論文標題 Shedding of N-acetylglucosaminyltransferase-V is regulated by maturity of cellular N-glycan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 743 ~ 743
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03697-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagae Masamichi, Hirata Tetsuya, Tateno Hiroaki, Mishra Sushil K., Manabe Noriyoshi, Osada Naoko, Tokoro Yuko, Yamaguchi Yoshiki, Doerksen Robert J., Shimizu Toshiyuki, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 5
2. 論文標題 Discovery of a lectin domain that regulates enzyme activity in mouse N-acetylglucosaminyltransferase-IVa (MGAT4A)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 695 ~ 695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03661-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kizuka Yasuhiko	4. 巻 1866
2. 論文標題 Metabolic utilization and remodeling of glycan biosynthesis using fucose analogs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 130243 ~ 130243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2022.130243	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 Vibhute Amol M., Tanaka Hide-nori, Mishra Sushil K., Osuka Reina F., Nagae Masamichi, Yonekawa Chizuko, Korekane Hiroaki, Doerksen Robert J., Ando Hiromune, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 1866
2. 論文標題 Structure-based design of UDP-GlcNAc analogs as candidate GnT-V inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 130118 ~ 130118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2022.130118	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 該当する

1. 著者名 Osuka Reina F., Hirata Tetsuya, Nagae Masamichi, Nakano Miyako, Shibata Hiroyuki, Okamoto Ryo, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 298
2. 論文標題 N-acetylglucosaminyltransferase-V requires a specific noncatalytic luminal domain for its activity toward glycoprotein substrates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101666 ~ 101666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101666	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawade Haruka, Morise Jyoji, Mishra Sushil K., Tsujioka Shuta, Oka Shogo, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 26
2. 論文標題 Tissue-Specific Regulation of HNK-1 Biosynthesis by Bisecting GlcNAc	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 5176 ~ 5176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26175176	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ohkawa Yuki, Kizuka Yasuhiko, Takata Misaki, Nakano Miyako, Ito Emi, Mishra Sushil, Akatsuka Haruna, Harada Yoichiro, Taniguchi Naoyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Peptide Sequence Mapping around Bisecting GlcNAc-Bearing N-Glycans in Mouse Brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8579 ~ 8579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22168579	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirata Tetsuya, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 1325
2. 論文標題 N-Glycosylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Adv. Exp. Med. Biol.	6. 最初と最後の頁 3 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-70115-4_1	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 Hirata Tetsuya, Nagae Masamichi, Osuka Reina F., Mishra Sushil K., Yamada Mayumi, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 1864
2. 論文標題 Recognition of glycan and protein substrates by N-acetylglucosaminyltransferase-V	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129726 ~ 129726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2020.129726	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 該当する

1. 著者名 Ma Chenyu, Takeuchi Hideyuki, Hao Huilin, Yonekawa Chizuko, Nakajima Kazuki, Nagae Masamichi, Okajima Tetsuya, Haltiwanger Robert S., Kizuka Yasuhiko	4. 巻 21
2. 論文標題 Differential Labeling of Glycoproteins with Alkynyl Fucose Analogs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6007 ~ 6007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21176007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tomida Seita, Takata Misaki, Hirata Tetsuya, Nagae Masamichi, Nakano Miyako, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 295
2. 論文標題 The SH3 domain in the fucosyltransferase FUT8 controls FUT8 activity and localization and is essential for core fucosylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 7992 ~ 8004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Misuzu, Fukamizu Akiyoshi, Nakagawa Tsutomu, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 1865
2. 論文標題 Roles of protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) in brain development and disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129776 ~ 129776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2020.129776	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7件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 木塚康彦
2. 発表標題 ゴルジ体におけるN型糖鎖の成熟過程を制御する小胞体
3. 学会等名 第45回日本分子学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木塚康彦
2. 発表標題 糖転移酵素のタンパク質選択性を標的としたGlycoscience
3. 学会等名 第41回日本糖質学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kizuka Y.
2. 発表標題 Protein selective actions of N-glycan branching enzymes
3. 学会等名 UGLIP Seminar（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木塚康彦
2. 発表標題 N型糖鎖の枝分かれの生化学
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木塚康彦
2. 発表標題 がん関連糖転移酵素GnT-Vの発現制御と標的選択のメカニズム
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 4. Kizuka Y.
2. 発表標題 Insights into protein-selective action of GnT-V
3. 学会等名 The 3rd Australasian Glycoscience Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kizuka Y.
2. 発表標題 SH3 domain of FUT8 is required for its enzymatic activity, cell surface localization and association with ribophorin I
3. 学会等名 Annual Meeting of the Society for Glycobiology（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>酵素受け渡しによるがん関連糖鎖の新たな改変機構を解明 https://igcore.thers.ac.jp/wp_control/wp-content/uploads/d0e3b5afcaa2b7bc7f1c32fc567327e0.pdf 似て非なる酵素が糖鎖を作り分ける仕組みを解明 https://igcore.thers.ac.jp/wp_control/wp-content/uploads/9d99217b0a7305a88269c801ee6ef8a9.pdf がん関連糖鎖の生産を細胞内で制御する仕組みを解明 https://igcore.thers.ac.jp/wp_control/wp-content/uploads/3d811bd17be696246bda9b7ed4496859.pdf 糖尿病に関連する糖鎖合成酵素 GnT-IVa の新たな仕組みを発見 https://igcore.thers.ac.jp/wp_control/wp-content/uploads/79e08b70c6b99f0115ad4429a1b80905-2.pdf がんの悪性化に関わる糖鎖合成酵素GnT-V は糖鎖をつけるタンパク質を選ぶ https://www.gifu-u.ac.jp/about/publication/press/20220131.pdf 糖鎖合成酵素FUT8が働く新しい仕組みを発見 https://www.gifu-u.ac.jp/news/research/2020/05/entry07-7950.html</p>

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
研究 分 担 者	中嶋 和紀 (Nakamima Kazuki) (10442998)	岐阜大学・糖鎖生命コア研究所・准教授 (13701)	
研究 分 担 者	中の 三弥子 (Nakano Miyako) (40397724)	広島大学・統合生命科学研究科(先)・准教授 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of Mississippi			
中国	Jiangnan University			
米国	University of Georgia			
アイルランド	National University of Ireland			