

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05984

研究課題名（和文）ムチン型糖鎖によるタンパク質機能制御の統合的理解

研究課題名（英文）Integrated understanding of protein function regulated by mucin-type O-glycans

研究代表者

工藤 崇 (Kudo, Takashi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：20288062

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）：ムチン型糖鎖コア1構造を合成するC1galt1の正常なフォールディングのためにC1galt1特異的分子シャペロンであるCosmcコンディショナルノックアウト(cKO)マウスを作製し、コア1由来糖鎖の生理的機能を検討した。ユビキタスかつ誘導性のcKOマウスでは、胸腺、脂肪組織、膵臓の重量の急激な減少、白色・褐色脂肪組織の萎縮、自然発症の胃潰瘍、重症腎機能障害などが見られ、誘導して10日後前後で死亡した。ムチン型O糖鎖にシアル酸を付加するSt6galnac3,4ダブルノックアウトマウスの解析より、ポドプランリンのシアル酸欠損による腸管膜リンパ節に出血することが観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果からムチン型糖鎖が失われることによる複数の臓器に異常きたし、多臓器不全で死亡することが判明した。個々の臓器の表現型異常の分子レベルでの機序については今後の課題となるが、ムチン型糖鎖が各臓器の恒常性の維持に必須であることが明らかになった。多臓器不全を引き起こすメカニズム解明は、糖鎖生物学の新しい研究方向を提示し、糖鎖修飾の役割理解を深める基礎となります。また、ムチン型糖鎖異常の理解は、疾患の治療法や診断方法の開発に繋がり、バイオテクノロジー分野の技術進展を促します。

研究成果の概要（英文）：Cosmc, a C1galt1-specific molecular chaperone, is required for normal folding of C1galt1, which synthesizes the mucin-type glycan core 1 structure. To investigate the physiological roles of core 1-derived glycans, we generated Cosmc-conditional knockout (cKO) mice using various Cre driver mice. The ubiquitous and inducible cKO mice exhibited rapid weight loss in the thymus, adipose tissue, and pancreas, along with atrophy of white and brown adipose tissues, spontaneous gastric ulcers, severe renal dysfunction, and mortality around 10 days post-induction. Furthermore, analysis of St6galnac3 and St6galnac4 double knockout mice, which lack sialic acid addition to the mucin-type O-glycan chain, revealed that sialic acid deficiency in podoplanin led to hemorrhage in the mesenteric lymph nodes.

研究分野：解剖学

キーワード：糖鎖 ノックアウトマウス 糖転移酵素 糖タンパク質 ムチン型糖鎖 シアル酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は遺伝子からの転写産物を鋳型に翻訳された後、様々な化学的翻訳後修飾を受ける。翻訳後修飾の一つである糖鎖修飾は生命現象に深く関連している。糖鎖異常が原因の疾病には先天性糖鎖不全症、筋ジストロフィー、アルツハイマー病や2型糖尿病などが挙げられる。また、様々な癌において糖鎖抗原の発現変化が見られ、CA19-9やSTNなどバイオマーカーとして臨床応用されている。糖鎖修飾は、小胞体およびゴルジ体に局在する糖転移酵素によって逐次的に行われ、膜および分泌タンパク質の多くは、糖鎖修飾により「糖タンパク質」として存在する。糖鎖修飾において特筆すべきはその多様性で、糖転移酵素に糖分解酵素や糖ヌクレオチド輸送体などを合わせると、ヒトでは200種類以上の分子により糖鎖合成が調節されている。また、糖鎖構造は核酸やタンパク質とは違い鋳型非依存的であり、組織や細胞の種類、状態、時期およびキャリアタンパク質の種類によって異なる糖鎖が合成される。加えて、同一糖タンパク質でも糖鎖付加の位置、長さおよび構造は不均一である。さらに、糖転移酵素には多くのイソ酵素が存在し、その基質は様々な受容体糖鎖とその糖タンパク質の性質に対して異なる場合があるため、生体内でおこる糖鎖修飾は *in vitro* 解析だけでは説明することができない。よって、糖鎖の構造と生物学的機能との相関を解明することは非常に困難であり、糖タンパク質の糖鎖異常から生物学的機能を関連付ける必要性がある。

本申請では、糖タンパク質糖鎖のひとつで、粘液の主成分に含まれるムチン型糖鎖の生体内での機能解析のため、ムチン型糖鎖合成関連遺伝子のコンディショナルノックアウト(cKO)マウスの表現型解析を行う。糖鎖修飾異常により生じる疾患が見いだすことによって、その原因分子(糖タンパク質)は疾患特異的に糖鎖修飾されていることから、疾患に対してバイオマーカーなどの標的となる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではムチン型糖鎖の生理学的機能をムチン型糖鎖合成酵素の遺伝子改変マウスの表現型より解明し、さらにその原因となるキャリアタンパク質の同定および作用機序を明らかにする。遺伝子改変マウスは、ムチン型糖鎖の根本の合成に必須な *Cosmc*、非還元末端に存在するシアル酸転移酵素である *St6galnac3* と *St6galnac4* を使用した。

3. 研究の方法

(1) iCAG-Cos マウス(全身かつ誘導型 Cre マウスを利用した *Cosmc* 遺伝子コンディショナルノックアウトマウス)の表現型解析

マウス: ユビキタスかつ誘導性の CAGCre-ERTM マウスと *Cosmc*^{fllox} マウスを交配し作製した(iCAG-Cos マウス)。6週齢のオスマウスにタモキシフェン/コーン油を5日連続で腹腔内投与することにより Cre リコンビナーゼの発現を誘導した。

Helix Pomatia Agglutinin (HPA) レクチン解析: 安楽死後採取した各臓器から、レクチンプロット実施のための凍結サンプルおよびマイルドホルム固定パラフィンブロックサンプルを調整した。凍結サンプルは溶解バッファー内で可溶化させたタンパク質を10%SDS-PAGEで展開し、転写した膜と HPA と反応させ、レクチンプロットを実施した。パラフィンブロックサンプルは薄切後、HPAの免疫組織学的解析を実施した。

血清学的解析: 麻酔科で下大静脈より採血したものを富士ドライケム動物用臨床化学分析装置にて測定した。

(2) ムチン型糖鎖上の 2,6 シアリル化に必要な *St6galnac3::St6galnac4* 二重ノックアウトマウスの表現型解析

マウス: *St6galnac3::St6galnac4* 二重ヘテロマウスは、それぞれの遺伝子に対しての2種類の標的 sgRNA を使用し、CRISPR/Cas9 法にて作製した。*St6galnac3::St6galnac4* 二重ヘテロマウス同士の交配により *St6galnac3::St6galnac4* 二重ノックアウトマウスを作出した。

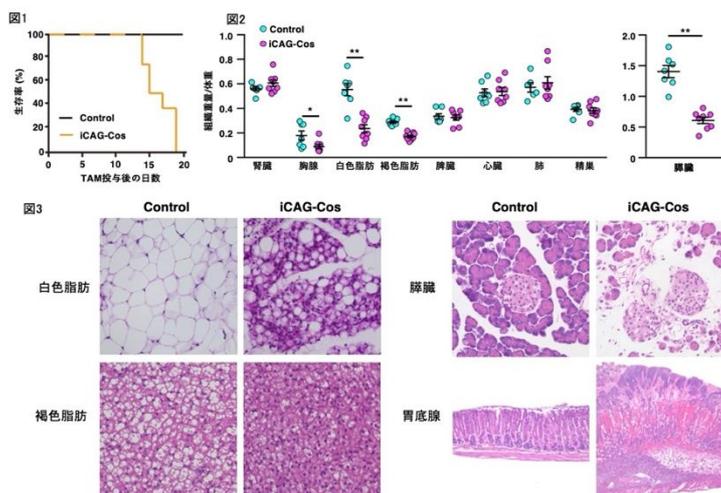
Maackia Amurensis (MALII) レクチン解析: レクチンプロット、免疫組織学的方法は(1)と同様である。様々なリンパ節を採取し、全タンパク質およびポドプラニン抗体で免疫沈降させたものを使用した。ポドプラニン抗体は、ウエスタンおよび免疫染色には AF3244 (R&D systems)、免疫沈降には 8F11 Anti-Aggrus (Podoplanin) 抗体 D190-3 (Medical & Biological Laboratories) を使用した。

4. 研究成果

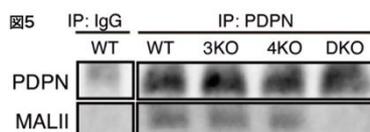
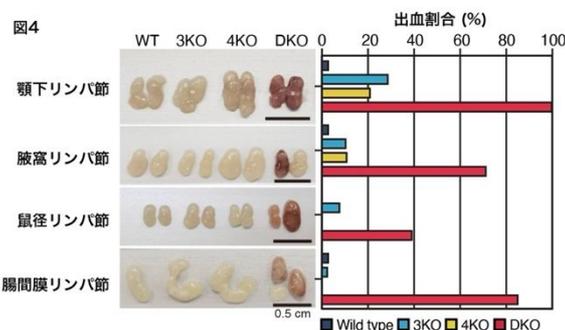
(1) iCAG-Cos マウス

コア 1 構造はムチン型糖鎖の主要な構成要素であり、膜結合タンパク質や分泌タンパク質に翻

訳後修飾であるグリコシル化によって付加される。コア 1 構造を合成する酵素であるコア 1 1,3-ガラクトース転移酵素 (C1gal t1) は、その酵素活性のために C1gal t1 特異的分子シャペロンである Cosmc を必要とする。C1gal t1 と Cosmc ノックアウトマウスは両者とも同様な表現型異常を示し胚性致死となり、成体期におけるコア 1 由来のムチン型糖鎖の生物学的役割は十分に理解されていない。我々は、コア 1 由来ムチン型糖鎖の生理機能を調べるために、ユビキタスかつ誘導可能な CAGCre-ERTM/Cosmc ノックアウトマウス (iCAG-Cos) を作製した。iCAG-Cos マウスは、コア 1 由来のムチン型糖鎖がほぼ全身で欠損し、タモキシフェン誘導後 19 日以内にすべて死亡した(図 1)。タモキシフェン誘導 10 日後には胸腺、脂肪組織、膵臓の重量が激減した(図 2)。また、白血球減少、血小板減少、重篤な急性膵炎、白色および褐色脂肪組織の萎縮、自然発症の胃潰瘍、重篤な腎機能障害を示し、これらが iCAG-Cos マウスの高い死亡率の根底にある原因と考えられた(図 3)。血清学的解析の結果、iCAG-Cos マウスはコントロールマウスに比べ、血中グルコースと総血中タンパク質レベルが低く、トリグリセリド、高密度リポタンパク質、総コレステロールレベルが高いことが示された。これらのデータは、成体マウスの恒常性維持にコア 1 由来ムチン型糖鎖が重要であることを示している。



(2) シアル酸(SA)は糖タンパク質や糖脂質の糖鎖末端に存在し、様々な生命現象に関与している。ジシアリル-T (SA 2-3Gal 1-3(SA 2-6)GalNAc 1-0-Ser/Thr) 構造の生物学的機能はほとんど不明である。ジシアリル-T 構造の役割を解明し、その生体内合成に関与する N-アセチルガラクトサミニド 2,6-シアル酸転移酵素(St6galnac)ファミリーの鍵となる酵素を同定するために、St6galnac3 欠損マウスと St6galnac4 欠損マウスを作製した。St6galnac3 欠損マウスと St6galnac4 欠損マウスを作製したところ、両者とも目立った表現型異常はなく、正常に発育した。しかし、St6galnac3::St6galnac4 ダブルノックアウトマウス(DKO)では、リンパ節(LN)の自然出血が認められた(図 4)。LN 出血の原因を明らかにするため、ジシアリル T 構造を修飾するポドプラニン(PDPN)を調べた。DKO マウスの LN におけるポドプラニンの蛋白発現は野生型マウスと同様であった。しかし、DKO マウスの LN から免疫沈降したポドプラニンでは、ジシアリル-T を認識する MALII レクチンの反応性が完全に消失していた(図 5)。さらに、LN 中の high endothelial venule (HEV) の細胞表面では血管内皮カドヘリンの発現が減少しており、出血は HEV の構造破壊によって引き起こされたことが示唆された。これらの結果は、マウス LN においてポドプラニンがジシアリル-T 構造を持ち、St6galnac3 と St6galnac4 の両方がジシアリル-T 合成に必要であることを示唆している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki Riku, Nakamura Yuki, Koiwai Rikako, Fuseya Sayaka, Murakami Yuka, Hagiwara Kozue, Sato Takashi, Takahashi Satoru, Kudo Takashi	4. 巻 23
2. 論文標題 Global Loss of Core 1-Derived O-Glycans in Mice Leads to High Mortality Due to Acute Kidney Failure and Gastric Ulcers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1273 ~ 1273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23031273	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 Fuseya Sayaka, Izumi Hiroyuki, Hamano Ayane, Murakami Yuka, Suzuki Riku, Koiwai Rikako, Hayashi Takuto, Kuno Atsushi, Takahashi Satoru, Kudo Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Reduction in disialyl-T antigen levels in mice deficient for both St6galnac3 and St6galnac4 results in blood filling of lymph nodes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10582
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-37363-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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木陸、村上由佳、布施谷清香、濱野彩音、林卓杜、萩原梢、佐藤隆、高橋智、工藤崇
2. 発表標題 コア1型O型糖鎖はグルコース応答性のインスリン分泌に必要である
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱野彩音、布施谷清香、村上由佳、和泉裕之、高坂拓、清家由友乃、高橋智、工藤崇
2. 発表標題 腎障害時の近位尿管におけるムチン型糖鎖の機能解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上由佳、鈴木陸、布施谷清香、濱野彩音、萩原梢、佐藤隆、高橋智、工藤崇
2. 発表標題 マウスのコア1由来0-型糖鎖の全身欠損は、多臓器不全による高い死亡率をもたらす
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 和泉裕之、布施谷清香、村上由佳、林卓杜、久野敦、高橋智、工藤崇
2. 発表標題 St6galnac3、St6galnac4のダブルロックアウトによるdisialyl-T構造の減少は、リンパ節で出血を示す
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村上由佳、鈴木陸、布施谷清香、和泉裕之、清家由友乃、萩原梢、佐藤隆、高橋智、工藤崇
2. 発表標題 膵 細胞特異的Core 1構造由来0-型糖鎖欠損マウスを用いたインスリン分泌機構の解明
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------