

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：34512

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659039

研究課題名(和文)プロテオグリカンによるゴルジ体ストレス応答

研究課題名(英文)Golgi stress response by proteoglycans

研究代表者

北川 裕之(Kitagawa, Hiroshi)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40221915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：プロテオグリカンはグリコサミノグリカン鎖によって修飾された糖タンパク質であり、その機能発現には糖鎖が重要である。プロテオグリカンの糖鎖修飾は主にゴルジ体で行われるため、ゴルジ体ストレス応答と呼ばれる品質管理機構によって厳格な制御を受けている可能性が高い。本研究では、EXTL2と呼ばれるグリコサミノグリカン鎖の生合成に関与する糖転移酵素が、グリコサミノグリカン鎖の品質管理機構に関わると予想し、EXTL2 遺伝子欠損マウスを用いてEXTL2の機能解析を行った。その結果、EXTL2はグリコサミノグリカン鎖の合成量を負に調節し、その調節機構の破綻が様々な病態と密接に関連することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Glycosaminoglycans (GAGs) are components of proteoglycans (PGs), which are abundant on the surfaces of most cells and in extracellular matrices. PGs are known to function as cofactors in a variety of biological processes. Most biological activities of PGs are attributed to the GAG side chains that interact with diverse protein ligands via specific saccharide sequences. EXTL2, a member of the EXT family of tumor suppressors, functions to suppress any GAG biosynthesis that is enhanced by a xylose kinase, and thus lack of EXTL2 causes GAG overproduction and structural changes to GAGs. These poor-quality GAGs have effects on the cell signaling such as HGF-mediated and BMP-mediated signaling, and consequently disturb liver regeneration and blood vessel remodeling. Therefore, the EXTL2-dependent mechanism that regulates GAG biosynthesis might be a "quality control system" for PGs and GAGs produced in the absence of EXTL2 can be closely associated with diseases.

研究分野：生化学・分子生物学・糖鎖生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：プロテオグリカン 糖転移酵素 硫酸化糖鎖 ノックアウトマウス ガン抑制遺伝子 ストレス応答
リン酸化 脱リン酸化

1. 研究開始当初の背景

プロテオグリカンは、グリコサミノグリカン鎖と呼ばれる糖鎖によって修飾された糖タンパク質であり、グリコサミノグリカン鎖を介して様々な細胞増殖因子や細胞外マトリックス成分と相互作用し、細胞接着、移動、増殖、分化、形態形成といった多彩な細胞活動を制御している。したがって、プロテオグリカンの機能発現は、グリコサミノグリカン鎖の生合成によって調節されていると考えられる。実際、グリコサミノグリカン鎖の生合成に関与する転移酵素遺伝子の変異が、様々な疾患を引き起こすことも見いだされている。グリコサミノグリカン鎖の生合成はキシロースがコアタンパク質のセリン残基に転移されることにより開始され、四糖からなる結合領域 (GlcA 1-3Gal 1-3Gal 1-4Xyl 1-*O*-Ser) が合成された後、最初のヘキシサミンが転移されて二糖単位が繰り返される領域の合成が開始される。我々がクローニングした FAM20B による一過的なキシロースのリン酸化は、結合領域の合成を促進するが、結合領域四糖の合成完了とともに速やかに脱リン酸化され、二糖単位が繰り返される領域の合成が開始される。EXTL2 は、我々が見出した糖転移酵素であり、がん抑制遺伝子 *EXT* 遺伝子ファミリーに属する。EXTL2 は、*in vitro* では結合領域四糖に 1-4 結合で *N*-アセチルヘキシサミンを転移する活性を保持する。しかしながら、EXTL2 がどのようにグリコサミノグリカン鎖の生合成に関わっているのかは、不明であった。そこで、我々は *EXTL2* の遺伝子ノックアウトマウスを作成し、その機能を解析しようと考えた。その結果、*EXTL2* のノックアウトマウスは、野生型マウスに比べコンドロイチン硫酸およびヘパラン硫酸鎖の量が共に増えており、EXTL2 が存在しないとより多くのグリコサミノグリカン鎖およびプロテオグリカンが細胞に蓄積していることが判明した。

2. 研究の目的

プロテオグリカンはグリコサミノグリカン鎖によって修飾された糖タンパク質であり、その機能発現には糖鎖が重要である。プロテオグリカンの糖鎖修飾は主にゴルジ体で行われるため、ゴルジ体ストレス応答と呼ばれる品質管理機構によって厳格な制御を受けている可能性が高い。本研究は、プロテオグリカンの品質を維持する機構の存在とその仕組み、またシステムの動作不良が細胞や個体にどのような影響を与えるかについて理解することを目的としている。

我々は、グリコサミノグリカン鎖の生合成に関与する複数の遺伝子のクローニングに成功しており、そのうちの一つに *EXTL2* 遺伝子がある。*EXTL2* 遺伝子のノックアウトマウスの解析より、EXTL2 はグリコサミノグリカン鎖の合成を未知の機構で制御している可

能性が示唆された。そこで、EXTL2 がプロテオグリカンの品質管理に働く可能性を検討することで、プロテオグリカンの合成異常を検知する新たな機構を発見できると考え本研究を遂行した。

3. 研究の方法

1) *EXTL2* 遺伝子のノックアウトマウスおよび野生型マウスの肝臓からアルカリ処理によりグリコサミノグリカン鎖を抽出、精製し、2-アミノベンズアミドを用いて還元末端を標識後、コンドロイチナーゼABCを作用させHPLCにより結合領域オリゴ糖を調製した。調製したオリゴ糖に、コンドロイチナーゼACIIやヘパリチナーゼI、そして *N*-アセチルガラクトサミニダーゼなどの糖分解酵素を作用させ、それらの構造をHPLCにより分析した。また、野生型マウスに検出され、*EXTL2* 遺伝子のノックアウトマウスに検出されなかった結合領域オリゴ糖の構造を500-MHzの¹H-NMRを用いて解析した。

(2) 野生型マウスと *EXTL2* 遺伝子のノックアウトマウスに四塩化炭素の投与により急性肝炎を誘導し、炎症から回復過程におけるプロテオグリカンとグリコサミノグリカン鎖の変化を経時的に追跡した。プロテオグリカンは、肝臓のタンパク質抽出液を、主要なプロテオグリカンに対する抗体を用いてウェスタンブロットティングすることによって解析した。その際、グリコサミノグリカン鎖の分解酵素処理を組み合わせることで、グリコサミノグリカン鎖の付加したコアタンパク質の割合を解析した。特異的なグリコサミノグリカン鎖を認識する市販の抗コンドロイチン硫酸および抗ヘパラン硫酸抗体を使って、グリコサミノグリカン鎖の構造変化を調べた。さらに、四塩化炭素処理した肝臓からグリコサミノグリカン鎖を精製し、二糖組成解析を行った。

4. 研究成果

(1) *EXTL2* 遺伝子のノックアウトマウスの肝臓におけるグリコサミノグリカン鎖量を解析した結果、野生型マウスの肝臓に比べその合成量が増加していたため、EXTL2はグリコサミノグリカン鎖の生合成を負に制御する調節因子であることが判明した。この制御機構を調べるため、野生型マウスと *EXTL2* 遺伝子のノックアウトマウスの肝臓からグリコサミノグリカン鎖を精製し、酵素消化により結合領域の構造を解析した。その結果、野生型マウスには、ヘパリチナーゼIやアルカリフォスファターゼに感受性を示す結合領域オリゴ糖が存在することが判明した。この構造は、*EXTL2* 遺伝子のノックアウトマウスには存在しなかったため、さらに¹H-NMRを用いて構造を詳細に解析したところ、GlcNAc 1-4GlcA 1-3Gal 1-3Gal 1-4Xyl (2-*O*-phosphate) であること

が判明した。また興味深いことに、この構造にヘパラン硫酸合成酵素やコンドロイチン硫酸合成酵素を作用させてもグリコサミノグリカン鎖は合成できなかった。したがって、EXTL2は合成中のリン酸化結合領域4糖(GlcA 1-3Gal 1-3Gal 1-4Xyl(2-O-phosphate))にN-アセチルグルコサミン残基を付加し、糖鎖伸長を一時停止させる酵素であることがわかった。これらの結果から、EXTL2はプロテオグリカンの品質管理に働く可能性が示唆された。ゴルジ体においてプロテオグリカンの品質管理機構が存在する生物学的な理由は、分解されるべきプロテオグリカンが分泌されてしまうことが生体にとって不都合であるからだと考えられる。EXTL2遺伝子のノックアウトマウスは、分解されるべきプロテオグリカンが蓄積し、様々な疾患になりやすい体質になっていることが予想されたので、四塩化炭素を用いて急性肝炎を誘発させ、その病態を野生型マウスと比較検討することにした。

(2) EXTL2 遺伝子の欠損によるグリコサミノグリカン鎖の合成異常は、発生過程や正常時の生体の恒常性維持には大きな影響を示さなかったが、四塩化炭素を用いて急性肝炎を起こすと、病態が野生型マウスよりも重篤化することが判明した。この原因を調べたところ、EXTL2 遺伝子が欠損した肝細胞では、肝細胞増殖因子に対する応答が顕著に低下しており、細胞増殖能と生存能の低下が観察された。また、四塩化炭素による損傷から治癒に向かう過程で、野生型マウスのグリコサミノグリカン鎖の合成量は増加後、減少し正常レベルに戻るが、ノックアウトマウスではグリコサミノグリカン鎖量が増加したまま減少しないことがわかった。これらの結果から、EXTL2 によるグリコサミノグリカン鎖の合成調節が炎症状態を決める一因である可能性が示唆された。さらに、肝再生過程において、EXTL2 遺伝子のノックアウトマウスの星細胞では、グリコサミノグリカン鎖の合成異常が起きていること、そしておそらくこのことにより、損傷後に構築される細胞外マトリックスの状態が変化していることが判明した。これらのことにより、EXTL2 によるグリコサミノグリカン鎖の合成調節機構は、グリコサミノグリカン鎖の合成が活発に起こる病態時などに重要な役割を果たすこと、そして、この調節機構の破綻が病態と密接に関連することが示唆された。

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4件)

Nadanaka, S., Kitagawa, H.
EXTL2 controls liver regeneration and aortic calcification through xylose kinase-dependent

regulation of glycosaminoglycan biosynthesis. **Matrix Biol.**, 査読有, 35, 2014, 18-24.

DOI: 10.1016/j.matbio.2103.10.1010

Purunomo, E., Emoto, N., Nugrahaningsih, D., Nakayama, K., Yagi, K., Heiden, S., Nadanaka, S., Kitagawa, H., Hirata, K.

Glycosaminoglycan overproduction in the aorta increases aortic calcification in murine chronic kidney disease.

J. Am. Heart Assoc., 査読有, 2(5), 2013, e000405.

DOI: 10.1161/JAHA.113.000405

Nadanaka, S., Kagiya, S., Kitagawa, H.
Roles of EXTL2, a member of EXT family of tumor suppressors, in liver injury and regeneration processes.

Biochem. J., 査読有, 454(1), 2013, 133-145.

DOI: 10.1042/BJ20130323

Nadanaka, S., Zhou, S., Kagiya, S., Shoji, N., Sugahara, K., Sugihara, K., Asano, M., Kitagawa, H.

EXTL2, a member of EXT family of tumor suppressors, controls glycosaminoglycan biosynthesis in a xylose kinase-dependent manner.

J. Biol. Chem., 査読有, 288(13), 2013, 9321-9333.

DOI: 10.1074/jbc.M112.416909

[学会発表](計4件)

北川 裕之

プロテオグリカン研究の魅力～細胞の分化を制御するコンドロイチン硫酸～
H25年度 生理学研究所研究会「構造の多様性に立脚した糖鎖機能の解明に向けて」
2013.11.14 岡崎

北川 裕之

糖鎖リモデリングによるコンドロイチン硫酸の機能解析

第64回FCCAセミナー/FCCAグライコサイエンス若手フォーラム 2013

2013.08.08、大阪

灘中 里美, Shaobo Zhou, 鍵山 正二, 庄司 奈緒子, 菅原 一幸, 杉浦 一司, 浅野 雅秀, 北川 裕之

EXTL2によるグリコサミノグリカン合成調節機構とその破綻による急性肝炎の重篤化

第32回日本糖質学会年会

2013.08.05～07、大阪

Purnomo, E., Emoto, N., Nugrahaningsih, D. A. A., Yagi, K., Nakayama, K., Nadanaka, S., Kitagawa, H., Hirata, K.

Altered cell surface heparan sulfate expressions induce osteoblastic differentiation and attenuate phagocytosis activity of human coronary artery smooth muscle cells (HCASMCs).

第35回日本高血圧学会総会

2012.09.20～22、名古屋

〔図書〕(計1件)

- . Nadanaka, S., Kitagawa, H.
Exostosin (multiple)-like 1-3 (EXTL1-3).
Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes, 2nd Ed (Taniguchi, N., Honke, K., Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y., and Angata, T., eds)
Springer, 2014, in press.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kobepharma-u.ac.jp/~biochem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 裕之 (KITAGAWA, Hiroshi)
神戸薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：40221915

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

灘中 里美 (NADANAKA, Satomi)
神戸薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：60378578