

氏名	野村 篤生
(ふりがな)	(のむら あつお)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第1173号
学位審査年月日	令和3年1月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Fluctuation in O-GlcNAcylation inactivates STIM1 to reduce store-operated calcium ion entry via downregulation of Ser621 phosphorylation (O-GlcNAc修飾の変動はSer621リン酸化の抑制を介してSTIM1を不活性化し、ストア感受性Ca ²⁺ 流入を減少させる)
論文審査委員	(主) 教授 矢野 貴人 教授 高井 真司 教授 小野 富三人

学位論文内容の要旨

《背景と目的》

細胞内カルシウムイオン (Ca²⁺) バランスの維持に主要な役割を果たす一つにストア感受性カルシウム流入 (store operated calcium entry, SOCE) があり、神経細胞の興奮性などの生理学的現象において重要な役割を果たしている。SOCEの中心的な働きを演じているstromal interaction molecule 1 (STIM1) は、Ca²⁺を貯蔵する小胞体膜上にモノマーで存在する膜一回貫通型のタンパク質で、小胞体内のCa²⁺の枯渇を感知することでオリゴマー化し、細胞膜上に存在するOrai1と結合して細胞質内へCa²⁺を取り込む。SOCEの活性化にはSTIM1の小胞体内に局在するEFハンドモチーフによるCa²⁺枯渇の感知に加え、細胞質側に存在するセリン/スレオニン (Ser/Thr) リッチ領域にあるセリン残基 (Ser575、Ser608、Ser621) のリン酸化が重要であり、これらのリン酸基と、微小管結合タンパク質

である end-binding protein 1 (EB1) との解離が SOCE 活性化の前段階に起こることが報告されている。

O-linked *N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) 修飾は、タンパク質の Ser/Thr 残基の水酸基に GlcNAc が付加される翻訳後修飾の一つである。*O*-GlcNAc 修飾は細胞内のグルコース濃度に依存して増減し、それぞれ *O*-GlcNAc 転移酵素 (*O*-GlcNAc transferase, OGT) または *O*-GlcNAc 脱離酵素 (*O*-GlcNAcase, OGA) によって触媒され、リン酸化と競合して細胞内シグナル伝達を調節することで心臓病や癌などの疾患に関わっている。STIM1 は、*O*-GlcNAc 修飾されており、SOCE 活性に影響していることが既に報告されているが、そのメカニズムは分かっていない。そこで本研究では STIM1 の *O*-GlcNAc 修飾部位の同定、*O*-GlcNAc 修飾の SOCE 活性への影響とそのメカニズムの解明を目的とした。

《方 法》

1. 細胞はヒト胎児腎細胞 (HEK293、HEK と略す) を使用し、DMEM 培地 (1 g/L グルコース含有) を用いて培養した。グルコースの代謝物が *O*-GlcNAc 修飾を亢進させることから、培養液中のグルコース濃度を増減 (0、4.5 g/L) させた。また、直接的に *O*-GlcNAc 修飾を増加させるために OGA 阻害剤 ThiametG (10 μ M, 24hrs) 処理または *ogt* 遺伝子導入を行った。さらに、*O*-GlcNAc 修飾を低下させるために OGT 阻害剤 ST045849 (50 μ M, 24hrs) 処理または siOGT 導入を行って後述のアッセイ法を用いて解析した。
2. *O*-GlcNAc 修飾予測専用プログラム (YinOYang 1.2) を用いて *O*-GlcNAc 修飾が起りやすいと予測したアミノ酸残基 (Ser621、Thr626) に着目して、STIM1 の *O*-GlcNAc 修飾部位の同定を試みた。CRISPR/Cas9 システムを用いて内在性の STIM1 をノックアウトした HEK (STIM1-KO-HEK と略す) を樹立し、その細胞に、野生型 STIM1、その変異体である S621A、または T626A を遺伝子導入した高発現細胞 (各々、STIM1-KO-WT-HEK、STIM1-KO-S621A-HEK、STIM1-KO-T626A-HEK と略す) を作製して、後述のアッセイ法を用いて解析した。
3. *O*-GlcNAc 修飾が SOCE 活性に与える影響に対する Ser621 のリン酸化の必要性を検討

するため、T626A 変異にさらに Ser575、Ser608 あるいは Ser621 のグルタミン酸残基への変異を導入した STIM1 の高発現細胞（各々、STIM1-KO-T626A-S575E-HEK、STIM1-KO-T626A-S608E-HEK、STIM1-KO-T626A-S621E-HEK と略す）を作製し SOCE 活性の測定（後述）を行った。

4. 本研究で使用したアッセイ法

各種タンパク質の発現、相互作用、局在の解析を、ウエスタンブロット法、共免疫沈降法、蛍光免疫染色法で行った。Fura2-AM という蛍光色素を用い、Ca²⁺-free 培地中で小胞体膜上に存在する sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 阻害薬である Thapsigargin (1 μM, 15min) を添加することにより小胞体内 Ca²⁺を枯渇させ、後に続く培地への Ca²⁺添加による細胞内 Ca²⁺流入を検出することで SOCE 活性を測定した。

《結果》

1. 培養液中のグルコース濃度を増減させたところ、1 g/L と比較して 0、4.5 g/L のどちらにおいても SOCE 活性の低下が見られた。また、ThiametG 処理あるいは *ogt* 遺伝子導入、ST045849 処理あるいは siOGT 導入のいずれにおいても、control と比較して SOCE 活性が低下した。すなわち、O-GlcNAc 修飾の増減によって SOCE 活性の低下が見られた。次に、SOCE 活性化時の STIM1 の Ser575、Ser608、Ser621 のリン酸化について *ogt* 遺伝子導入と siOGT 導入の条件下で比較したところ、いずれにおいても control と比較して Ser621 のリン酸化が低下していることが分かった。
2. STIM1-KO-WT-HEK、STIM1-KO-S621A-HEK、STIM1-KO-T626A-HEK にて、STIM1 の O-GlcNAc 修飾部位の同定を共免疫沈降分析により試みたところ、Ser621 と Thr626 が O-GlcNAc 修飾されていることが判明した。ただし、定常状態での修飾に違いがあり、Thr626 は O-GlcNAc 修飾されていたが、Ser621 は O-GlcNAc 修飾されていなかった。さらに、STIM1-KO-S621A-HEK および STIM1-KO-T626A-HEK における SOCE 活性は、どちらも STIM1-KO-WT-HEK と比べ低下していた。また、

ThiametG 添加後の STIM1-KO-WT-HEK および STIM1-KO-S621A-HEK と STIM1-KO-T626A-HEK において、STIM1 のオリゴマー化が減少するのみならず、SOCE の活性化に必要な EB1 との解離および Orail との結合はともに低下していた。

3. T626A 変異にさらに Ser575E、Ser608E あるいは Ser621E 変異を導入した STIM1 発現細胞の SOCE 活性を測定した。まず、STIM1-KO-T626A-HEK は STIM1-KO-WT-HEK に比し SOCE 活性が低下していた。STIM1-KO-T626A-S621E-HEK は STIM1-KO-WT-HEK のレベルまで SOCE 活性が回復したが、STIM1-KO-T626A-S575E-HEK、STIM1-KO-T626A-S608E-HEK は回復せず、STIM1-KO-T626A-HEK と同レベルであった。

《考 察》

1. O-GlcNAc 修飾減少時における STIM1 の Thr626 での O-GlcNAc 修飾の減少と O-GlcNAc 修飾増加時における Ser621 での O-GlcNAc 修飾の増加が、どちらにおいても Ser621 のリン酸化の減少を引き起こし EB1 との解離および Orail との結合が失われることに伴って SOCE 活性を低下させることが示唆された。
2. SOCE 活性に O-GlcNAc 修飾が関連していることは報告されていたが、今回 STIM1 の機能に影響する O-GlcNAc 修飾部位を明らかにしたことで、癌、心不全、アルツハイマー病などの SOCE 関連疾患の治療標的を明確にすることができた。

《結 論》

STIM1 の Ser621 のリン酸化には Thr626 の O-GlcNAc 修飾が必要であり、また、Ser621 の O-GlcNAc 修飾と競合するため、O-GlcNAc 修飾の増減はいずれも Ser621 リン酸化の抑制を介して STIM1 を不活性化し SOCE 活性を減少させる。これらの結果は SOCE 関連疾患における発症のメカニズムや治療法開発の一端となりうる。

論文審査結果の要旨

O-linked *N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) 修飾は細胞内シグナル伝達を調節する翻訳後修飾の一つである。本研究は Ca^{2+} の調節機構の一つであるストア感受性カルシウム流入 (store operated calcium entry, SOCE) において重要な役割を果たす stromal interaction molecule 1 (STIM1) の *O*-GlcNAc 修飾について解析したものである。

申請者らはまず、*O*-GlcNAc 修飾が変動する一因となるグルコース濃度の増減によって SOCE 活性が低下することを見出した。次に、*O*-GlcNAc 修飾を増減させる試薬や修飾に関わる酵素遺伝子の過剰発現や欠損によっても同様の結果を得た。また、Ser621 と Thr626 の 2 残基を STIM1 の *O*-GlcNAc 修飾部位として同定したが、Thr626 は定常状態で *O*-GlcNAc 修飾されているのに対し、Ser621 は *O*-GlcNAc 修飾増加時にのみ修飾されることも見出した。さらに、*O*-GlcNAc 修飾を増加させる試薬によって、STIM1 のオリゴマー化の減少、微小管結合タンパク質である EB1 との解離低下や細胞膜 Ca^{2+} チャンネルである Orail との相互作用低下が見られた。*O*-GlcNAc 修飾減少時における STIM1 の Thr626 での *O*-GlcNAc 修飾の減少と *O*-GlcNAc 修飾増加時における Ser621 での *O*-GlcNAc 修飾の増加が、どちらにおいても Ser621 リン酸化の抑制を介して STIM1 を不活性化し SOCE 活性を減少させることを証明した。

O-GlcNAc 修飾の増加は癌や糖尿病において広く知られ研究が多く行われている。一方、*O*-GlcNAc 修飾の低下が見られる神経変性疾患における *O*-GlcNAc 修飾の役割はいまだ不明な点が多い。本研究は STIM1 の Thr626 での *O*-GlcNAc 修飾の減少が SOCE 活性を低下させることを示しており、興奮収縮連関に代表されるような Ca^{2+} シグナルではない新たな機能の解析を行うことで、細胞内 Ca^{2+} シグナル伝達や Ca^{2+} バランスの維持の破綻に伴う疾患にて発症のメカニズムや治療法開発の一端となる可能性がある。 Ca^{2+} は生体内に広く存在しているため、この研究が発展すれば治療薬としての臨床創薬へと発展するの可能性も十分に期待でき、臨床的意義は大きいと考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of Biological Chemistry 295(50): 17071-17082, 2020 Dec

doi: 10.1074/jbc.RA120.014271.